

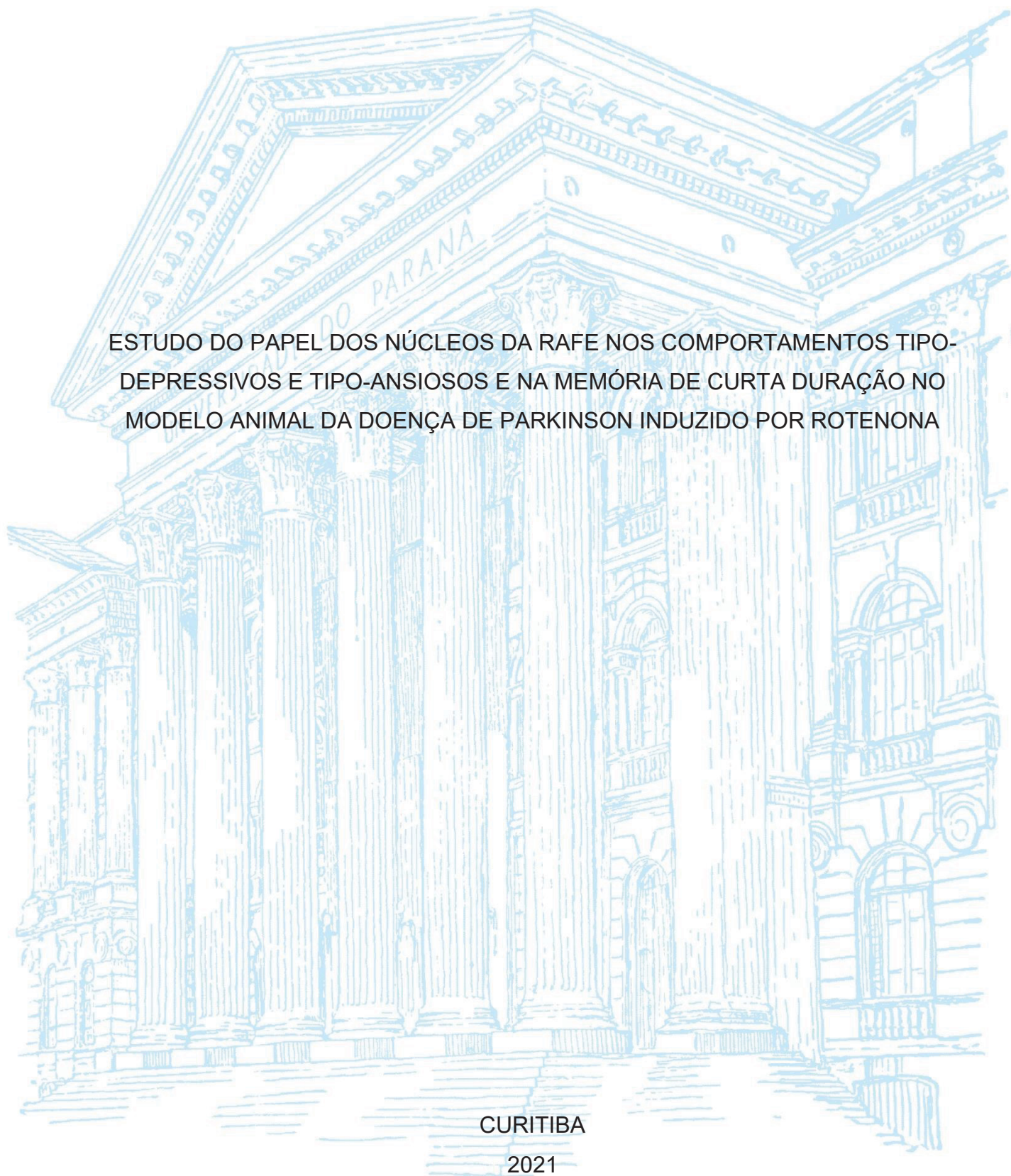
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELE CRISTINA RAMOS

ESTUDO DO PAPEL DOS NÚCLEOS DA RAFE NOS COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVOS E TIPO-ANSIOSOS E NA MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO NO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA

CURITIBA

2021



DANIELE CRISTINA RAMOS

ESTUDO DO PAPEL DOS NÚCLEOS DA RAFE NOS COMPORTAMENTOS TIPO-  
DEPRESSIVOS E TIPO-ANSIOSOS E NA MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO NO  
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA

Tese apresentada para a Defesa de Doutorado como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Aparecida B. F. Vital.

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Ramos, Daniele Cristina.

Estudo do papel dos núcleos da rafe nos comportamentos tipo-depressivos e tipo-ansiosos e na memória de curta duração no modelo animal da doença de Parkinson induzido por rotenona. / Daniele Cristina Ramos. – Curitiba, 2021.

85 f. : il.

Orientadora: Maria Aparecida B. F. Vital.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Parkinson, Doença de. 2. Serotonina. 3. Depressão. 4. Distúrbios da memória. I. Título. II. Vital, Maria Aparecida B. F. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.833



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -  
40001016038P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DANIELE CRISTINA RAMOS** intitulada: **Estudo do Papel dos Núcleos da Rafe nos Comportamentos Tipo-Depressivos e Tipo-Ansiosos e na Memória de Curta Duração no Modelo Animal da Doença de Parkinson Induzido por Rotenona.**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

06/01/2022 14:47:12.0

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/01/2022 08:50:53.0

ROBERTO ANDREATINI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/01/2022 15:53:56.0

RUBIA MARIA MONTEIRO WEFFORT

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica

05/01/2022 15:38:32.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: [pgfarmacologia@ufpr.br](mailto:pgfarmacologia@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 140798

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 140798

*Dedico esta tese aos meus pais José e Rosa.*

*A vocês, todo meu amor e gratidão.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente a Deus, e às bênçãos de Nossa Senhora Aparecida por me iluminarem em toda essa caminhada e que me fizeram acreditar que nada é impossível, e os sonhos podem se tornar realidade.

Agradeço aos meus amados e queridos pais, José e Rosa, que sempre me incentivaram a estudar e buscar meus objetivos. Por todo amor e carinho incondicionais. Amo vocês!

Agradeço em especial à minha orientadora prof<sup>a</sup> Dra Maria Vital, por seus ensinamentos, sua incrível didática para explicar e compartilhar tantos conhecimentos na área. Serei eternamente grata por sua amizade, paciência e compreensão com todas as minhas dificuldades e limitações, principalmente nas etapas finais do doutorado. Muito obrigada!

Agradeço à prof<sup>a</sup> Dra Elaine Del-Bel pela parceria e trabalho colaborativo para a realização deste estudo.

Agradeço à Mariza Bortolanza que, gentilmente, aceitou em me ensinar as técnicas de imunohistoquímica, fundamentais para o trabalho. Obrigada pela sua amizade!

Agradeço aos professores da banca por aceitarem o convite e contribuírem com suas opiniões, sugestões e críticas.

Agradeço às minhas irmãs Denise e Josiane que estiveram presentes nesse meu período de estudos e experimentos. Muito obrigada por toda a ajuda para que eu pudesse concluir essa etapa. Serei eternamente grata! Vocês moram no meu coração.

Agradeço ao meu “irmão” de laboratório Leonardo por sua fundamental ajuda nos experimentos, por sua amizade e tantas palavras de apoio. Valeu, Leo!

Agradeço aos meus colegas e amigos Thiago, José, Maryana, Camila, Anderson, e a todos que se reuniam na sala 106, pela alegre convivência regada a muito café preto sem açúcar. Muito obrigada por toda a ajuda e apoio que vocês sempre me deram.

Agradeço a todos os professores do departamento de Farmacologia que foram fundamentais para toda a minha formação desde a graduação até aqui, e para sempre.

Agradeço aos funcionários dos departamentos de Farmacologia, Fisiologia e Biologia celular (Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência) da UFPR.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos e a todas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do trabalho.

Deixo aqui a minha gratidão a todos os animais que participaram deste estudo.

“Continue andando. Haverá a chance de você ser barrado por um obstáculo, talvez por algo que você nem espere. Mas siga, até porque eu nunca ouvi falar de ninguém que foi barrado enquanto estava parado.”

**Charles F. Kettering**



## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por ser uma desordem motora. A principal marca neuropatológica da DP é a morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc). No entanto, os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico também estão comprometidos, os quais contribuem para o desenvolvimento das desordens não motoras, tais como: prejuízo cognitivo, ansiedade e depressão. O sistema serotoninérgico é composto pelos neurônios dos núcleos da rafe, principalmente, pelo núcleo dorsal da rafe (DRN) e o núcleo mediano da rafe (MRN), responsáveis pela síntese central de serotonina, e por suas projeções que atingem várias estruturas encefálicas. O objetivo do presente trabalho foi investigar se o modelo da rotenona seria capaz de afetar os neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsal e mediano da rafe, e, assim, reduzir os níveis de serotonina em estruturas-alvo relacionadas com os comportamentos tipo-depressivos e tipo-ansiosos e a memória de curta-duração. Para isso, ratos Wistar machos adultos foram divididos aleatoriamente em dois grupos. O grupo rotenona recebeu a neurotoxina sistemicamente na dose de 2,5 mg/kg por 10 dias. O grupo controle recebeu o veículo óleo de girassol na dose de 1,0 mL/kg. Após 24 h do fim do protocolo, os animais apresentaram hipolocomoção no campo aberto. Este teste foi repetido nos pontos temporais 7, 14, 21 e 28 dias, e foi observada a recuperação espontânea da função locomotora dos animais. Além disso, o comportamento tipo-depressivo (anedonia) foi avaliado no teste da preferência por sacarose, nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias. Os resultados obtidos mostraram que o grupo rotenona exibiu alta preferência por sacarose e ausência de comportamento anedônico. No 22º dia, após a última administração de rotenona, os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento social, e demonstraram prejuízo de memória de curta duração. Ainda no 22º dia, grupos independentes de animais foram testados no *splash test*. Como na preferência por sacarose, os resultados mostraram que o grupo rotenona não exibiu comportamento anedônico. No 25º dia, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. Os resultados do teste mostraram que o grupo rotenona não apresentou comportamento tipo-ansioso. Por fim, no 28º dia, os animais foram submetidos ao teste da natação forçada, e os dados mostraram que o grupo rotenona apresentou comportamento tipo-depressivo. Imediatamente após este teste, os animais foram eutanasiados para as posteriores análises. As análises imunohistoquímicas revelaram que a administração de rotenona induziu a uma lesão parcial da SNpc, evidenciada pela redução de 20% dos neurônios dopaminérgicos TH-ir. Além disso, a quantificação dos neurônios serotoninérgicos da MRN revelou que houve diminuição significativa do número de neurônios TPH-ir apenas no 28º dia após a última administração de rotenona. Na análise das sub-regiões da DRN, apenas a sub-região DRVl apresentou diminuição no número de neurônios TPH-ir, nos pontos temporais 24 h e 28 dias. A quantificação neuroquímica dos níveis de 5-HT em estruturas-alvo da DRN e MRN, revelou que apenas no córtex pré-frontal e estriado ocorreu redução dos níveis da monoamina. A administração da rotenona não induziu à redução dos níveis de 5-HT na amígdala e no hipocampo. No geral, os resultados do trabalho revelaram que o desenvolvimento dos comprometimentos comportamentais está envolvido com o MRN. Além do papel da 5-HT analisado neste estudo, a disfunção de outros neurotransmissores como a DA e NA também são importantes nos distúrbios não motores no modelo animal da DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Núcleos da rafe. Serotonina. Depressão.  
Memória de curta duração.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized as a movement disorder. The main neuropathological hallmark of PD is the death of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc). However, the noradrenergic and serotonergic systems are also compromised, which contribute to the development of non-motor disorders, such as: cognitive impairment, anxiety and depression. The serotonergic system is composed by neurons of the raphe nuclei, mainly by the dorsal raphe nucleus (DRN) and the median raphe nucleus (MRN), responsible for the central biosynthesis of serotonin, and their efferents that send fibers to several brain areas. The aim of the present work was to investigate whether the rotenone model would be able to affect serotonergic neurons of the DRN and MRN and reduce serotonin levels in target structures related to depressive- and anxiety-like behaviors and short-term memory. To this end, adult male Wistar rats were randomly divided into two groups. The rotenone group received the neurotoxin at a dose of 2.5 mg/kg for 10 days. The control group received sunflower oil at a dose of 1.0 mL/kg. After 24 h from the end of the protocol, the animals presented hypolocomotion in the open field. This test was repeated at the time points 7, 14, 21 and 28 days, and spontaneous recovery of the locomotor function was observed. In addition, depressive-like behavior (anhedonia) was evaluated in the sucrose preference test, at 7, 14, 21 and 28 days. The results showed that the rotenone group exhibited high preference for sucrose and absence of anhedonic behavior. On the 22<sup>nd</sup> day, after the last administration of rotenone, the animals were submitted to the social recognition test, and they demonstrated short-term memory impairment. Furthermore, on the 22<sup>nd</sup> day, independent groups of animals were tested in the splash test. As in the sucrose preference, the results showed that the rotenone group did not exhibit anhedonic behavior. On the 25<sup>th</sup> day, the animals were submitted to the elevated plus maze. The results showed that the rotenone group did not present anxiety-like behavior. Finally, on the 28<sup>th</sup> day, the animals were submitted to the forced swim test, and the data showed that the rotenone group exhibited depressive-like behavior. Immediately after this test, the animals were euthanized for further analysis. Immunohistochemical analysis revealed that rotenone administration induced a partial lesion of SNpc, evidenced by a 20% reduction in TH-ir dopaminergic neurons. In addition, quantification of serotonergic neurons in the MRN revealed a significant decrease in the number of TPH-ir neurons only on the 28<sup>th</sup> day after the last administration of rotenone. Regarding the analysis of the sub-regions of DRN, only the DRVl sub-region showed a decrease in the number of TPH-ir neurons, at the time points 24 h and 28 days. Neurochemical quantification of 5-HT levels in target structures of DRN and MRN revealed that only in the prefrontal cortex and striatum there was a reduction in monoamine levels. Rotenone administration did not induce a reduction in 5-HT levels in the amygdala and hippocampus. Overall, the results of this study revealed that the development of behavioral impairments is involved with MRN. In addition to the role of 5-HT analyzed in this work, the dysfunction of other neurotransmitters such as DA and NA are also important in non-motor disorders in the animal model of PD.

Key-words: Parkinson's disease. Raphe nuclei. Serotonin. Depression. Short-term memory.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Representação esquemática da hipótese do trabalho.....	27
FIGURA 2 -	Fotomicrografias esquemáticas para ilustrar as sub-regiões nos diferentes níveis ao longo do eixo rostral-caudal.....	36
FIGURA 3 -	Delineamento do experimento 1.....	39
FIGURA 4 -	Delineamento do experimento 2.....	40
FIGURA 5 -	Delineamento do experimento 3.....	41
FIGURA 6 -	Avaliação da função locomotora no teste do campo aberto.....	43
FIGURA 7 -	Avaliação do comportamento tipo-depressivo no teste da preferência por sacarose.....	44
FIGURA 8 -	Avaliação do comportamento tipo-depressivo no <i>Splash test</i> ..	48
FIGURA 9 -	Avaliação do comportamento tipo-depressivo no teste da natação forçada.....	46
FIGURA 10 -	Avaliação do comportamento tipo-ansioso no teste do LCE....	48
FIGURA 11 -	Avaliação da memória de curta duração no teste de reconhecimento social.....	49
FIGURA 12 -	Avaliação da extensão da lesão induzida pela administração de rotenona através da imunorreatividade para TH.....	50
FIGURA 13 -	Avaliação do efeito da rotenona sobre os neurônios serotoninérgicos TPH-ir do DRN.....	52
FIGURA 14 -	Avaliação do efeito da rotenona sobre os neurônios serotoninérgicos TPH-ir do MRN.....	56
FIGURA 15 -	Avaliação do efeito da rotenona sobre os níveis de 5-HT no córtex pré-frontal, estriado, amígdala e hipocampo.....	58
FIGURA 16 -	Representação esquemática dos principais resultados do estudo.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	-	albumina de soro bovino ( <i>bovine serum albumin</i> )
CPF	-	córtex pré-frontal
DA	-	dopamina
DAB	-	3,3'-diaminobenzidina
DRN	-	núcleo dorsal da rafe ( <i>dorsal raphe nucleus</i> )
DRD	-	núcleo dorsal da rafe parte dorsal
DRC	-	núcleo dorsal da rafe parte caudal
DRI	-	núcleo dorsal da rafe parte interfascicular
DRV	-	núcleo dorsal da rafe parte ventral
DRVL	-	núcleo dorsal da rafe parte ventrolateral
DOPAC	-	ácido 3,4-diidroxifenilacético
DP	-	doença de Parkinson
EPM	-	erro padrão da média
5-HIAA	-	ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	-	5-hidroxitriptamina; serotonina
HPLC	-	cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HVA	-	ácido homovanílico
IHQ	-	imunohistoquímica
icv	-	intracerebroventricular
i.p	-	intraperitoneal
ir	-	imunorreativo
6-OHDA	-	6-hidroxidopamina
LCE	-	labirinto em cruz elevado
LCR	-	líquido cefalorraquidiano
MAO-B	-	monoamina oxidase B
MPTP	-	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MRN	-	núcleo mediano da rafe ( <i>median raphe nucleus</i> )
NA	-	noradrenalina
PAG	-	substância cinzenta periaquedutal ( <i>periaqueductal gray</i> )
PBS	-	<i>phosphate buffer saline</i>

REM	-	movimento rápido dos olhos ( <i>rapid eye movement</i> )
RID	-	<i>ratio of investigation duration</i>
SERT	-	transportador de serotonina ( <i>serotonin transporter</i> )
SNpc	-	substância negra parte compacta
SNC	-	sistema nervoso central
SNP	-	sistema nervoso periférico
TBS	-	<i>tris-buffered saline</i>
TH	-	tirosina hidroxilase
TPH	-	triptofano hidroxilase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	DOENÇA DE PARKINSON (DP).....	17
1.1.1	Características clínicas e neuropatológicas da DP.....	17
1.1.2	Etiologia da DP.....	18
1.1.3	Características clínicas da DP.....	19
1.1.4	Depressão na DP.....	19
1.1.5	Ansiedade na DP.....	21
1.1.6	Déficits cognitivos leves na DP.....	21
1.2	SISTEMA SEROTONÉRGICO.....	22
1.2.1	Núcleo dorsal da rafe (DRN).....	23
1.2.2	Núcleo mediano da rafe (MRN).....	24
1.3	ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONÉRGICO NA DP.....	24
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
4.1	ANIMAIS.....	29
4.2	DROGAS E SOLUÇÕES.....	29
4.3	MODELO DA ROTENONA – INDUÇÃO DA LESÃO PARCIAL DA SNpc.....	29
4.4	PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS.....	30
4.4.1	Teste do campo aberto.....	30
4.4.2	Teste da preferência por sacarose.....	30
4.4.3	<i>Splash test</i> .....	31
4.4.4	Teste da natação forçada.....	32
4.4.5	Teste do labirinto em cruz elevado.....	32
4.4.6	Teste de reconhecimento social.....	33
4.5	COLETA E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS.....	34
4.6	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH) E TRIPTOFANO HIDROXILASE (TPH).....	34

4.7	QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS TH E TPH-IMUNORREATIVOS.....	35
4.8	DOSAGEM DOS NÍVEIS DE SEROTONINA (5-HT) NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, ESTRIADO, HIPOCAMPO E AMÍGDALA.....	36
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>5</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>38</b>
5.1	EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA, OS COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVOS, A MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO, E SOBRE AS VIAS SEROTONÉRGICAS.....	38
5.2	EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA, OS COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVOS E TIPO-ANSIOSO, E SOBRE AS VIAS SEROTONÉRGICAS.....	39
5.3	EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA, OS COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVOS, E SOBRE AS VIAS SEROTONÉRGICAS.....	40
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
6.1	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO LOCOMOTORA NO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	42
6.2	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO.....	44
6.2.1	Teste da preferência por sacarose.....	44
6.2.2	<i>Splash test</i> .....	45
6.2.3	Teste da natação forçada.....	45
6.3	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO.....	47
6.3.1	Teste do labirinto em cruz elevado (LCE).....	47
6.4	AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO.....	48
6.4.1	Teste de reconhecimento social.....	48
6.5	AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA LESÃO DA SNpc POR QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH).....	49



6.6	QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS SEROTONÉRGICOS IMUNORREATIVOS PARA TRIPTOFANO HIDROXILASE (TPH-ir)....	51
6.6.1	Neurônios TPH-ir no núcleo dorsal da rafe (DRN).....	51
6.6.2	Neurônios TPH-ir no núcleo mediano da rafe (MRN).....	55
6.7	QUANTIFICAÇÃO NEUROQUÍMICA DOS NÍVEIS DE 5-HT NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, ESTRIADO, AMÍGDALA E HIPOCAMPO POR HPLC.....	57
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	59
8	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	70
9	<b>CONCLUSÃO</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez pelo inglês James Parkinson há cerca de 200 anos no seu manuscrito *An Essay on the Shaking Palsy* (PARKINSON, 1817). Atualmente, a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente depois da doença de Alzheimer, e dados epidemiológicos mostram que no ano de 2016, cerca de 6 milhões de pessoas possuíam o diagnóstico para a doença (DORSEY et al., 2018). A incidência e a prevalência da DP aumentam de acordo com o avanço da idade, afetando 1% da população de 60 a 69 anos, e em torno de 4% em idosos com mais de 80 anos (PRINGSHEIM et al., 2014; HIRSCH et al., 2016; TYSNES e STORSTEIN, 2017). Além disso, a incidência da DP é cerca de 1,5 vezes maior nos homens em relação às mulheres (HIRSCH et al., 2016).

### 1.1.1 Características neuropatológicas da DP

A DP é uma doença neurodegenerativa, crônica e progressiva, caracterizada pela perda gradual dos neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta (SNpc), com a diminuição dos níveis estriatais de dopamina (DA) (MÜLLER et al., 2013; GIGUÈRE et al., 2018). Além disso, outra importante característica neuropatológica é a formação dos corpúsculos de Lewy, presentes no corpo celular e nas projeções dos neurônios sobreviventes (GOEDERT et al., 2017; BURRÉ et al., 2018; ROUAUD et al., 2021). Os corpúsculos de Lewy são formados por agregados intracitoplasmáticos, principalmente, da proteína  $\alpha$ -sinucleína, ubiquitina, neurofilamentos e lipídios (GOEDERT et al., 2017; BURRÉ et al., 2018; FARES et al., 2021). Apesar de a neurodegeneração dopaminérgica da SNpc ser a principal característica neuropatológica da DP, a neurodegeneração e os corpúsculos de Lewy podem ser encontrados em outras regiões encefálicas. Regiões como o *locus coeruleus*, núcleo dorsal da rafe, núcleo basal de Meynert, núcleo motor dorsal do nervo vago, córtices cingulado e entorrinal, bulbo olfatório e sistema nervoso autônomo estão afetadas no decorrer da progressão da DP (OBESO et al., 2014; GIGUÈRE et al., 2018; FARES et al., 2021). De acordo com a hipótese de Braak dos estágios da DP, as alterações neuropatológicas iniciariam no bulbo olfatório e no plexo

entérico, e a partir deste local, através do nervo vago, os agregados de  $\alpha$ -sinucleína atingiriam outras estruturas, tais como tronco encefálico, mesencéfalo, sistema límbico e córtex (BRAAK et al., 2003; HAWKES et al., 2010; HIJAZ e VOLPICELLI-DALEY, 2020). Ademais, estudos sugerem que os agregados de  $\alpha$ -sinucleína atingem o cérebro de uma maneira temporal e espacial. Nesse sentido, no estágio 1 da DP, as alterações neuropatológicas ascendem a partir do plexo entérico, afetando o núcleo motor dorsal do nervo vago. A partir do estágio 2, as alterações ocorrem no complexo coeruleus e núcleo da rafe, e no estágio 3 há o envolvimento da SNpc, amígdala e núcleo basal de Meynert. Além disso, no estágio 3, em que ocorre o comprometimento da SNpc, aparecem os primeiros sinais motores, e o diagnóstico clínico da DP (BRAAK et al., 2003; HAWKES et al., 2010; SURMEIER et al., 2017; KIM et al., 2019). Dessa forma, a hipótese de Braak também postula que o sistema ou área afetada corresponderia com o aparecimento dos distúrbios motores, psiquiátricos e cognitivos (BRAAK et al., 2003). Por exemplo, as alterações neuropatológicas nos neurônios do núcleo da rafe têm início no estágio 2, as quais precedem as alterações na SNpc durante o estágio 3. E a perda dos neurônios serotoninérgicos anterior aos neurônios dopaminérgicos poderia explicar, parcialmente, a ocorrência da depressão na fase pré-motora ou prodrômica da DP (HUOT e FOX, 2013; WILSON et al., 2019).

### 1.1.2 Etiologia da DP

Os processos neurodegenerativos que levam à DP têm início muitos anos antes do surgimento dos sinais motores característicos. As causas da DP ainda não estão totalmente elucidadas, entretanto estudos sugerem que múltiplos fatores contribuem para o desenvolvimento da doença. O envelhecimento é considerado o maior fator de risco, cujo aumento da incidência da doença acompanha o aumento da idade (1% para 60 anos e 4% para 80 anos). Além disso, fatores ambientais como vida rural, exposição a agrotóxicos (paraquat, rotenona), e a susceptibilidade genética (genes DJ-1, LRRK2, Nurr1, Parkin, PINK1) também são fatores de risco para a DP (REEVE et al., 2014; BELLOU et al., 2016; BALL et al., 2019; BLAUWENDRAAT et al., 2019). Dessa forma, tem sido proposto que estes fatores de risco podem atuar através de vários mecanismos para o desenvolvimento da DP, tais como: estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, inflamação, excitotoxicidade, e agregação proteica (TANSEY e

GOLDBERG, 2011; JIANG et al., 2016; CALABRESE et al., 2018; ESTEVES e CARDOSO, 2020).

### 1.1.3 Características clínicas da DP

A DP é considerada uma desordem motora, em que os pacientes apresentam sinais clássicos como tremor em repouso, rigidez, e lentificação dos movimentos (MU et al., 2017; GIGUÈRE et al., 2018). Os primeiros sinais motores aparecem quando cerca 80% da DA estriatal (dorsolateral) está depletada, e 60% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc estão destruídos (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; SCHAPIRA et al., 2017; GÓMEZ-BENITO et al., 2020). Entretanto, distúrbios não motores estão presentes em todas as fases da doença, e são responsáveis pela piora na qualidade de vida dos pacientes. Por exemplo, na fase prodrômica – antes do aparecimento dos sinais motores – os pacientes podem desenvolver constipação, distúrbios do sono REM (do inglês: *Rapid Eye Movement*: "Movimento Rápido dos Olhos"), hiposmia (déficit olfatório), ansiedade e depressão (SCHAPIRA et al., 2017; TITOVA et al., 2017; TRONCOSO-ESCUADERO et al., 2018). Somado a esses distúrbios, os pacientes ainda podem apresentar prejuízo cognitivo, dor, psicose, e desordens de impulsividade e compulsividade (CHAUDHURI e SCHAPIRA, 2009; SCHAPIRA et al., 2017). As manifestações não motoras ocorrem nas fases avançadas e iniciais da DP, e alguns destes podem preceder, em torno de 20 a 10 anos, os sinais motores, como o déficit olfatório, os distúrbios do sono REM, e a depressão (CHAUDHURI e SCHAPIRA, 2009; HAWKES et al., 2010; MAGNARD et al., 2016).

### 1.1.4 Depressão na DP

A depressão é o distúrbio neuropsiquiátrico mais importante e frequente, ocorrendo em torno de 35% a 50% dos pacientes com DP (BROEN et al., 2016; POEWE et al., 2017). A prevalência da depressão pode variar consideravelmente, pois o diagnóstico nos pacientes com DP é, muitas vezes, confundido com outras manifestações, como a lentificação motora, a fadiga, e a diminuição da expressão vocal (POLITIS e NICCOLINI, 2015; TOOMSOO et al., 2017). Na depressão associada à DP, os pacientes, geralmente, apresentam mais episódios de apatia e

anedonia, em relação ao transtorno depressivo maior (SCHAPIRA et al., 2017). Os sintomas psiquiátricos têm maior impacto no bem-estar, em comparação aos sinais motores, e uma importante diminuição da qualidade de vida (BROEN et al., 2016; POEWE et al., 2017). A depressão pode surgir ainda na fase prodrômica, ou seja, antes mesmo do aparecimento dos sinais motores e do diagnóstico da DP (MARSH, 2013; SCHAPIRA et al., 2017). Ademais, o surgimento e a história natural da depressão não ocorrem em paralelo ao curso do comprometimento motor na DP (HUSTAD e AASLY, 2020).

A fisiopatologia da depressão na DP é complexa e ainda não está esclarecida. Estudos sugerem que uma maior incidência de depressão em pacientes que posteriormente foram diagnosticados com DP pode corroborar a hipótese de haver um fator de risco para depressão nesses pacientes (LEENTJENS et al., 2003). Dessa forma, uma hipótese sugere que a neurodegeneração crônica da DP leva à redução dos níveis de monoaminas, como a DA, a serotonina (5-HT) e a noradrenalina (NA), e que pode ser a causa da depressão nos pacientes (AARSLAND et al., 2012; LIAN et al., 2019). O envolvimento dos núcleos da rafe e do *locus coeruleus* no estágio 2 de Braak pode indicar a depressão como um distúrbio da fase prodrômica da DP (HUSTAD e AASLY, 2020).

Outras hipóteses estão sendo investigadas para tentar elucidar os mecanismos que levam à depressão na DP. A hipótese inflamatória da depressão sugere que a inflamação crônica pode ser um dos processos patológicos da depressão associada à DP (CURRIER e NEMEROFF, 2010; MILLER e RAISON, 2016; LIAN et al., 2020).

O papel do sistema serotoninérgico na fisiopatologia da depressão está relacionado com resultados de estudos em humanos, os quais mostravam que os sintomas depressivos eram induzidos pela depleção de triptofano, e em contrapartida, os sintomas eram atenuados com o tratamento com inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (POLITIS e NICCOLINI, 2015). Além disso, estudos demonstraram que as alterações no sistema serotoninérgico eram mais acentuadas em pacientes com DP e depressão, em relação aos pacientes parkinsonianos sem depressão, como uma maior perda de neurônios no núcleo dorsal da rafe, e níveis mais baixos do metabólito de 5-HT, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), no líquido cefalorraquidiano (LCR) (DJAMSHIDIAN e FRIEDMAN, 2014).

### 1.1.5 Ansiedade na DP

Os transtornos de ansiedade, assim como a depressão, impactam negativamente a qualidade de vida dos pacientes com DP. O diagnóstico da ansiedade nestes pacientes pode variar, pois os sintomas podem ser confundidos com outras comorbidades, e o transtorno pode ser acompanhado ou não do distúrbio depressivo. Estimativas indicam que a ansiedade pode afetar cerca de 25% a 50% dos pacientes com DP (SCHAPIRA et al., 2017; SCHRAG e TADDEI, 2017). No geral, os pacientes podem apresentar ansiedade generalizada, crises de pânico e fobias sociais, refletidas na presença de medo, preocupação ou apreensão (KANO et al., 2011; PREDIGER et al., 2012; SCHAPIRA et al., 2017). Ainda, as principais manifestações observadas nestes pacientes incluem incapacidade para relaxar, inquietação, preocupação exagerada, palpitações, falta de ar e desconforto gástrico (DUJARDIN e SGAMBATO, 2020).

Assim como a depressão, a fisiopatologia da ansiedade na DP não está totalmente esclarecida, e esses transtornos de ansiedade podem surgir antes mesmo dos sinais motores clássicos da DP. Dessa forma, outros sistemas de neurotransmissão, além do dopaminérgico, como o noradrenérgico e o serotoninérgico, poderiam estar envolvidos no desenvolvimento da ansiedade (SCHAPIRA et al., 2017). Os neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe enviam projeções para estruturas corticais e límbicas envolvidas no controle da ansiedade. Além disso, estudos indicaram que a disfunção do sistema serotoninérgico leva ao desenvolvimento dos transtornos de ansiedade (PREDIGER et al., 2012). Estudos de neuroimagem sugerem o envolvimento de estruturas como estriado, amígdala, substância cinzenta periaquedutal (PAG), e córtices cingulado e orbitofrontal em pacientes com DP (VRIEND et al., 2016; WEE et al., 2016).

### 1.1.6 Déficits cognitivos leves na DP

Os prejuízos cognitivos são altamente prevalentes nos pacientes com DP, em especial naqueles pacientes com depressão (CHEN et al., 2016), e ocorrem nas fases iniciais da DP, podendo progredir para a demência e psicose nas fases mais tardias da doença (CHIARAVALLOTI et al., 2014). Estudos mostram que cerca de 25% a 30% dos pacientes com DP apresentam prejuízo cognitivo leve, e os déficits impactam a

memória de procedimentos, as funções executivas, as habilidades visuoespaciais, a memória operacional e a atenção (BIUNDO et al., 2016). Os prejuízos cognitivos (mesmo os de intensidade leve) contribuem para a piora na qualidade de vida e para a eventual necessidade de cuidadores para esses pacientes (WEINTRAUB et al., 2016, AARSLAND et al., 2021). Além disso, estudos com pacientes parkinsonianos deprimidos e não deprimidos mostraram que havia prejuízo cognitivo em ambos os grupos, entretanto o prejuízo foi significativamente mais acentuado em pacientes com DP e depressão (STARKSTEIN et al., 1990).

Os mecanismos envolvidos nos prejuízos cognitivos variam de acordo com o grau de severidade. No prejuízo leve, estudos sugerem que a degeneração da via nigroestriatal, principalmente no núcleo caudado dorsal, está associada a este prejuízo (AARSLAND et al., 2021). Ainda, estudos de imagem demonstraram que pacientes com DP e prejuízo cognitivo leve apresentaram diminuição de volume no hipocampo, putâmen, globo pálido, amígdala e ínsula (WEINTRAUB et al., 2011). De modo geral, pacientes que recebem tratamento com levodopa não possuem uma resposta adequada em relação à melhora dos prejuízos cognitivos. Nesse sentido, sugere-se que não apenas a via dopaminérgica está envolvida, mas outros neurotransmissores, como a NA e a 5-HT, são importantes para a melhor função cognitiva (BIUNDO et al., 2016).

## 1.2 SISTEMA SEROTONÉRGICO

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor amplamente distribuído pelo sistema nervoso central (SNC). Por sua ampla distribuição, a 5-HT influencia vários processos fisiológicos e comportamentais, tais como: ingestão alimentar, ciclo sono-vigília, controle de temperatura corporal, comportamento sexual, controle motor, interações sociais, cognição, memória e aprendizado, humor e emoção (SOIZAREILLY e COMMONS, 2014; MUZERELLE et al., 2016; BACQUÉ-CAZENAVE et al., 2020; POURHAMZEH et al., 2021). Ademais, a disfunção do sistema serotonérgico leva ao desenvolvimento de desordens psiquiátricas – transtorno depressivo maior, transtornos de ansiedade –, déficits de memória e aprendizado, distúrbios do sono, estresse, autismo, esquizofrenia, além de implicações nos distúrbios não motores e motores da DP (WASELUS et al., 2011; POLITIS e NICCOLINI, 2015; HUANG et al., 2019; POURHAMZEH et al., 2021).

É importante ressaltar que a 5-HT está presente tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP). No SNP, a 5-HT é sintetizada nas células enterocromafins no intestino e nos neurônios localizados no plexo entérico, correspondendo a 95% dos níveis de 5-HT. Os 5% restantes são sintetizados no SNC nos neurônios serotoninérgicos localizados nos núcleos da rafe no tronco encefálico (POURHAMZEH et al., 2021). A biossíntese da 5-HT ocorre a partir do aminoácido L-triptofano, derivado da dieta, e este é convertido em 5-hidroxitriptofano, através da isoforma 2 da enzima triptofano hidroxilase (TPH) (enzima passo-limitante). Na segunda etapa da biossíntese, há a conversão do 5-hidroxitriptofano em 5-hidroxitriptamina (5-HT), através de uma descarboxilase de aminoácido aromático (HASEGAWA e NAKAMURA, 2010; HUOT et al., 2011; POURHAMZEH et al., 2021).

Nos mamíferos, os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos que sintetizam a 5-HT fazem parte de um complexo grupo de neurônios, divididos em *clusters*. Através do emprego de técnicas de rastreamento e fluorescência, estudos em roedores identificaram grupos de neurônios organizados topograficamente e com projeções distintas. Dessa forma, os núcleos da rafe (a partir da formação reticular do tronco encefálico) foram divididos em 9 subdivisões: núcleo pálido da rafe (B1); núcleo obscuro da rafe (B2); núcleo B3; núcleo supragenua (B4); núcleo mediano da rafe (B5 e B8); núcleo dorsal da rafe (B6 e B7); e núcleo pedúnculo pontino da rafe (B9) (COMMONS, 2016; MUZERELLE et al., 2016; SOIZA-REILLY e GASPARI, 2020). Como mencionado, os núcleos da rafe compõem vários grupos de neurônios, entretanto os mais importantes núcleos envolvidos na neurotransmissão serotoninérgica são o núcleo dorsal da rafe (DRN) e o núcleo mediano da rafe (MRN).

### 1.2.1 Núcleo dorsal da rafe (DRN)

O DRN é uma estrutura bilateral e heterogênea, localizado no mesencéfalo e na ponte, e designado como as subdivisões B6 e B7. Os neurônios do DRN representam em torno de 50% dos neurônios serotoninérgicos, e estes enviam projeções para diversas outras estruturas no cérebro (LOWRY et al., 2008; MICHELSEN et al., 2008; HALE e LOWRY et al., 2011; WASELUS et al., 2011; HUANG et al., 2019). As células presentes no DRN são diferentes na sua morfologia e, em ratos, podem ser caracterizadas em células pequenas e arredondadas, médias e fusiformes, grandes e fusiformes, e muito grandes e multipolares (LOWRY et al.,



2008; MICHELSEN et al., 2008). Além disso, no DRN existem neurônios dopaminérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos e peptidérgicos (neuropeptídeo Y, substância P) (MICHELSEN et al., 2008; HUANG et al., 2019).

Com base em sua heterogeneidade, o DRN pode ser dividido topograficamente em sub-regiões, em que os neurônios recebem aferências de estruturas específicas do cérebro e tronco encefálico e enviam projeções para estruturas, como córtex pré-frontal, estriado, amígdala e hipocampo ventral (HALE e LOWRY et al., 2011; WASELUS et al., 2011; HUANG et al., 2019). Por isso, é importante distinguir a organização da DRN para compreender o papel da 5-HT no desenvolvimento de distúrbios não motores. Dessa maneira, o DRN, em roedores, pode ser dividido ao longo de seu eixo rostral-caudal em sub-regiões nos níveis rostral, medial e caudal. As cinco sub-regiões são denominadas dorsal, ventral, ventrolateral, caudal e interfascicular (BOUWKNECHT et al., 2007; MICHELSEN et al., 2008; MUZERELLE et al., 2016).

### 1.2.2 Núcleo mediano da rafe (MRN)

O MRN é um núcleo distinto localizado na parte dorsal da ponte, e é considerado o segundo maior local de corpos celulares serotoninérgicos, os quais enviam projeções para o hipotálamo, hipocampo dorsal e septo medial (HENSLENER, 2006; LOWRY et al., 2008; MUZERELLE et al., 2016). De acordo com a designação dos grupos celulares, o MRN é denominado pelas subdivisões B5 e B8 (MUZERELLE et al., 2016).

Os neurônios serotoninérgicos localizados no MRN são células pequenas e elípticas, ou ainda, fusiformes e de tamanho médio. De forma geral, os dendritos possuem direção rostral-caudal (LOWRY et al., 2008). O principal neurotransmissor do MRN é a 5-HT, entretanto este núcleo também possui populações de neurônios dopaminérgicos, noradrenérgicos, GABAérgicos e peptidérgicos (LI et al., 2005; LOWRY et al., 2008).

## 1.3 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONÉRGICO NA DP

A disfunção da transmissão serotoninérgica tem sido implicada em alguns distúrbios não motores da DP, como depressão, ansiedade e comprometimento

cognitivo leve, que têm grande impacto na qualidade de vida dos pacientes (GROSCH et al., 2016; BARONE et al., 2017; KURIHARA et al., 2020). Vários estudos demonstraram que alterações nos núcleos de rafe estão associadas à patogênese da depressão e ansiedade em pacientes com DP (PAULUS e JELLINGER, 1991; QAMHAWI et al., 2015; MAILLET et al., 2016; TOOMSOO et al., 2017; PASQUINI et al., 2019).

Investigações *post-mortem* demonstraram que a perda de neurônios serotoninérgicos no DRN é mais acentuada em pacientes com DP e depressão, do que em pacientes com DP não deprimidos (PAULUS e JELLINGER, 1991). Além disso, os neurônios serotoninérgicos no MRN são mais afetados em pacientes com DP quando comparados a voluntários saudáveis (HALLIDAY et al., 1990). Ainda, estudos sugerem uma redução nos níveis de triptofano hidroxilase (TPH), bem como nos níveis da proteína SERT (transportador de serotonina) em estruturas que recebem projeções da rafe, estriado, sistema límbico e córtex de pacientes com DP (KISH et al., 2008). Outros dados de análises neuroquímicas demonstraram uma redução significativa dos níveis de 5-HT e 5-HIAA no LCR de pacientes com DP, em comparação à voluntários sadios (OLIVOLA et al., 2014).

Estudos com modelos animais da DP buscam relacionar a neurodegeneração nigroestriatal e seu impacto no sistema serotoninérgico. Os resultados demonstram que ratos com lesões intranigrais induzidas por toxinas como 6-OHDA, MPTP e rotenona apresentam redução nos níveis hipocámpais de 5-HT. Ademais, os níveis de 5-HT no hipocampo e os níveis de DA no estriado correlacionaram-se negativamente com o comportamento tipo-depressivo dos animais lesados (SANTIAGO et al., 2010; 2014). Estes estudos buscaram quantificar os níveis de 5-HT no hipocampo e limitaram-se a analisar a extensão da morte dos neurônios dopaminérgicos no SNpc. No entanto, poucos estudos avaliaram o efeito da lesão nigroestriatal sobre os neurônios serotoninérgicos dos núcleos de rafe. Berghauzen-Maciejewska et al. (2016) demonstraram em ratos 6-OHDA que a lesão intraestriatal causou a perda de neurônios dopaminérgicos no DRN. Entretanto, não foi observada uma redução no número de neurônios serotoninérgicos, quando comparada ao grupo controle. Por outro lado, Shin et al. (2017) mostraram que a administração sistêmica de rotenona levou a um menor número de células TPH-positivas, e uma redução da regulação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no DRN.

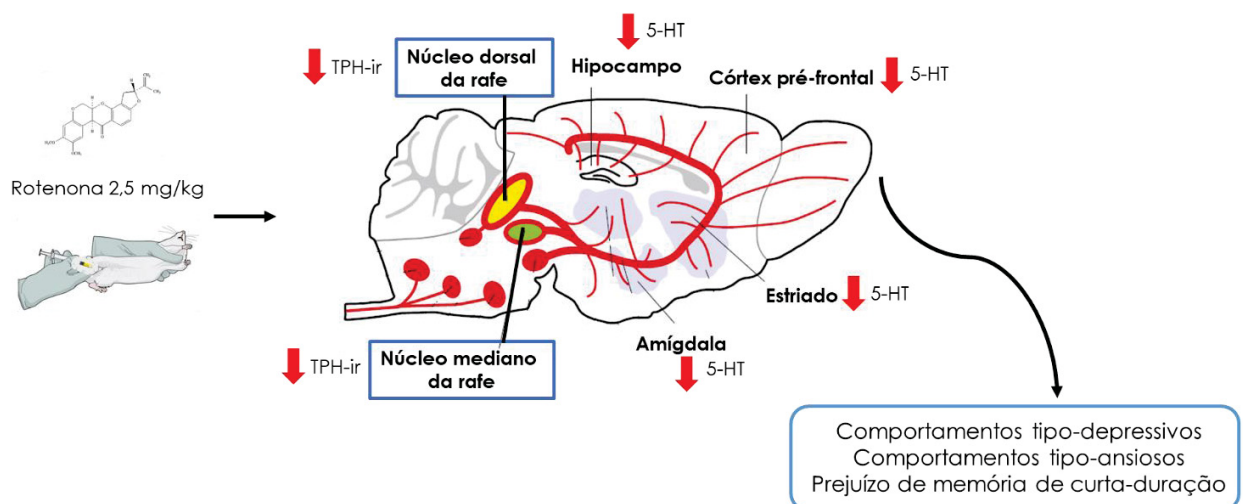
Considerando a inconsistência dos resultados e a relevância da disfunção do sistema serotoninérgico em distúrbios não motores da DP, buscou-se investigar se a exposição à rotenona é capaz de afetar os neurônios serotoninérgicos nos núcleos dorsal e mediano do rafe, e avaliar se os níveis de serotonina são reduzidos em estruturas de projeção relacionadas aos comportamentos depressivo e ansioso e à memória de curto duração.

## 2 HIPÓTESE

Os neurônios serotonérgicos projetam para várias estruturas cerebrais, como o córtex pré-frontal, o estriado, o hipocampo e a amígdala. Estas áreas são responsáveis pela geração e expressão de funções relacionadas à memória e aprendizado, e estados afetivos e motivacionais. Desta forma, a serotonina é considerada um importante neuromodulador nas áreas acima mencionadas.

A hipótese do presente trabalho é que o modelo animal da DP induzido por rotenona pode afetar os neurônios serotonérgicos, ao reduzir o número de neurônios imunorreativos para TPH nos núcleos dorsal e mediano da rafe. E, como consequência, há diminuição dos níveis de serotonina em estruturas-alvo como córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e amígdala, levando ao desenvolvimento de comportamentos tipo-depressivos e tipo-ansiosos e prejuízo da memória de curta duração em ratos.

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA HIPÓTESE DO TRABALHO



FONTE: Adaptado de LESCH e WAIDER (2012).  
 TPH-ir: triptofano hidroxilase imunorreativo; 5-HT: serotonina.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o modelo da rotenona é capaz de afetar os neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsal e mediano da rafe, e avaliar se ocorre redução dos níveis de serotonina em estruturas-alvo relacionadas com os comportamentos tipo-depressivos e tipo-ansiosos e a memória de curta-duração.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da administração sistêmica de rotenona sobre a função locomotora no teste do campo aberto.
- Avaliar se a administração sistêmica de rotenona induz comportamentos tipo-depressivos avaliados nos testes da preferência por sacarose, *Splash test* e natação forçada.
- Avaliar se a administração sistêmica de rotenona induz comportamentos tipo-ansiosos avaliados no labirinto em cruz elevado.
- Avaliar se a administração sistêmica de rotenona leva ao prejuízo da memória de curta duração, avaliado no teste de reconhecimento social.
- Avaliar a extensão da lesão dos neurônios dopaminérgicos da SNpc induzida pela administração da rotenona, através da imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH).
- Avaliar o efeito da administração sistêmica de rotenona sobre os neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsal e mediano da rafe, através da imunorreatividade para triptofano hidroxilase (TPH).
- Avaliar o efeito da administração sistêmica de rotenona sobre os níveis de serotonina e metabólitos no córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e amígdala, através da análise neuroquímica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

No estudo foram utilizados ratos Wistar machos adultos, de aproximadamente 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pesando entre 300 e 320 g no início dos experimentos. Exclusivamente para o teste de reconhecimento social, foram utilizados ratos Wistar machos jovens com 30 dias de idade, como estímulo de investigação pelos ratos adultos. Os animais foram mantidos em grupos de 4 em caixas-moradia de polipropileno, em sala com temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12 horas – luzes acesas às 7 horas. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Todos os esforços possíveis foram tomados a fim de minimizar o número de animais usados e o sofrimento destes durante os procedimentos experimentais. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UFPR, sob número de protocolo 1154, e os experimentos foram conduzidos de acordo com a Lei Arouca – nº 11.794/8 de 8 de outubro de 2008.

### 4.2 DROGAS E SOLUÇÕES

- Rotenona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 2,5 mg/kg.
- Óleo de girassol (veículo da rotenona) a 1 mL/kg.

### 4.3 MODELO DA ROTENONA – INDUÇÃO DA LESÃO PARCIAL DA SNpc

A rotenona é um pesticida lipofílico e que, facilmente, atravessa a barreira hematoencefálica. Uma vez na célula, a rotenona tem a capacidade de diminuir a atividade do complexo I da mitocôndria, levando ao prejuízo da síntese de ATP (adenosina trifosfato) e aumento das espécies reativas de oxigênio. A administração crônica e sistêmica de rotenona é capaz de causar uma degeneração progressiva e seletiva da via dopaminérgica nigroestriatal (BETARBET et al., 2000; SHERER et al., 2003; HEINZ et al., 2017). Para este trabalho, utilizamos um protocolo para indução de uma lesão parcial na SNpc, validado por Morais et al. (2012). Além disso, a dose empregada de rotenona demonstrou ser efetiva em promover distúrbios motores e

não-motores associados a uma taxa relativamente baixa de mortalidade (aproximadamente 22%) (MORAIS et al., 2012; BASSANI et al., 2014). No procedimento para indução da lesão, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: rotenona e controle. O grupo rotenona recebeu de forma sistêmica, por via intraperitoneal (i.p), o pesticida na dose de 2,5 mg/kg dissolvida em óleo de girassol para obter a concentração de 2,5 mg/mL. O grupo controle recebeu o veículo óleo de girassol na dose de 1 mL/kg via i.p. A administração de rotenona ou veículo foi realizada por 10 dias consecutivos, com uma única aplicação diária, entre 10 h e 11 h.

#### 4.4 PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

##### 4.4.1 Teste do campo aberto

O campo aberto consiste em uma arena circular (97 cm de diâmetro x 42 cm de altura) dividido em três linhas concêntricas, e subdividido em 19 quadrantes. Cada animal foi colocado na área central e deixado explorar livremente o aparato durante 5 minutos. Três parâmetros para avaliar a atividade locomotora foram mensurados e analisados: distância percorrida (distância em metros que o animal percorrerá durante o teste); velocidade (velocidade média de locomoção em metros/segundo desenvolvida); e número de cruzamentos (cruzar de uma área à outra, com as quatro patas). A cada troca de animal, o aparato foi limpo com solução de etanol 5% (v/v), para eliminar odores deixados pelo animal testado anteriormente. O teste foi filmado e analisado com o software *ANY-maze Video Tracking System* (Wood Dale, IL, EUA).

##### 4.4.2 Teste da preferência por sacarose

O teste da preferência por sacarose é utilizado como uma medida de anedonia em roedores, caracterizada pela diminuição da preferência por uma solução de sacarose (STREKALOVA et al., 2004). Inicialmente, os animais foram habituados a beber de duas garrafas de água, por três dias. O teste basal foi realizado 5 dias antes do início das administrações de rotenona. Os ratos foram separados individualmente em gaiolas contendo divisórias, sendo apresentadas duas garrafas previamente pesadas, uma contendo água de torneira e outra com 1% de solução de sacarose.

Durante este teste, os ratos receberam por 24 h, duas garrafas – com livre escolha – uma garrafa contendo solução de sacarose 1%, e a outra contendo apenas água de torneira. As garrafas foram pesadas antes do teste e 24 h depois. Para evitar possíveis vieses de preferência de lado, as garrafas foram trocadas de lado depois de 12 h. Os animais não sofreram quaisquer privações de água e comida. A diferença de peso entre as garrafas foi considerada como a quantidade de líquido ingerido por cada rato. A soma da água com a solução de sacarose 1% ingerida foi definida como a ingestão total. A porcentagem de ingestão de sacarose foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ preferência de sacarose} = \frac{\text{ingestão sacarose}}{\text{ingestão total}} \times 100$$

A redução da preferência por sacarose é sugestiva de um comportamento tipo depressivo (STREKALOVA et al., 2004; SANTIAGO et al., 2015).

#### 4.4.3 *Splash test*

O paradigma do *Splash test* consiste em borrifar uma solução a 10% de sacarose no pelo de um roedor. Em consequência da viscosidade e do sabor palatável da solução aplicada, os animais iniciam comportamentos de autolimpeza a fim de limpar o pelo que está sujo. Estes comportamentos são utilizados como um índice de motivação e autocuidado, e podem ser um indicador de anedonia (ISINGRINI, et al., 2010; OLESCOWICZ et al., 2018). Para a realização do teste, os animais foram isolados e mantidos sozinhos numa caixa-moradia com antecedência de 24 h ao experimento comportamental. Além disso, no dia do teste, os animais foram acomodados por aproximadamente 30 minutos na sala de experimentação com iluminação a 10 lux. Com o auxílio de um borrifador, foram aplicados 3 jatos de uma solução de sacarose a 10% sobre o dorso do rato. Após a aplicação da solução foram gravados e mensurados por 5 minutos: (i) o tempo total gasto no comportamento de autolimpeza (*grooming*), (ii) a latência para o primeiro movimento de autolimpeza, e (iii) o número total de limpezas (*grooms*). Foram considerados como comportamentos de autolimpeza: movimentos do focinho e face, movimentos acima da cabeça e atrás das orelhas, e lambedura do pelo do corpo (YALCIN et al., 2005).



#### 4.4.4 Teste da natação forçada

A natação forçada é um teste comportamental utilizado para avaliar o comportamento tipo-depressivo de roedores, e avaliar o efeito terapêutico de drogas antidepressivas. Os ratos são colocados em um tanque cheio de água, de onde os animais não conseguem escapar. A mobilidade dos animais dentro do tanque está relacionada com uma tentativa de escapar (SLATTERY e CRYAN, 2012).

O teste consistiu em duas sessões. A primeira é uma sessão treino onde os animais foram colocados e mantidos por 15 min. em um tanque cilíndrico de policloreto de polivinila (PVC) com dimensões de 25 cm de diâmetro e 60 cm de altura, preenchido com água na temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  a uma profundidade de 25 cm, a qual não permite que os ratos toquem o fundo do tanque. Após 24 h da primeira sessão, os animais foram novamente colocados no tanque por 5 min., e seu comportamento monitorado por uma câmera localizada acima do tanque. A avaliação do comportamento incluiu: o tempo de natação (definido como movimentos horizontais, no qual o animal realiza movimentos circulares), o tempo de imobilidade (verificada quando não existe nenhum movimento adicional além daqueles necessários para manter a cabeça do animal fora da água) e o tempo de escalada (que consiste em movimentos verticais, no qual o animal tenta com as patas dianteiras escalar as paredes do cilindro). A água foi trocada entre um treino/teste dos animais, a fim de evitar a influência de temperatura e de substâncias deixadas pelo rato anterior. Os resultados foram expressos em segundos (s) (SANTIAGO et al., 2010).

#### 4.4.5 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos ( $50 \times 10 \times 0.75$  cm; cada braço) e dois braços fechados ( $50 \times 10 \times 40$  cm; cada braço), dispostos de forma que dois pares de braços idênticos fiquem em oposição entre si. Os braços partem de uma plataforma central ( $10 \times 10$  cm), e o aparato, como um todo, está a uma altura de 50 cm acima do chão. Os experimentos foram conduzidos sob intensidade luminosa de 30 lux. Para o teste, o rato foi colocado na plataforma central, posicionado de frente para um braço aberto. Após 5 min de teste, o rato foi retirado e o aparato foi higienizado com uma solução água-etanol a 5%. O comportamento tipo-ansioso foi avaliado de acordo com os seguintes parâmetros comportamentais: porcentagem de

entrada nos braços abertos (% entrada: entrada braços abertos/total entradas×100) e porcentagem de tempo nos braços abertos. Ambas medidas são inversamente relacionadas com o nível de ansiedade nos ratos. Além disso, a atividade locomotora dos animais no labirinto foi analisada pelos parâmetros: número de entradas nos braços fechados e número total de entradas. Os movimentos do animais foram gravados e analisados pelo software *ANY-maze Video Tracking System* (Wood Dale, IL, EUA).

#### 4.4.6 Teste de reconhecimento social

A memória de curta-duração foi avaliada através do teste de reconhecimento social, descrito por Dantzer et al. (1987), e padronizado por Prediger et al. (2004). Este teste foi escolhido por ser de procedimento simples e ser etologicamente relevante. Além disso, o teste de reconhecimento social é similar à memória declarativa que está prejudicada em pacientes com DP e prejuízo cognitivo leve (DANTZER et al., 1987; STEFANOVA et al., 2001). Nos roedores, a memória social é, de forma geral, formada a partir de pistas olfatórias (PREDIGER et al., 2004).

O teste é baseado no comportamento de ratos machos adultos que despendem considerável tempo investigando ratos juvenis não familiares. Por outro lado, ratos reexpostos ao mesmo rato jovem, 30 min após a primeira exposição, exibem um comportamento de baixa investigação. Previamente ao teste, os ratos adultos foram mantidos isolados em caixas-moradia individuais durante 3 dias para a adaptação ao novo ambiente. Os ratos juvenis (30 dias de idade) também foram isolados em caixas-moradia individuais por 20 min antes do início do experimento. O teste de reconhecimento social consistiu em duas apresentações sucessivas (5 min cada) separadas por um período de 30 min. Na primeira exposição, um rato juvenil foi colocado na caixa-moradia do rato adulto, e o tempo gasto pelo adulto na investigação do rato juvenil foi registrado. Ao final da primeira apresentação, o rato juvenil foi retirado e mantido individualmente na sua caixa-moradia durante o tempo de intervalo entre as exposições. Após 30 min, este mesmo rato juvenil foi reexposto ao mesmo rato adulto. Foram considerados como comportamento de investigação: cheirar, tocar, montar, perseguir e lambar. Ambas as apresentações foram analisadas e contabilizadas, e então, determinado o *Ratio of Investigation Duration (RID)*, que corresponde à razão de tempo entre a segunda e primeira exposições. Valores

menores de RID representam uma redução na investigação na segunda exposição, demonstrando a capacidade de reconhecimento do rato adulto e ausência de prejuízo da memória social de curta duração (PREDIGER et al., 2004).

#### 4.5 COLETA E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

A coleta dos tecidos para as análises imunohistoquímicas foi realizada imediatamente após o teste do campo aberto no tempo 24 h, e imediatamente ao final do último teste comportamental realizado (28º dia). Assim, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg) e perfundidos transcárdicamente com solução salina (0,9% NaCl) contendo heparina sódica (25000 IU/mL de solução, Cristália, SP, Brasil) e, em seguida, com solução fixadora tamponada de paraformaldeído 4% (PBS 0,1 M, pH 7.4, ambas soluções a 4°C). Os cérebros foram removidos e pós-fixados por 24 horas a 4°C na solução fixadora de paraformaldeído 4%. Após este período, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose 30% em PBS 0,1 M e mantidos a 4°C até afundarem na solução. Após esse processo de crioproteção, os cérebros foram congelados rapidamente com gelo seco, envolvidos em papel alumínio, identificados e armazenados em freezer a -80°C. Na sequência, os cérebros foram seccionados no criostato (Leica Biosystems, Alemanha) em fatias coronais de 30 µm, ao longo da extensão rostral-caudal do encéfalo. Para a região da SNpc, os cortes foram coletados alternadamente em 6 eppendorfs (contendo 1 secção a cada 150 µm de intervalo, totalizando 6 secções/eppendorf), ao longo das seguintes coordenadas estereotáxicas relativas ao bregma: -4,56 a -5,52 mm. Em relação aos núcleos da rafe, os cortes foram coletados alternadamente em 5 eppendorfs ao longo das coordenadas: -6,96 a -8,52 mm (contendo 1 secção a cada 120 µm de intervalo, totalizando 10 secções/eppendorf) (PAXINOS & WATSON, 2005; BOUWKNECHT et al., 2007). Todos os cortes foram conservados em solução anticongelante e armazenados em freezer a -20°C, até o processamento.

#### 4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH) E TRIPTOFANO HIDROXILASE (TPH)

Para a realização das reações de imunohistoquímica *free floating* dos neurônios da SNpc imunorreativos para TH, as secções de encéfalo foram incubadas com anticorpo primário anti-TH produzido em camundongo (1:2000; clone LNC1; cat nº MAB318, MilliporeSigma, Darmstadt, Alemanha) diluído em tampão de bloqueio (BSA 2%, soro cabra 5%, PBS 0,1 M + Triton X-100 0,15%) por 48 h a 4°C. Após, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-mouse (1:300; cat nº B0529 Sigma, EUA) por 2 h em temperatura ambiente. Após 3 lavagens com Tampão A – PBS 0,1 M contendo 0,15% Triton X-100 (1:500; cat nº AB152, Chemicon, Temecula, CA, USA) – o complexo anticorpo foi detectado utilizando uma variação do sistema ABC (Vectastain ABC Elite kit cat nº PK6101, Vector Laboratories, EUA) seguido pela reação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Vector/SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA).

Para a realização das reações de imunohistoquímica *free floating* dos neurônios dos núcleos da rafe imunorreativos para TPH, secções de encéfalo foram incubadas com anticorpo primário anti-TPH produzido em ovelha (1:1000; cat nº AB1541, MilliporeSigma, Darmstadt, Alemanha), diluído em tampão de bloqueio (BSA 2%, soro coelho 5%, PBS 0,1 M + Triton X-100 0,15%) por 48 h a 4°C. Após este período, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário anti-sheep (1:400, cat nº ab102297, Abcam, Cambridge, UK) por 2 h em temperatura ambiente. Após 3 lavagens com o Tampão A, o complexo anticorpo foi detectado utilizando uma variação do sistema ABC (Vectastain ABC Elite kit cat nº PK6101, Vector Laboratories, EUA) seguido pela reação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Vector/SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA).

Por fim, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e deixadas secar ao ar livre. Após, os cortes foram desidratados em soluções de concentração crescente de etanol, clarificados em xilol e selados com lamínula e Permount (Fisher Scientific, EUA).

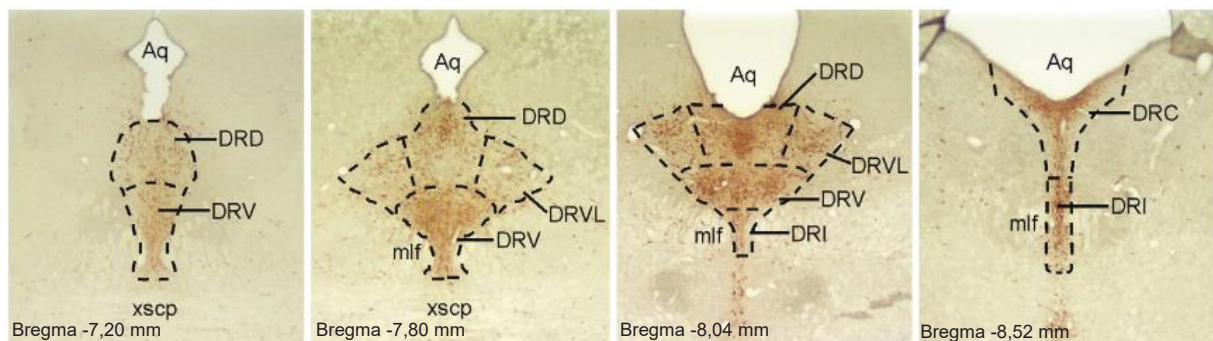
#### 4.7 QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS TH E TPH-IMUNORREATIVOS

Os neurônios dopaminérgicos da SNpc imunorreativos para TH (TH-ir) e os neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe (TPH-ir) foram quantificados por morfometria 2D, através do programa de processamento de imagens ImageJ (National Institutes of Health – NIH, MD, EUA). O número de neurônios TH-ir e TPH-ir de cada

hemisfério, obtido pela quantificação de 6 e 5 fatias alternadas, foi considerado representativo das células neuronais da SNpc e dos núcleos da rafe em cada animal, respectivamente. As áreas selecionadas para a quantificação foram fotografadas com a câmera digital Axiocam Erc 5s acoplada ao microscópio óptico Zeiss Axio Lab.A1 (Zeiss, Alemanha).

Para a quantificação dos neurônios serotoninérgicos, o número de neurônios TPH-ir foram contados em diferentes regiões do núcleo dorsal da rafe (DRN) em quatro níveis na extensão rostral-caudal, de acordo com o bregma: -7,20; -7,80; -8,04 e -8,52 mm (Figura 2). As sub-regiões do DRN analisadas incluíram: coordenada -7,20 mm – partes dorsal (DRD) e ventral (DRV); coordenada -7,80 mm – DRD, DRV, e parte ventrolateral (DRVL); coordenada -8,04 mm – DRD, DRV, DRVL e parte interfascicular (DRI); e coordenada -8,52 mm – parte caudal (DRC) e DRI. A quantificação dos neurônios TPH-ir no núcleo mediano da rafe (MRN) foi realizada na coordenada -7,80 mm, de acordo com o bregma (PAXINOS & WATSON, 2005).

FIGURA 2 – FOTOMICROGRAFIAS ESQUEMÁTICAS PARA ILUSTRAR AS SUB-REGIÕES NOS DIFERENTES NÍVEIS AO LONGO DO EIXO ROSTRAL-CAUDAL



FONTE: BOUWKNECHT et al. (2007).

DRD: DRN parte dorsal; DRV: DRN parte ventral; DRVL: DRN parte ventrolateral; DRI: DRN parte interfascicular; DRC: DRN parte caudal; Aq: aqueduto; mlf, medial longitudinal fasciculus; xscp, decussation of the superior cerebellar peduncle.

#### 4.8 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE SEROTONINA (5-HT) NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, ESTRIADO, HIPOCAMPO E AMÍGDALA

Para a análise neuroquímica, os níveis de 5-HT foram mensurados nas estruturas que recebem projeções do DRN e MRN, como córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e amígdala. Ao final do último teste comportamental (natação forçada), os

animais foram eutanasiados, e as estruturas foram rapidamente dissecadas, logo após a decapitação. Após a retirada dos tecidos, estes foram armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização da análise neuroquímica. O tecido foi pesado previamente ao congelamento. As amostras foram suspensas com ácido perclórico 0,1 M com 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante, em concentração de 15  $\mu\text{L}/\text{mg}$  de material cerebral. Na sequência, as amostras foram fragmentadas com sonicador ultrassônico (Sonics, Newton, CT, EUA) e centrifugadas a 10.000 G por 40 minutos. O sobrenadante (20  $\mu\text{L}$ ) foi injetado em uma estação de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) composta por bomba LC10AD (Shimadzu, Columbia, MD, EUA), uma coluna de fase reversa C-18, 75 x 4,6 mm, partículas de 4  $\mu\text{m}$ , em temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . A 5-HT e seu metabólito foram identificados e quantificados por um detector eletroquímico L-ECD-6<sup>a</sup>, com potencial de oxidação ajustado para + 80 mV. A fase móvel consistiu em  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  7,16g; ácido cítrico 4,2g; EDTA 40 mg; ácido octanossulfônico 550 mg; metanol 100 mL;  $\text{H}_2\text{O}$  800 mL; pH = 3 (BERGQUIST et al., 2002). As áreas de pico foram comparadas às áreas dos padrões externos (Sigma, St Louis, MO, EUA) para identificação da 5-HT, e 5-HIAA. Os resultados foram expressos como ng/g de peso úmido do tecido.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados numéricos passaram por teste de normalidade (Shapiro-Wilk), e foram normalizados caso não passassem no teste. Os resultados dos testes do campo aberto e da preferência por sacarose foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni para múltiplas comparações. Os resultados dos testes de reconhecimento social, labirinto em cruz elevado, natação forçada, das análises neuroquímica e imunohistoquímica para TH foram analisados pelo teste *t* de Student bicaudal não pareado. Os resultados obtidos da imunohistoquímica para TPH foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism (versão 6.01).



## 5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

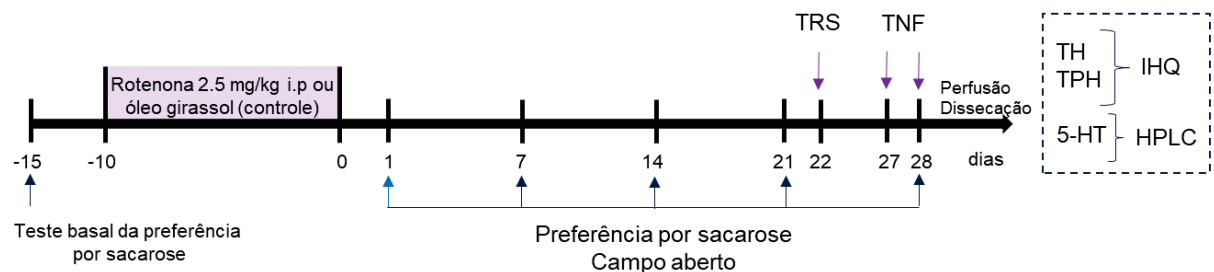
O presente trabalho teve como objetivos avaliar se a administração de rotenona induziria a comportamentos tipo-depressivos, tipo-ansiosos, e prejudicaria a memória de curta duração. Para a avaliação dos comportamentos tipo-depressivos, os animais foram submetidos a três tipos de teste (preferência por sacarose, *splash test* e natação forçada). Além disso, os animais passaram por outros testes para avaliar a função locomotora (campo aberto), o comportamento tipo-ansioso (labirinto em cruz elevado), e a memória de curta duração (reconhecimento social). Devido ao fato de o estudo envolver vários testes comportamentais, estes foram realizados em grupos independentes de animais. Para facilitar o entendimento e a compreensão da linha do tempo dos procedimentos, os experimentos foram conduzidos de acordo com os delineamentos experimentais descritos abaixo.

### 5.1 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA, OS COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVOS, A MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO, E SOBRE AS VIAS SEROTONÉRGICAS

Inicialmente, os animais retirados do Biotério Central da UFPR foram divididos aleatoriamente em grupos de 4 e mantidos em suas caixas-moradia. Após cerca de uma semana de habituação ao novo ambiente, os animais foram submetidos ao teste basal da preferência por sacarose. O teste basal foi realizado 5 dias antes do início do protocolo para indução da lesão da SNpc. Ademais, o teste teve como objetivo selecionar os animais com preferência superior à 65%, e garantir a homogeneidade dos grupos em relação à porcentagem de preferência por sacarose. Seguindo esses parâmetros, os ratos foram novamente divididos em dois grupos experimentais: controle (n = 10) e rotenona (n = 14). Os animais do grupo controle receberam o veículo óleo de girassol via intraperitoneal (i.p.) na dose de 1 mL/kg, e o grupo rotenona recebeu a neurotoxina na dose de 2,5 mg/kg. Os animais de ambos os grupos foram submetidos a uma injeção diária durante 10 dias consecutivos. Após 24 h do término da administração da rotenona, os animais do grupo controle e rotenona foram submetidos ao teste do campo aberto. A avaliação da função locomotora foi repetida aos 7, 14, 21 e 28 dias após a última injeção de rotenona. Nestes mesmos

pontos temporais, os animais foram submetidos ao teste da preferência por sacarose para avaliar se a administração da rotenona induziria ao comportamento tipo-depressivo, mais especificamente, à anedonia. No 22º dia, após o fim da administração de rotenona, os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento social para avaliar a memória social de curta duração. Ainda, os animais foram submetidos ao teste da natação forçada para avaliar o comportamento tipo-depressivo. No dia 27, os animais passaram pelo treino da natação, e 24 h depois, ou seja, no dia 28, os animais passaram pelo teste da natação. Imediatamente ao término deste teste, uma parte dos ratos foi submetida à perfusão transcárdica e os cérebros coletados para posterior análise imunohistoquímica para TPH (neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsal e mediano da rafe), e TH (neurônios dopaminérgicos da SNpc). A outra parte dos animais foi decapitada para a dissecação do córtex pré-frontal, estriado, amígdala e hipocampo, para quantificação dos níveis de 5-HT por HPLC.

FIGURA 3 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 1



Avaliação dos efeitos da administração sistêmica de rotenona sobre a atividade locomotora, os comportamentos tipo-depressivos, a memória de curta duração, e sobre as vias serotoninérgicas. TRS: teste de reconhecimento social; TNF: teste da natação forçada (27º dia: sessão-treino e 28º dia: sessão-teste; TH: tirosina hidroxilase; TPH: triptofano hidroxilase; IHQ: imunohistoquímica.

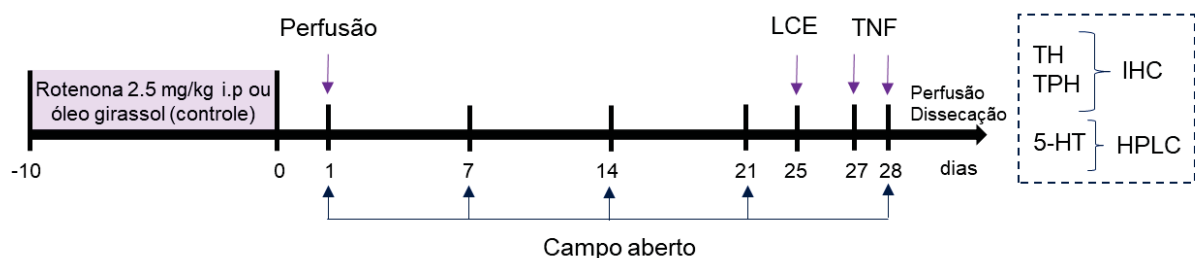
## 5.2 EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA, OS COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVOS E TIPO-ANSIOSO, E SOBRE AS VIAS SEROTONÉRGICAS

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos experimentais: controle (n = 15) e rotenona (n = 20). Os animais do grupo controle receberam 1 mL/kg de óleo de girassol via i.p., e o grupo rotenona recebeu a neurotoxina na dose de 2,5 mg/kg. Os animais de ambos os grupos receberam uma injeção diária durante 10 dias



consecutivos. Após 24 h do término da administração da rotenona, os animais do grupo controle e rotenona foram testados no campo aberto. Imediatamente após o término do teste, uma parte dos animais foi submetida à perfusão transcardíaca, para posterior análise imunohistoquímica dos neurônios serotoninérgicos marcados para TPH. Esta etapa teve como finalidade quantificar os neurônios dos núcleos da rafe em dois tempos (24 h e 28 dias) para avaliarmos se o efeito da rotenona sobre esses neurônios seria tempo-dependente. O outro subconjunto dos animais prosseguiu com os procedimentos experimentais. Dessa forma, a avaliação da função locomotora foi repetida aos 7, 14, 21 e 28 dias após a última injeção de rotenona. No 25º dia, ao fim da administração de rotenona, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado para avaliar o comportamento tipo-ansioso. Ainda, os animais foram submetidos ao teste da natação forçada para avaliar o comportamento tipo-depressivo. No dia 27, os animais passaram pelo treino, e 24 h depois (dia 28), os animais passaram pelo teste da natação. Imediatamente ao término deste teste, uma parte dos ratos (50%) foi submetida à perfusão transcardíaca e os cérebros coletados para posterior análise imunohistoquímica para TPH (neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsal e mediano da rafe), e TH (neurônios dopaminérgicos da SNpc). A outra parte (50%) dos animais foi decapitada para a dissecação do córtex pré-frontal, estriado, amígdala e hipocampo, para quantificação dos níveis de 5-HT por HPLC.

FIGURA 4 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 2

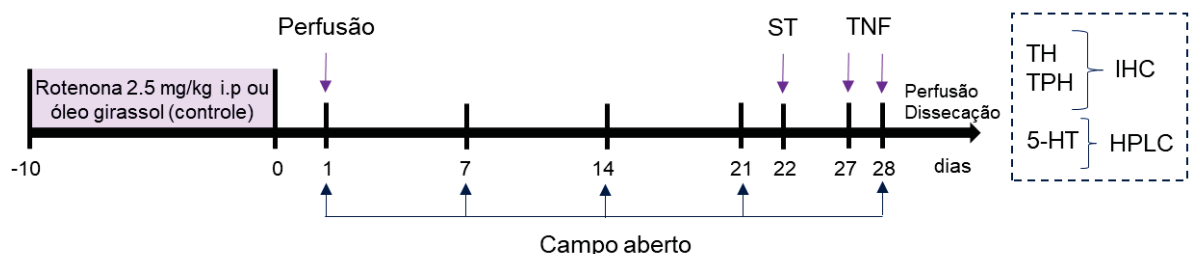


Avaliação dos efeitos da administração sistêmica de rotenona sobre a atividade locomotora, os comportamentos tipo-depressivos e tipo-ansioso, e sobre as vias serotoninérgicas LCE: labirinto em cruz elevado; TNF: teste da natação forçada (27º dia: sessão-treino e 28º dia: sessão-teste; TH: tirosina hidroxilase; TPH: triptofano hidroxilase; IHC: imunohistoquímica.

### 5.3 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA, OS COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVOS, E SOBRE AS VIAS SEROTONÉRGICAS

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos experimentais: controle (n = 10) e rotenona (n = 15). Os animais do grupo controle receberam 1 mL/kg de óleo de girassol via i.p., e o grupo rotenona recebeu a neurotoxina na dose de 2,5 mg/kg. Os animais de ambos os grupos receberam uma injeção diária durante 10 dias consecutivos. Após 24 h do término da administração da rotenona, os animais do grupo controle e rotenona foram submetidos ao teste do campo aberto. Imediatamente após o término do teste, uma parte dos animais foi submetida à perfusão transcardíaca, para posterior análise imunohistoquímica dos neurônios serotoninérgicos marcados para TPH (tempo 24 h). O outro subconjunto dos animais prosseguiu com os procedimentos experimentais. A avaliação da função locomotora foi repetida aos 7, 14, 21 e 28 dias após a última injeção de rotenona. No 22º dia, ao fim da administração de rotenona, os animais foram submetidos ao *Splash test*, para avaliação do comportamento tipo-depressivo (anedonia). Além disso, os animais foram submetidos ao teste da natação forçada. No dia 27, os animais passaram pela sessão treino, e 24 h depois (dia 28), os animais passaram pela sessão teste. Imediatamente ao término do teste, uma parte dos ratos foi submetida à perfusão transcardíaca e os cérebros coletados para posterior análise imunohistoquímica para TPH (neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsal e mediano da rafe), e TH (neurônios dopaminérgicos da SNpc). A outra parte dos animais foi decapitada para a dissecação do córtex pré-frontal, estriado, amígdala e hipocampo, para quantificação dos níveis de 5-HT por HPLC.

FIGURA 5 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO 3



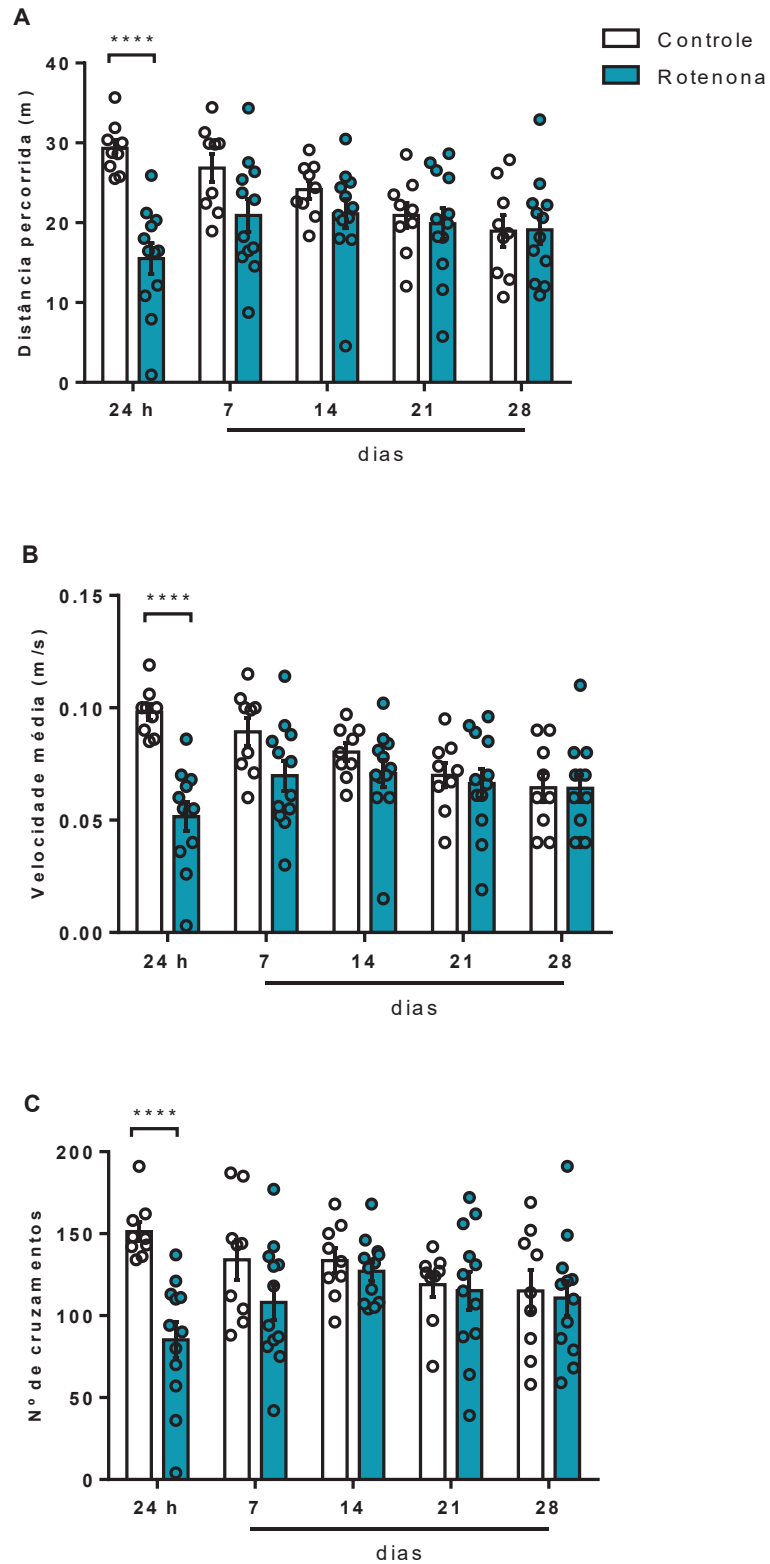
Avaliação dos efeitos da administração sistêmica de rotenona sobre a atividade locomotora, os comportamentos tipo-depressivos, e sobre as vias serotoninérgicas. ST: *splash test*; TNF: teste da natação forçada (27º dia: sessão-treino e 28º dia: sessão-teste); TH: tirosina hidroxilase; TPH: triptofano hidroxilase; IHC: imunohistoquímica.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO LOCOMOTORA NO TESTE DO CAMPO ABERTO

A função locomotora dos animais foi analisada através de três parâmetros em cinco diferentes tempos: 24 h, 7, 14, 21, e 28 dias após a última administração de rotenona. Os ratos tratados com a neurotoxina exibiram hipolocomoção no teste do campo aberto no tempo de 24 h. Como mostrado na Figura 6A, o grupo rotenona apresentou diferença significativa no parâmetro distância percorrida ( $p < 0,0001$ ) comparado ao grupo controle, como indicado pelo fator condição (controle ou rotenona) [ $F_{(1, 19)} = 11,00$ ;  $p = 0,0036$ ], interação [ $F_{(4, 76)} = 5,280$ ;  $p = 0,0008$ ], e fator tempo [ $F_{(4, 76)} = 2,548$ ;  $p = 0,0461$ ]. O parâmetro velocidade média foi significativamente reduzido no grupo rotenona comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ; Fig. 6B), como indicado pelo fator condição [ $F_{(1, 19)} = 11,22$ ;  $p = 0,0034$ ] e interação [ $F_{(4, 76)} = 5,310$ ;  $p = 0,0008$ ], mas não pelo fator tempo [ $F_{(4, 76)} = 2,311$ ;  $p = 0,0654$ ]. De modo semelhante, o número de cruzamentos de linha apresentou diminuição significativa no grupo rotenona comparado ao controle ( $p < 0,0001$ ; Fig. 6C), como indicado pelo fator condição [ $F_{(1, 19)} = 8,890$ ;  $p = 0,0077$ ] e interação [ $F_{(4, 76)} = 3,631$ ;  $p = 0,0092$ ], mas não pelo fator tempo [ $F_{(4, 76)} = 0,8741$ ;  $p = 0,4836$ ]. Por outro lado, nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos controle e rotenona nos três parâmetros analisados: distância percorrida, velocidade média e número de cruzamentos, indicando uma recuperação espontânea da função locomotora.

FIGURA 6 – AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO LOCOMOTORA NO TESTE DO CAMPO ABERTO



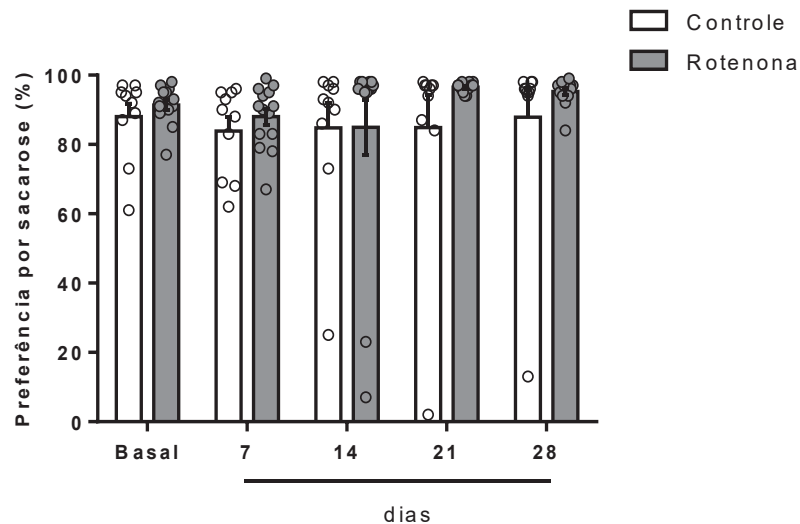
Os animais foram avaliados em três parâmetros no campo aberto: (A) Distância percorrida. (B) Velocidade média. (C) Número de cruzamentos de linha. Os dados foram obtidos 24 h, 7, 14, 21 e 28 dias após a última administração de rotenona. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 9-12/\text{grupo}$ ). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , comparado ao grupo controle (ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni).

## 6.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO

### 6.2.1 Teste da preferência por sacarose

O teste da preferência por sacarose foi realizado em 5 momentos distintos de acordo com o tempo da exposição dos animais à rotenona. O teste basal foi realizado 5 dias antes do início da administração da rotenona para selecionar apenas os ratos com preferência acima de 65%. Após, o teste foi repetido nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias após a última injeção de rotenona. Os resultados demonstraram que a administração sistêmica de rotenona não reduziu a porcentagem de preferência por sacarose em nenhum ponto temporal analisado (Figura 7). A ANOVA de medidas repetidas revelou que não houve interação entre condição e tempo [ $F_{(3, 66)} = 0,4723$ ;  $p = 0,7026$ ]. Além disso, a condição não induziu a alterações significativas [ $F_{(1, 22)} = 1,369$ ;  $p = 0,2545$ ], e os animais não mostraram significantes variações em relação ao tempo [ $F_{(3, 66)} = 0,6879$ ;  $p = 0,5626$ ]. Dessa forma, a administração de rotenona não induziu ao comportamento tipo-depressivo, e os animais não apresentaram anedonia.

FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO NO TESTE DA PREFERÊNCIA POR SACAROSE

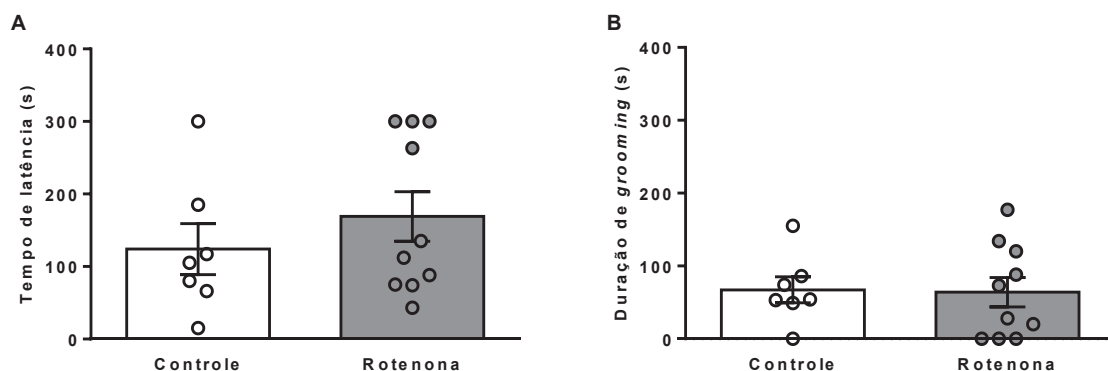


Porcentagem da preferência por sacarose avaliada nos grupos controle e rotenona. Inicialmente, foi obtida a preferência basal (5 dias antes da indução da lesão). Após, os dados foram obtidos 7, 14, 21 e 28 dias após a última administração de rotenona. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 10-14$ /grupo) e analisados por ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

### 6.2.2 *Splash test*

A avaliação do comportamento tipo-depressivo (anedonia) foi avaliada no *splash test*, 22 dias após a última administração de rotenona. Os animais foram avaliados em dois parâmetros: tempo de latência para o início do comportamento de autolimpeza (*grooming*), e tempo total do comportamento de *grooming*. Os resultados demonstraram que os animais do grupo rotenona não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle, tanto no tempo de latência [ $t_{(15)} = 0,8917$ ;  $p = 0,3866$ ; Fig. 8A], quanto no tempo de *grooming* [ $t_{(15)} = 0,1151$ ;  $p = 0,9099$ ; Fig. 8B]. Neste caso, a administração de rotenona não induziu ao comportamento tipo-depressivo, e os animais não apresentaram anedonia.

FIGURA 8 – AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO NO *SPLASH TEST*



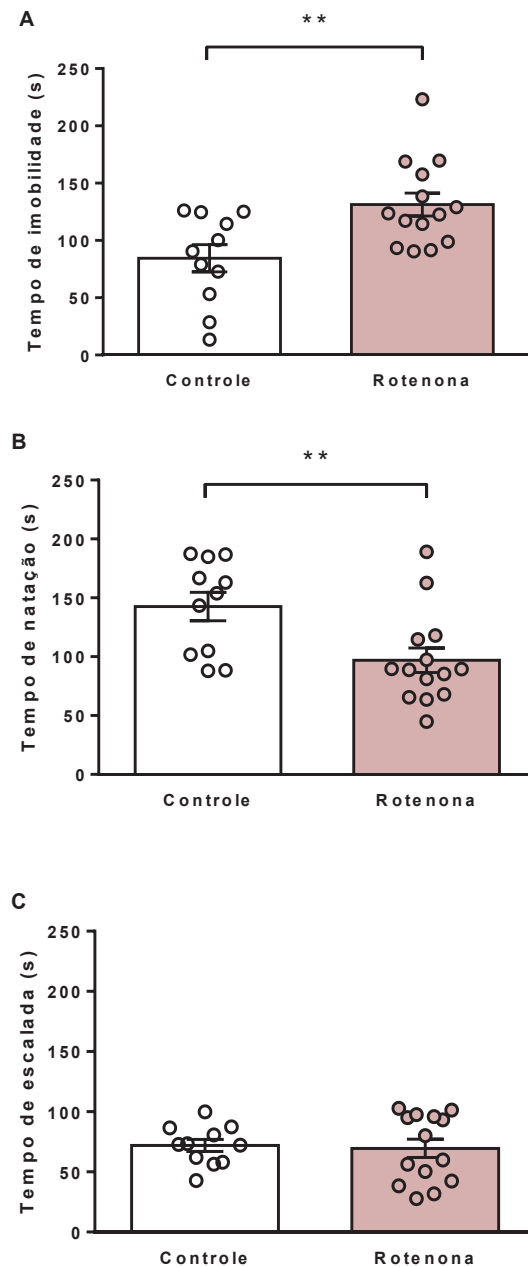
Os animais foram avaliados em dois parâmetros no *Splash test*: (A) Tempo de latência (s). (B) Duração de *grooming* (s). Os dados foram obtidos 22 dias após a última administração de rotenona. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 7-10$ /grupo) e analisados pelo teste  $t$  de Student bicaudal não pareado.

### 6.2.3 Teste da natação forçada

A avaliação do comportamento tipo-depressivo no teste da natação forçada foi realizada 28 dias após a última administração de rotenona. Os resultados demonstraram que houve aumento significativo no tempo de imobilidade dos animais do grupo rotenona, em comparação ao controle [ $t_{(23)} = 3,035$ ;  $p = 0,0059$ ; Fig. 9A], indicando o desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo induzido pela neurotoxina. Além disso, foi observada uma redução significativa no tempo de natação

no grupo rotenona, comparado ao grupo controle [ $t_{(23)} = 2,875$ ;  $p = 0,0086$ ; Fig. 9B]. Por outro lado, não foi observada diferença significativa no tempo de escalada entre os grupos controle e rotenona [ $t_{(23)} = 0,4543$ ;  $p = 0,6539$ ; Fig. 9C].

FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA



O comportamento tipo-depressivo foi avaliado 28 dias após a última administração de rotenona. (A) Tempo de imobilidade (s). (B) Tempo de natação (s). (C) Tempo de escalada (s). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 11-14$ /grupo). \*\*  $p < 0,01$ , comparado ao grupo controle (teste  $t$  de Student bicaudal não pareado).

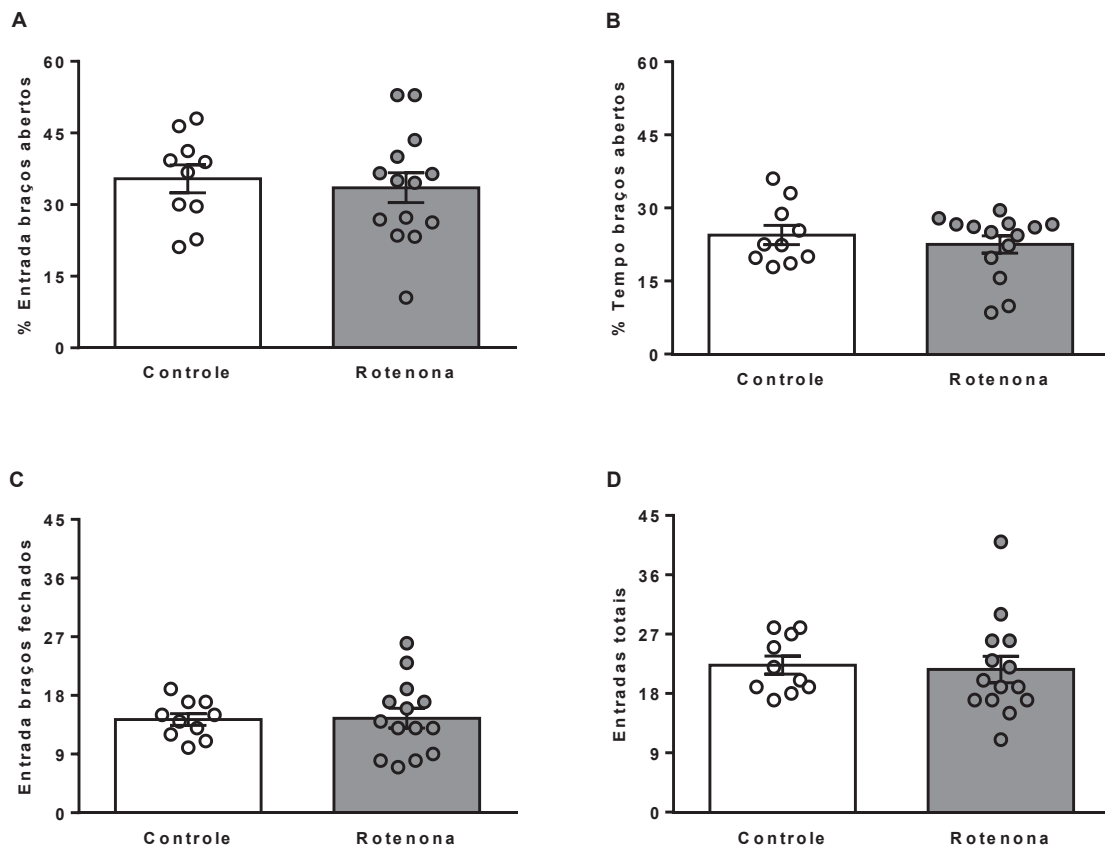
## 6.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO

### 6.3.1 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

O comportamento tipo-ansioso dos animais foi avaliado no 25º dia após a última injeção de rotenona no teste do LCE. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos controle e rotenona, tanto na porcentagem de entrada nos braços abertos [ $t_{(22)} = 0,4146$ ;  $p = 0,6824$ ; Fig. 10A], quanto na porcentagem de tempo nos braços abertos [ $t_{(22)} = 0,7215$ ;  $p = 0,4782$ ; Fig. 10B]. A exposição à rotenona não afetou de forma significativa o número de entrada nos braços fechados e as entradas totais, parâmetros estes considerados como medidas da atividade motora ([ $t_{(22)} = 0,1022$ ;  $p = 0,9195$ ; Fig. 10C] e [ $t_{(22)} = 0,2494$ ;  $p = 0,8054$ ; Fig. 10D], respectivamente).



FIGURA 10 – AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DO LCE



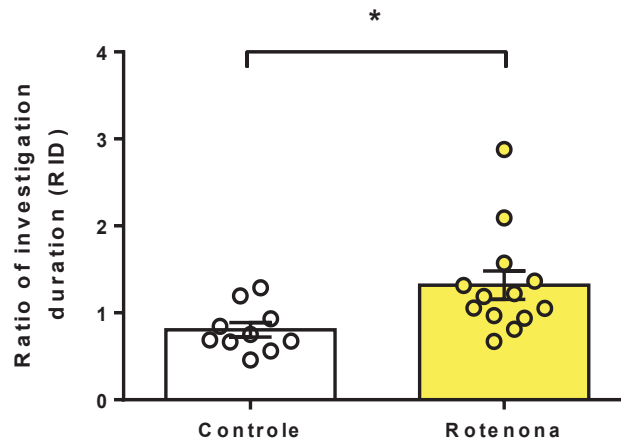
O comportamento tipo-ansioso foi avaliado 25 dias após a última administração de rotenona. (A) % Entrada nos braços abertos. (B) % Tempo nos braços abertos. (C) N° entrada nos braços fechados. (D) N° total entradas em ambos os braços. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 10-14/\text{grupo}$ ) e analisados pelo teste  $t$  de Student bicaudal não pareado.

## 6.4 AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO

### 6.4.1 Teste de reconhecimento social

A memória de curta duração foi avaliada no teste de reconhecimento social realizado 22 dias após a última administração de rotenona. Como mostrado na Figura 11, o grupo rotenona apresentou um aumento significativo na razão de investigação – *ratio of investigation duration (RID)* [ $t_{(21)} = 2,828$ ;  $p = 0,0101$ ], quando comparado ao grupo controle. O RID mais alto indica que o tempo de investigação não diminuiu na 2ª exposição ao rato juvenil, sugerindo um prejuízo na memória social de curta duração induzido pela rotenona.

FIGURA 11 – AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA DE CURTA DURAÇÃO NO TESTE DE RECONHECIMENTO SOCIAL

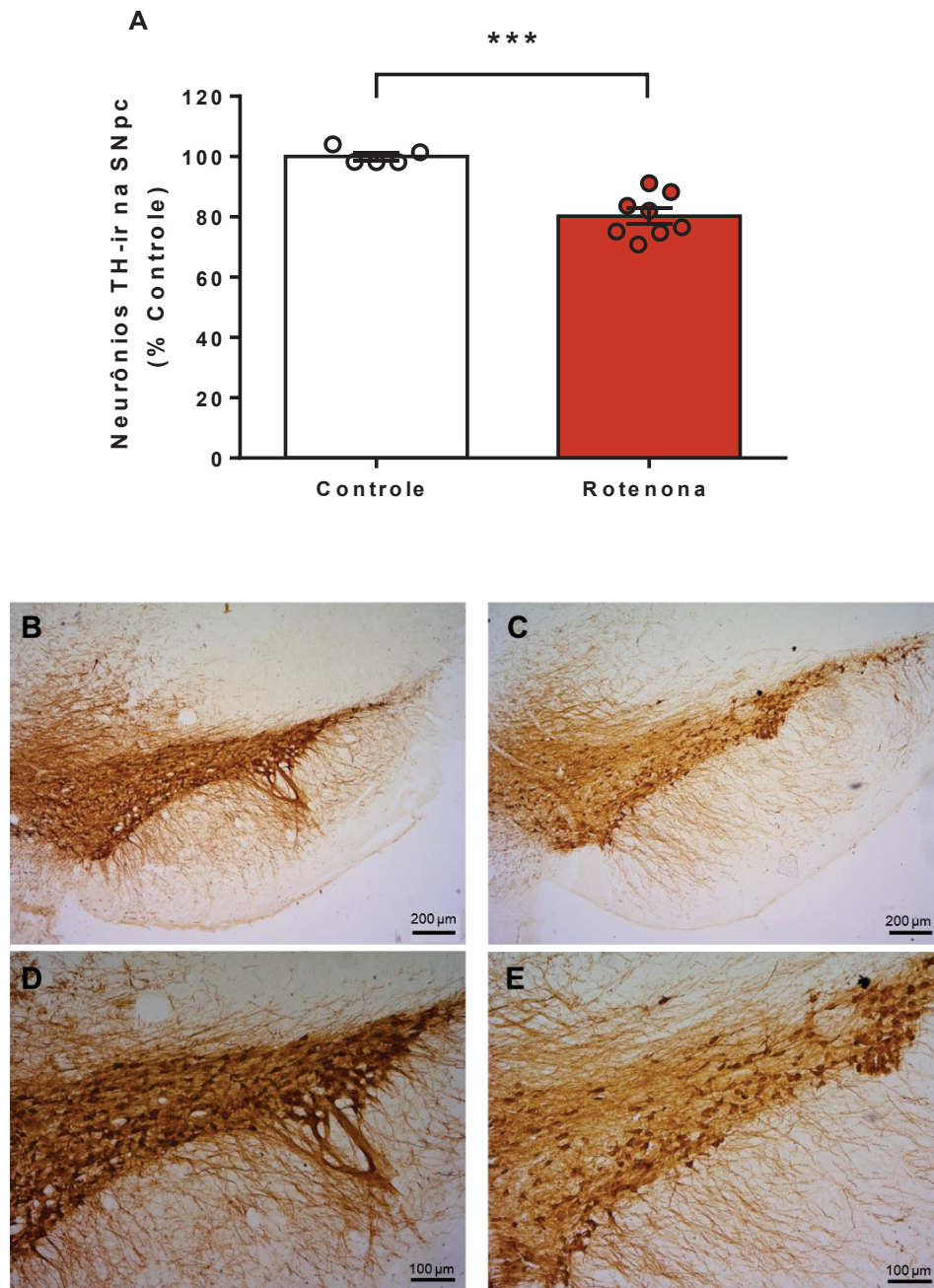


O efeito da administração de rotenona sobre a memória de curta duração foi analisado no teste de reconhecimento social 22 dias após a última injeção. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 10-13/\text{grupo}$ ). \*  $p < 0,05$ , comparado ao grupo controle (teste  $t$  de Student bicaudal não pareado).

#### 6.5 AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA LESÃO DA SNpc POR QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH)

A morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc induzida pela administração sistêmica de rotenona foi avaliada através da quantificação dos neurônios TH-ir. Como mostra a figura 12A, o grupo rotenona apresentou uma redução significativa dos neurônios TH-ir, em comparação ao grupo controle [ $t_{(11)} = 5,830$ ;  $p = 0,0001$ ]. Dessa maneira, o resultado da análise imunohistoquímica, realizado no 28º dia após o término da administração de rotenona, revelou uma diminuição de 20% nos neurônios TH-ir no grupo tratado com a neurotoxina.

FIGURA 12 – AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA LESÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE ROTENONA ATRAVÉS DA IMUNORREATIVIDADE PARA TH



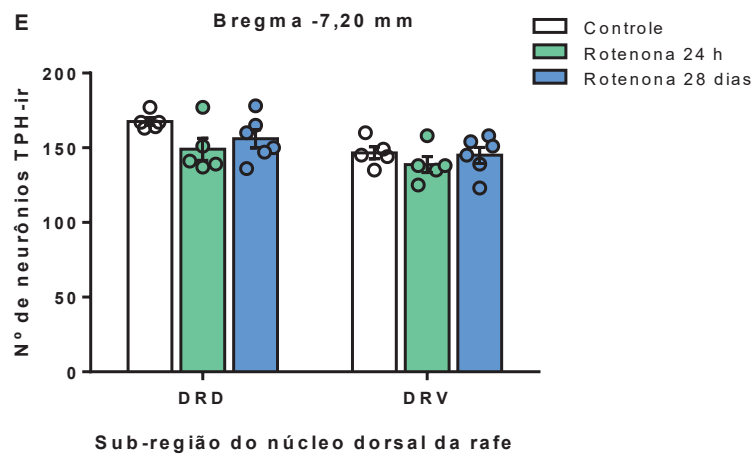
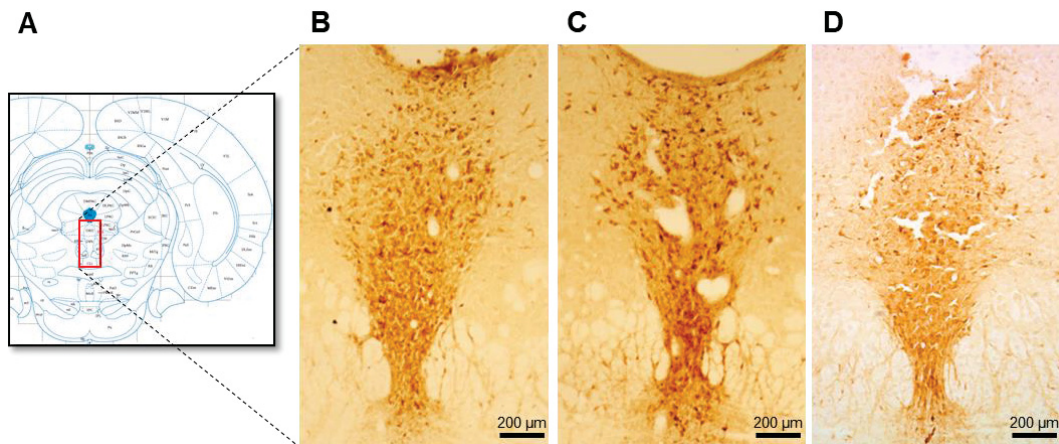
A extensão da lesão sobre os neurônios dopaminérgicos da SNpc, induzida por rotenona, foi avaliada 28 dias após a última injeção. (A) Contagem do número total de neurônios TH-ir no SNpc expressos em porcentagem. (B) Fotomicrografia representativa dos neurônios TH-ir na SNpc do grupo controle (5 x magnificação). (C) Fotomicrografia representativa dos neurônios TH-ir na SNpc do grupo rotenona (5 x magnificação). (D) Grupo controle (10 x magnificação). (E) Grupo rotenona (10 x magnificação). Os valores estão expressos como porcentagem em relação ao grupo controle ( $n = 5-8/\text{grupo}$ ). \*\*\*  $p < 0,001$ , comparado ao grupo controle (teste  $t$  de Student bicaudal não pareado). SNpc: substância negra parte compacta; TH-ir: imunorreativo para tirosina hidroxilase.

## 6.6 QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS SEROTONÉRGICOS IMUNORREATIVOS PARA TRIPTOFANO HIDROXILASE (TPH-ir)

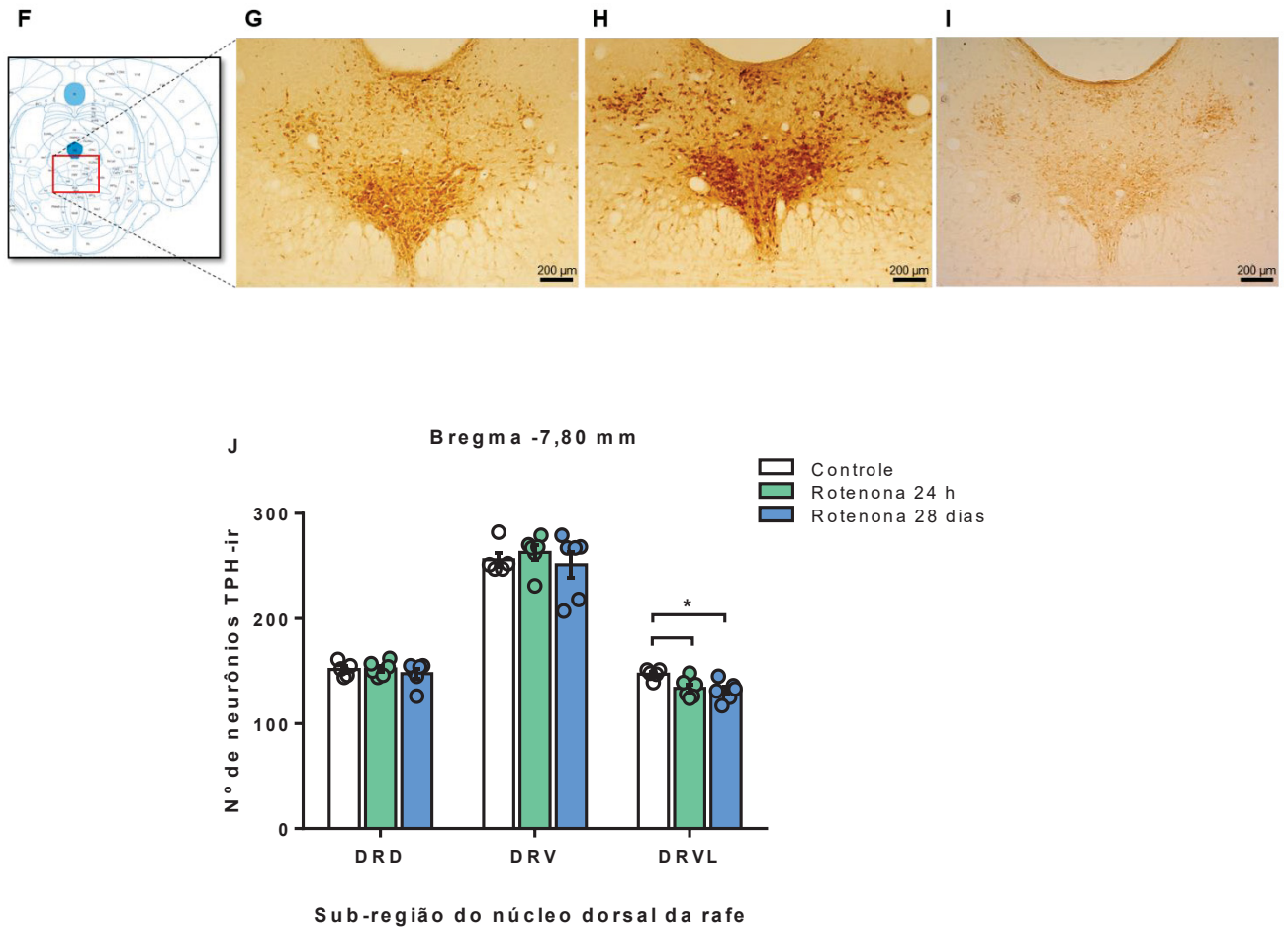
### 6.6.1 Neurônios TPH-ir no núcleo dorsal da rafe (DRN)

A análise imunohistoquímica dos neurônios serotonérgicos no DRN foi realizada em dois pontos temporais: 24 h e 28 dias após a última administração de rotenona. Para esta análise, o grupo controle foi composto pelos tempos 24 h e 28 dias. Além disso, a contagem dos neurônios foi realizada em diferentes sub-regiões da DRN em quatro níveis na extensão rostral-caudal, de acordo com o bregma: -7,20; -7,80; -8,04 e -8,52 mm. No nível mais rostral da DRN, na coordenada -7.20 mm, a ANOVA de uma via revelou que a administração sistêmica de rotenona não teve efeito sobre o número de neurônios TPH-ir. A ausência de efeito foi observada na sub-região dorsal (DRD) [ $F_{(2, 13)} = 2,482$ ;  $p = 0,1222$ ; Fig. 13E], e na sub-região ventral (DRV) [ $F_{(2, 13)} = 0,6536$ ;  $p = 0,5365$ ; Fig. 13E]. Como mostrado na Figura 13J, no nível medial da DRN (coordenada -7,80 mm), a administração de rotenona não afetou o número de neurônios na sub-região DRV [ $F_{(2, 14)} = 0,5083$ ;  $p = 0,6122$ ], e na sub-região DRV [ $F_{(2, 14)} = 0,4332$ ;  $p = 0,6569$ ]. Em contrapartida, na sub-região ventrolateral (DRVL) a administração de rotenona afetou o número de neurônios TPH-ir [ $F_{(2, 14)} = 5,626$ ;  $p = 0,0161$ ], e a redução foi significativa nos pontos temporais de 24 h e 28 dias, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Em continuação à análise da DRN, no nível da coordenada -8,04 mm (Fig. 13O), foi observada ausência de efeito da administração de rotenona na sub-região DRD [ $F_{(2, 13)} = 2,391$ ;  $p = 0,1305$ ], na sub-região DRV [ $F_{(2, 13)} = 1,699$ ;  $p = 0,2210$ ], na sub-região DRVL [ $F_{(2, 13)} = 1,258$ ;  $p = 0,3167$ ], e na parte interfascicular (DRI) [ $F_{(2, 13)} = 0,1278$ ;  $p = 0,8811$ ]. De maneira similar, no nível caudal da DRN (coordenada -8,52 mm), a administração de rotenona não afetou o número de neurônios na sub-região caudal (DRC) [ $F_{(2, 10)} = 1,760$ ;  $p = 0,2213$ ; Fig.13T], e na sub-região DRI [ $F_{(2, 10)} = 0,2517$ ;  $p = 0,7823$ ; Fig.13T].

FIGURA 13 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ROTENONA SOBRE OS NEURÔNIOS SEROTONÉRGICOS TPH-ir DO DRN

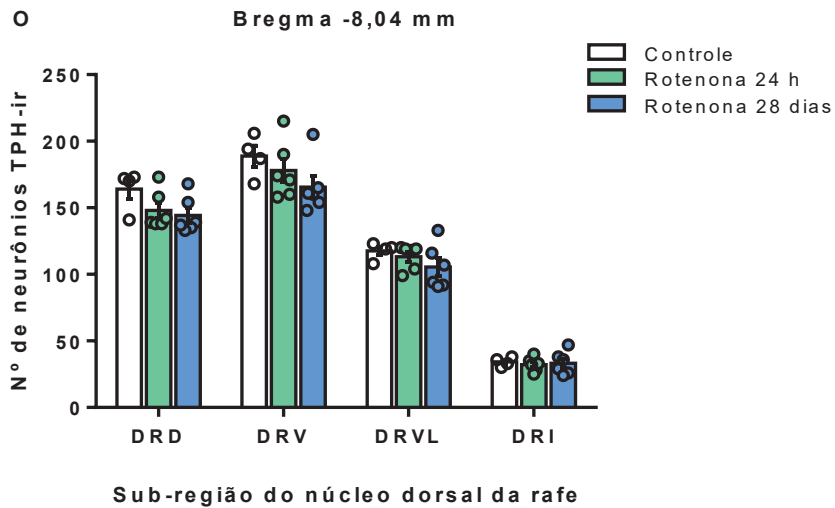
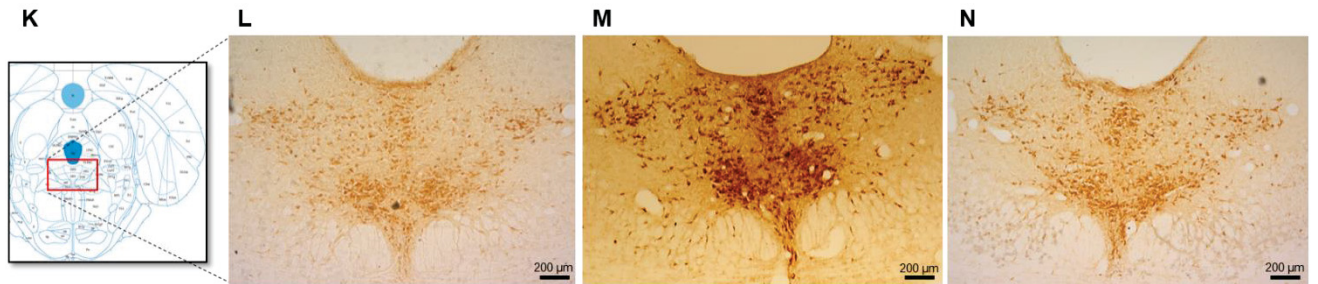


O efeito da administração de rotenona sobre os neurônios serotonérgicos do DRN marcados para TPH foi avaliado 24 h e 28 dias após a última injeção. (A) Recorte do atlas de Paxinos & Watson indicando as sub-regiões do DRN analisadas de acordo com a coordenada -7,20 mm. (B) Fotomicrografia representativa dos neurônios TPH-ir do DRN rostral no grupo controle. (C) Grupo rotenona 24 h. (D) Grupo rotenona 28 dias. (E) Contagem do número total de neurônios serotonérgicos TPH-ir nas sub-regiões do DRN para cada grupo. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 5-6$ /grupo) e analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey). DRN: núcleo dorsal da rafe; DRD: DRN parte ou sub-região dorsal; DRV: DRN parte ventral; TPH-ir: imunorreativo para triptofano hidroxilase.

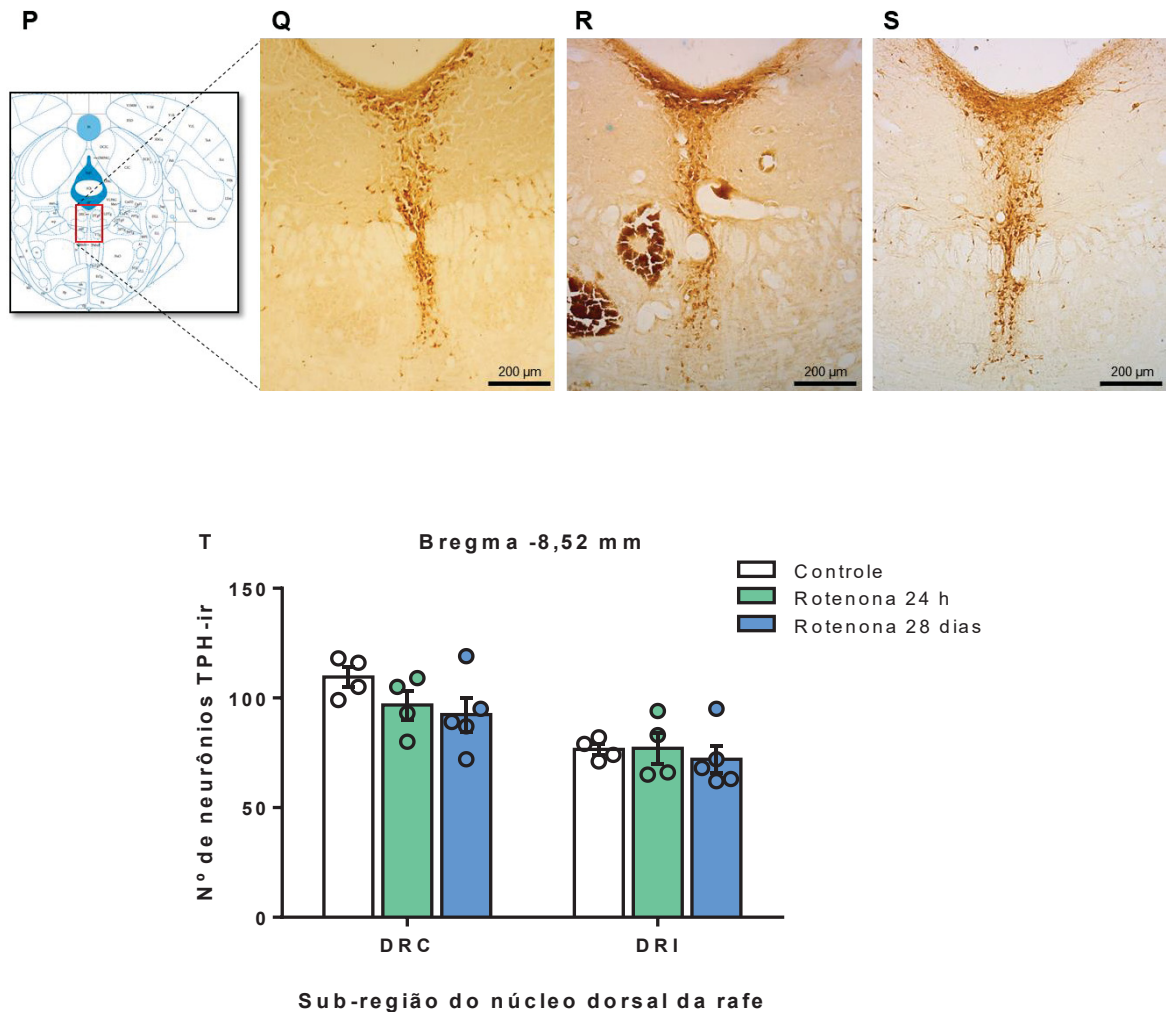


O efeito da administração de rotenona sobre os neurônios serotoninérgicos do DRN marcados para TPH foi avaliado 24 h e 28 dias após a última injeção. (F) Recorte do atlas de Paxinos & Watson indicando as sub-regiões do DRN analisadas de acordo com a coordenada -7,80 mm. (G) Fotomicrografia representativa dos neurônios TPH-ir do DRN medial no grupo controle. (H) Grupo rotenona 24 h. (I) Grupo rotenona 28 dias. (J) Contagem do número total de neurônios serotoninérgicos TPH-ir nas sub-regiões do DRN para cada grupo. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 5-6/\text{grupo}$ ). \*  $p < 0,05$ , comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey). DRN: núcleo dorsal da rafe; DRD: DRN parte ou sub-região dorsal; DRV: DRN parte ventral; DRVL: DRN parte ventrolateral; TPH-ir: imunorreativo para triptofano hidroxilase.





O efeito da administração de rotenona sobre os neurônios serotonérgicos do DRN marcados para TPH foi avaliado 24 h e 28 dias após a última injeção. (K) Recorte do atlas de Paxinos & Watson indicando as sub-regiões do DRN analisadas de acordo com a coordenada -8,04 mm. (L) Fotomicrografia representativa dos neurônios TPH-ir do DRN medial no grupo controle. (M) Grupo rotenona 24 h. (N) Grupo rotenona 28 dias. (O) Contagem do número total de neurônios serotonérgicos TPH-ir nas sub-regiões do DRN para cada grupo. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 4-6/\text{grupo}$ ) e analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey). DRN: núcleo dorsal da rafe; DRD: DRN parte ou sub-região dorsal; DRV: DRN parte ventral; DRVL: DRN parte ventrolateral; DRI: DRN parte interfascicular; TPH-ir: imunorreativo para triptofano hidroxilase.



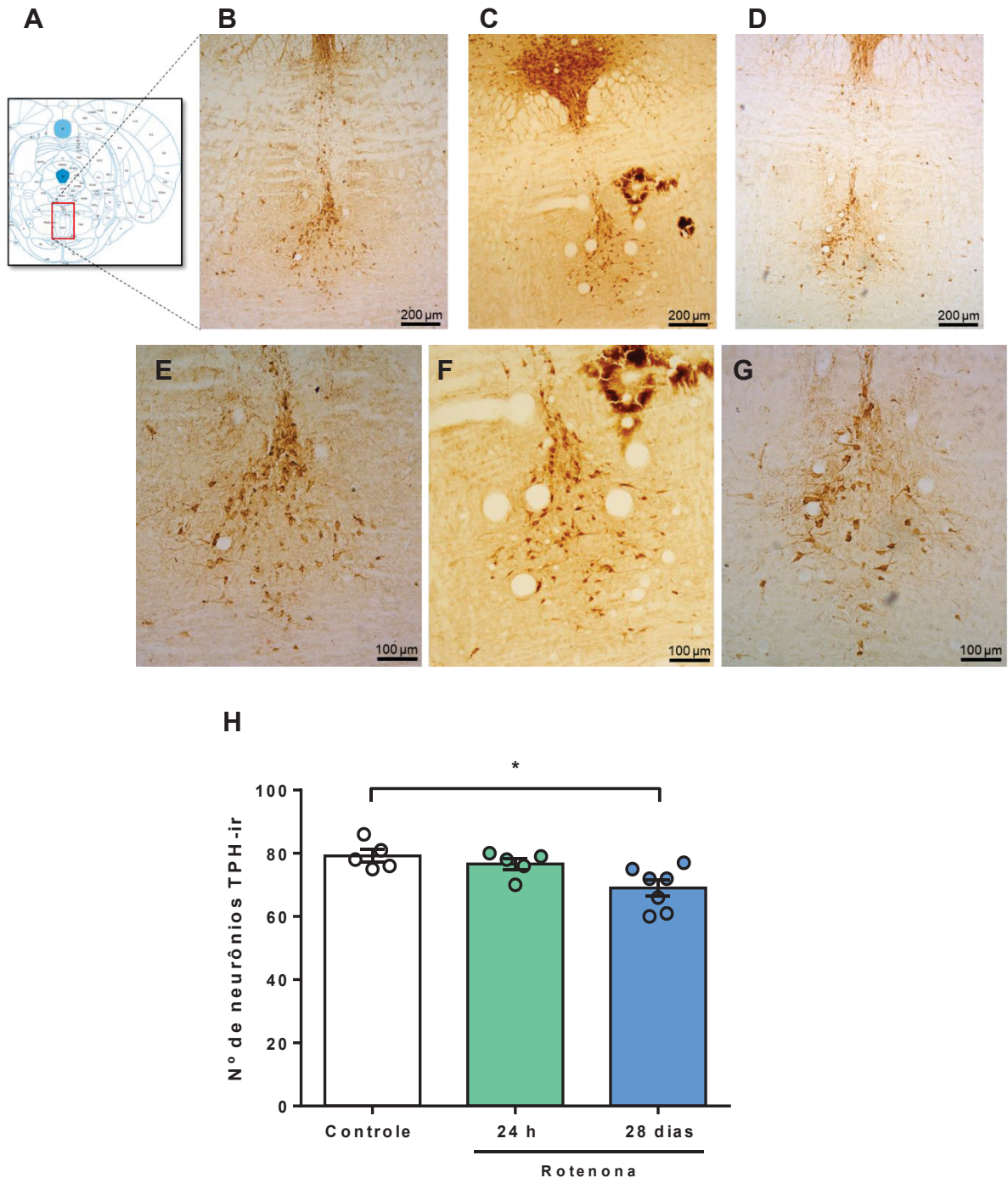
O efeito da administração de rotenona sobre os neurônios serotoninérgicos do DRN marcados para TPH foi avaliado 24 h e 28 dias após a última injeção. (P) Recorte do atlas de Paxinos & Watson indicando as sub-regiões do DRN analisadas de acordo com a coordenada -8,52 mm. (Q) Fotomicrografia representativa dos neurônios TPH-ir do DRN caudal no grupo controle. (R) Grupo rotenona 24 h. (S) Grupo rotenona 28 dias. (T) Contagem do número total de neurônios TPH-ir nas sub-regiões do DRN para cada grupo. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 4-5/\text{grupo}$ ) e analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. DRN: núcleo dorsal da rafe; DRI: DRN parte interfascicular; DRC: DRN parte caudal; TPH-ir: imunorreativo para triptofano hidroxilase.

### 6.6.2 Neurônios TPH-ir no núcleo mediano da rafe (MRN)

A análise imunohistoquímica dos neurônios serotoninérgicos no MRN também foi realizada 24 h e 28 dias após a última administração de rotenona. Para esta análise, o grupo controle foi composto pelos tempos 24 h e 28 dias. A quantificação dos neurônios foi realizada na coordenada -7,80 mm, de acordo com o bregma. Como mostrado na Figura 14H, a administração de rotenona afetou o número de neurônios TPH-ir [ $F_{(2, 14)} = 5,801$ ;  $p = 0,0146$ ], e a redução observada foi significativa apenas no grupo rotenona no tempo de 28 dias, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).



FIGURA 14 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ROTENONA SOBRE OS NEURÔNIOS SEROTONÉRGICOS TPH-ir DO MRN

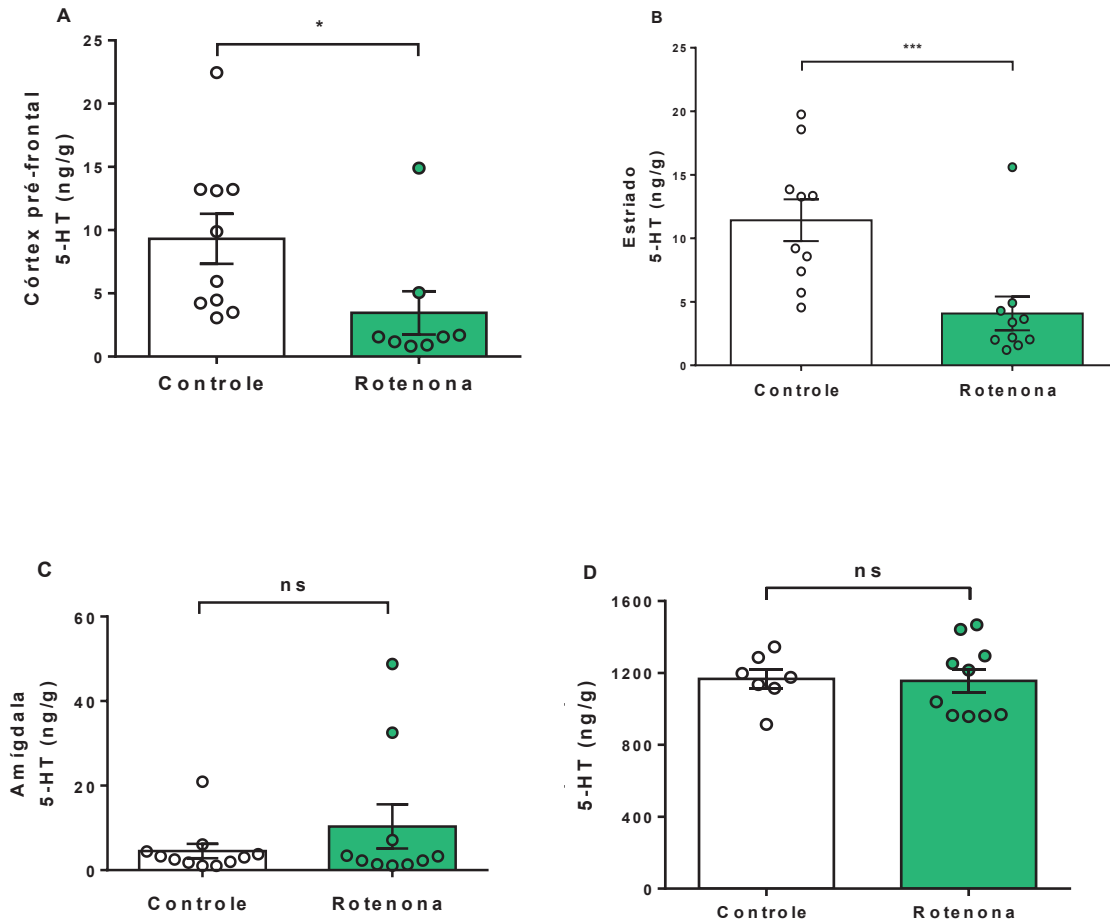


O efeito da administração de rotenona sobre os neurônios serotonérgicos do MRN marcados para TPH foi avaliado 24 h e 28 dias após a última injeção. (A) Recorte do atlas de Paxinos & Watson indicando a região do MRN analisada de acordo com a coordenada -7,80 mm. (B) Fotomicrografia representativa dos neurônios TPH-ir do MRN no grupo controle (magnificação 5 x). (C) Grupo rotenona 24 h (5 x). (D) Grupo rotenona 28 dias (5 x). (E) Grupo controle (magnificação 10 x). (F) Grupo rotenona 24 h (10 x). (G) Grupo rotenona 28 dias (10 x). (H) Contagem do número total de neurônios TPH-ir no MRN para cada grupo. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 5-7/\text{grupo}$ ). \*  $p < 0,05$ , comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey). MRN: núcleo mediano da rafe; TPH-ir: imunorreativo para triptofano hidroxilase.

## 6.7 QUANTIFICAÇÃO NEUROQUÍMICA DOS NÍVEIS DE 5-HT NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, ESTRIADO, AMÍGDALA E HIPOCAMPO POR HPLC

A análise neuroquímica para quantificar os níveis de 5-HT foi realizada no final dos procedimentos comportamentais, 28 dias após a última administração de rotenona. Os resultados demonstraram que os níveis de 5-HT reduziram de forma significativa no córtex pré-frontal [ $t_{(16)} = 2,731$ ;  $p = 0,0148$ ] e no estriado [ $t_{(18)} = 4,004$ ;  $p = 0,0008$ ], em relação ao controle. Por outro lado, não foram encontradas diferenças significantes nos níveis de 5-HT entre os grupos na amígdala [ $t_{(19)} = 0,9057$ ;  $p = 0,3764$ ], e no hipocampo dos animais [ $t_{(15)} = 0,1182$ ;  $p = 0,9075$ ] (Figura 15).

FIGURA 15 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ROTENONA SOBRE OS NÍVEIS DE 5-HT NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, ESTRIADO, AMÍGDALA E HIPOCAMPO



O efeito da administração de rotenona sobre quantificação neuroquímica dos níveis de 5-HT foi avaliado 28 dias após a última injeção. (A) Níveis de 5-HT no córtex pré-frontal. (B) Níveis de 5-HT no estriado. (C) Níveis de 5-HT na amígdala. (D) Níveis de 5-HT no hipocampo. As quantificações foram expressas como ng/g de peso úmido do tecido. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 7-10$ /grupo). \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , comparado ao grupo controle (teste  $t$  de Student bicaudal não pareado). ns: não significativa.

## 7 DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo mostram que a administração sistêmica de rotenona induziu ao comportamento tipo-depressivo e ao prejuízo na memória de curta duração. Além disso, a exposição à neurotoxina levou a efeitos distintos sobre a neurotransmissão serotoninérgica, evidenciados pela redução dos neurônios serotoninérgicos imunorreativos para TPH no MRN, e a redução dos níveis de serotonina no córtex pré-frontal e estriado.

Para este estudo, foi utilizado o protocolo do modelo animal da DP induzido pela administração sistêmica de rotenona para a investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico nos distúrbios não motores nas fases iniciais da DP. Ademais, alguns estudos têm demonstrado que a disfunção do sistema serotoninérgico é mais relevante em pacientes na fase inicial do que em alguns anos após o diagnóstico (GROSCH et al., 2016). Uma das vantagens do modelo animal da DP induzido pela administração sistêmica de rotenona é a capacidade de gerar, de forma seletiva, a morte dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, e induzir à formação de agregados da proteína  $\alpha$ -sinucleína nesses neurônios (SHERER et al., 2003). Dessa forma, por reproduzir as principais características neuropatológicas, o modelo da rotenona torna-se útil como protocolo para a investigação da fisiopatologia da DP, além de seus distúrbios motores e não motores. A rotenona é um pesticida lipofílico e é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Por isso, a rotenona pode ser administrada de forma sistêmica para induzir a lesão dos neurônios dopaminérgicos. Entretanto, existe uma limitação desta via de administração, pois a rotenona pode causar uma toxicidade periférica nos animais, afetando a saúde de forma geral, e elevando a taxa de mortalidade, o que poderia prejudicar a replicabilidade do modelo (LAPOINTE et al., 2004). Apesar desta limitação, o protocolo utilizado no presente trabalho não causou elevada taxa de mortalidade, e, dessa forma, foi possível o desenvolvimento dos objetivos do estudo.

Nesse sentido, nosso primeiro resultado demonstrou que os animais apresentaram hipolocomoção 24 h após a última administração de rotenona. Nas semanas subsequentes, quando o teste do campo aberto foi repetido, foi observado que os animais do grupo rotenona recuperaram espontaneamente a função locomotora. Os dados corroboram estudos anteriores do nosso laboratório que também utilizaram o modelo animal da rotenona via sistêmica (MORAIS et al., 2012;

BASSANI et al., 2014), e outros modelos induzidos por 6-OHDA (SANTIAGO et al., 2010; SANTIAGO et al., 2014; SOUZA et al., 2018), MPTP (SANTIAGO et al., 2010; BARBIERO et al., 2014) e rotenona via intranigral (SANTIAGO et al., 2010; ZAMINELLI et al., 2014). Ademais, a recuperação espontânea apresentada pelos animais expostos à rotenona pode ser explicada por eventos de neuroplasticidade, ocasionados pelos neurônios sobreviventes em decorrência do aumento do número ou da afinidade dos receptores dopaminérgicos, capazes de contrabalancear a morte neuronal (MORAIS et al., 2012; BASSANI et al., 2014). Com efeito, a função locomotora recuperada pode evitar vieses na interpretação dos outros testes comportamentais subsequentes, como o teste da natação forçada.

Para avaliar o comportamento tipo-depressivo dos animais expostos à rotenona, foram utilizados três tipos de testes: preferência por sacarose, *splash test* e natação forçada. O teste da preferência por sacarose explora a preferência natural dos roedores por soluções adocicadas em relação à água, e quando os animais apresentam anedonia, há a redução desta preferência. Os resultados do presente trabalho demonstraram que a administração de rotenona não induziu ao comportamento anedônico, e os animais apresentaram uma alta preferência pela sacarose (média de 90%), em relação à água, em todos os pontos temporais analisados. Em contrapartida, Morais et al. (2012) observaram que os animais submetidos ao mesmo protocolo (2,5 mg/kg rotenona por 10 dias) apresentaram anedonia no teste da preferência por sacarose, quando avaliados 21 dias após a última injeção aplicada. De forma semelhante, estudos que utilizaram um protocolo de administração de rotenona 1,5 mg/kg por 8 dias demonstraram uma redução da preferência por sacarose (MADIHA e HAIDER, 2109; MADIHA et al., 2021). Outros estudos que empregaram o modelo animal da 6-OHDA verificaram comportamento anedônico nos ratos com lesão bilateral na SNpc (SANTIAGO et al., 2014; VECCHIA et al., 2018). A anedonia exibida pelos animais na preferência por sacarose tem sido atribuída à redução dos níveis de 5-HT e DA no hipocampo e estriado (SANTIAGO et al., 2014; MADIHA e HAIDER, 2109; MADIHA et al., 2021). Além disso, Santiago et al. (2014) observaram correlações positivas entre os níveis de 5-HT hipocampais e de DA estriatais e o consumo de sacarose em ratos lesados com 6-OHDA. O presente estudo não observou alterações nos níveis hipocampais de 5-HT entre os grupos controle e rotenona. Este achado pode explicar, em parte, porque os animais não exibiram comportamento anedônico, refletido pela alta preferência por sacarose.

O *Splash test*, assim como a preferência por sacarose, avalia a anedonia e ainda, pode ser utilizado para avaliar o comportamento motivado e o autocuidado dos animais (WILLNER et al., 2005; ISINGRINI et al., 2010). Neste teste, uma solução de sacarose 10% é aplicada no dorso dos ratos, e por ser uma solução doce e viscosa, os animais iniciam o processo de autolimpeza. Os resultados mostraram que os animais do grupo rotenona não apresentaram comportamento anedônico, e não foram observadas diferenças no tempo de latência e no tempo total gasto para o processo de autolimpeza (*grooming*). Diferentemente do nosso trabalho que empregou o modelo da rotenona, outros estudos induziram a lesão com aplicação intracerebroventricular (icv) de MPP<sup>+</sup> (metabólito ativo do MPTP) em camundongos (CUNHA et al., 2016; MORETTI et al., 2016). Neste caso, os autores observaram que os animais lesados apresentaram comportamento anedônico, indicado pela diminuição do tempo de *grooming*.

Na DP, a anedonia é um dos sintomas presentes na depressão, e os pacientes apresentam uma redução na capacidade de sentir prazer em atividades que antes eram consideradas prazerosas (ASSOGNA et al., 2011; LOAS et al., 2014). Além disso, a anedonia nos pacientes com DP pode estar associada com o comprometimento motor (acinesia), a apatia, e o declínio cognitivo (LOAS et al., 2014). O mecanismo pelo qual os pacientes desenvolvem a anedonia não está totalmente esclarecido. Entretanto, sugere-se que os processos neurodegenerativos podem levar ao comprometimento da via dopaminérgica mesolímbica, envolvida com os comportamentos e a motivação (KAJI e HIRATA, 2011). Além disso, pacientes que foram tratados com pramipexol, um agonista dopaminérgico, apresentaram melhora nos sintomas anedônicos, sugerindo um envolvimento dos receptores dopaminérgicos D2 (LEMKE et al., 2005).

Em continuação às avaliações do comportamento tipo-depressivo induzido pela rotenona, os animais foram submetidos ao teste da natação forçada 28 dias após a última administração da neurotoxina. Os resultados demonstraram que o grupo rotenona apresentou um aumento no tempo de imobilidade, e por outro lado uma diminuição no tempo de natação. O aumento do tempo de imobilidade é um parâmetro que indica comportamento tipo-depressivo, o qual pode ser comparado a uma situação de desamparo frente a uma situação inescapável (cilindro com água) (CAN et al., 2012). Ademais, os resultados corroboraram estudos prévios no modelo da rotenona (MORAIS et al., 2012; BASSANI et al., 2014), 6-OHDA (SANTIAGO et al.,



2010; SANTIAGO et al., 2014), e MPTP (BARBIERO et al., 2014). Santiago et al. (2014) demonstraram em ratos que a infusão bilateral de 6-OHDA na SNpc induziu à redução dos níveis estriatais de DA e os níveis hipocampais de 5-HT. Em relação aos resultados do teste da natação forçada, o estudo mostrou correlação positiva entre níveis de 5-HT e tempo de natação, e uma correlação negativa entre os níveis de DA e o tempo de imobilidade (SANTIAGO et al., 2014). Esses resultados estão de acordo com a hipótese de que os déficits de monoaminas podem estar envolvidos na etiologia da depressão em pacientes com DP. Corroborando, parcialmente, esses dados, os resultados do presente trabalho demonstraram que o tempo de imobilidade é significativamente maior no grupo rotenona em comparação ao grupo controle. Entretanto, nossos dados revelaram que não houve diferença nos níveis hipocampais de 5-HT entre os grupos. Trabalhos do nosso grupo que utilizaram o modelo da rotenona por via sistêmica, demonstraram que os animais apresentaram aumento no tempo de imobilidade, porém os dados não revelaram redução dos níveis de 5-HT hipocampais, apenas nos níveis de DA estriatais (MORAIS et al., 2012; BASSANI et al., 2014). Nesse sentido, é possível sugerir que os diferentes modelos animais de DP, induzidos por toxinas podem levar a efeitos distintos sobre a concentração de monoaminas. Ademais, no modelo da rotenona, o aumento do tempo de imobilidade na natação não foi influenciado pelos níveis de 5-HT hipocampais, mas possivelmente, pelos níveis reduzidos de DA no estriado. O presente trabalho não avaliou os níveis estriatais de DA. Por outro lado, observamos uma redução nos níveis de 5-HT no estriado dos animais do grupo rotenona. Além disso, Yoshimoto et al. (2012) mostraram que os níveis de 5-HT no núcleo caudado/putâmen de camundongos foram significativamente menores no grupo que recebeu administração oral crônica de rotenona quando comparado com o grupo controle. Dessa maneira, o comportamento tipo-depressivo observado no grupo rotenona pode estar relacionado com os níveis reduzidos de 5-HT no estriado, além da diminuição de outras monoaminas não quantificadas, como a DA e a NA.

A depressão é o distúrbio neuropsiquiátrico mais importante e frequente, e ocorre em torno de 35% a 50% dos pacientes com DP (POEWE et al., 2017). A fisiopatologia da DP é complexa, e ainda não está elucidada. Vários estudos sugerem que deficiências nas neurotransmissões dopaminérgica, serotoninérgica, e noradrenérgica estão envolvidas. Pelo que foi exposto anteriormente na discussão dos resultados dos modelos animais, estudos clínicos também apresentam dados

distintos em relação à participação dos neurotransmissores. Por exemplo, Remy et al. (2005) exploraram a técnica PET/MRI, utilizando [11C]RTI-32 PET, um biomarcador para ligação do transportador de DA e NA, em pacientes com DP, diagnosticados ou não com depressão. O estudo revelou que o grupo com depressão apresentou uma menor ligação de [11C]RTI-32 em comparação ao grupo sem depressão, em regiões como *locus coeruleus* e regiões límbicas (córtex cingulado anterior, tálamo, amígdala e estriado ventral). Assim, Lian et al. (2019) correlacionaram as características clínicas dos pacientes com DP e alterações neuroquímicas no LCR. Os autores demonstraram que os níveis de DA e 5-HT foram significativamente reduzidos em pacientes com DP e depressão, em comparação ao grupo sem depressão. A análise de correlação, entre o escore *Hamilton Depression Rating Scale* (HAMD) e os níveis de DA, 5-HT e NA no LCR, mostrou que apenas os níveis de DA estavam negativamente correlacionados com os escores de HAMD. Através desses dados, é possível inferir que a depressão associada na DP pode estar relacionada não apenas com níveis reduzidos de 5-HT, mas também de DA e NA.

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansioso. O comportamento neste teste (atividade em braços abertos) reflete um conflito entre a preferência do roedor por áreas protegidas (braços fechados) e sua motivação inata para explorar novos ambientes. O comportamento tipo-ansioso (redução do tempo no braço aberto e/ou entradas nos braços abertos) pode ser determinado simultaneamente com uma medida de atividade motora espontânea (entradas totais e/ou entradas nos braços fechados) (WALF e FRYE, 2007). Os resultados do presente trabalho mostraram que não houve diferenças significantes entre os grupos controle e rotenona, em relação ao número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos. Nesse sentido, os animais do grupo rotenona não desenvolveram comportamento tipo-ansioso. Por outro lado, outros modelos da DP – paraquat, 6-OHDA, modelo genético de  $\alpha$ -sinucleína – induziram comportamento tipo-ansioso nos animais lesados, avaliado no teste do LCE (TADAIESKY et al., 2008; CAMPOS et al., 2013). De modo semelhante, Vieira et al. (2019) demonstraram que animais com lesão bilateral na SNpc, induzida por 6-OHDA, exibiram comportamento tipo-ansioso, indicado pela diminuição do tempo nos braços abertos no LCE. Ademais, neste estudo, o comportamento tipo-ansioso foi atribuído ao possível papel distinto da 5-HT em áreas relacionadas à ansiedade, com a diminuição dos níveis no córtex pré-frontal e estriado, e aumento na amígdala. Extrapolando esses achados para os



resultados do presente estudo, observamos que a administração de rotenona levou à redução dos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal e estriado. Porém, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos controle e rotenona em relação aos níveis de 5-HT na amígdala. Neste sentido, poderíamos sugerir que o comportamento tipo-ansioso estaria relacionado com o aumento dos níveis de 5-HT na amígdala. Ainda, de acordo com a hipótese de Deakin e Graeff, a 5-HT exerce um papel duplo na regulação da ansiedade e de comportamentos defensivos. Dessa forma, a via serotoninérgica ascendente DRN – amígdala reforçaria o medo condicionado, a ansiedade antecipatória e, em humanos, o transtorno de ansiedade generalizada. Em contrapartida, a via DRN – PAG dorsal inibiria comportamentos defensivos como luta ou fuga e, em humanos, os transtornos de pânico (GRAEFF, 2003). Além disso, modelos animais demonstram o papel dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> na expressão de comportamentos ansiosos. A liberação de 5-HT no DRN ativa os auto-receptores 5-HT<sub>1A</sub> que regulam negativamente a ativação do sistema serotoninérgico. Por outro lado, a liberação de 5-HT em estruturas-alvo ativa os heterorreceptores, como o 5-HT<sub>1A</sub>, presentes no hipocampo, septo, amígdala e córtex pré-frontal (CPF) (ALBERT et al., 2014). Nesse sentido, alguns estudos propõem que existem duas principais subpopulações de heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> no CPF. Estes receptores estariam presentes em neurônios piramidais glutamatérgicos que inibem sua atividade. A outra subpopulação estaria localizada em interneurônios que reduzem a inibição para aumentar a atividade dos neurônios piramidais. Modelos animais sugerem que, quando há redução dos níveis de 5-HT, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> de alta afinidade localizados nos interneurônios participam, preferencialmente, em relação às células piramidais, da redução da inibição mediada por GABA dos neurônios piramidais, levando à ativação de circuitos relacionados com a ansiedade (HOLMES, 2008; ALBERT et al., 2014).

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o efeito da administração de rotenona sobre a memória de curta duração. Os resultados demonstraram que a rotenona exerceu um efeito negativo no teste de reconhecimento social. Isso significa que os animais do grupo rotenona não diminuíram o tempo de investigação na segunda apresentação do rato juvenil, indicando um prejuízo na capacidade de reconhecer este mesmo rato após um curto intervalo (30 min) entre a primeira apresentação. Esses achados corroboram outros estudos em que ratos com lesão da via nigroestriatal apresentaram prejuízo na memória de curta duração, avaliados no

mesmo paradigma utilizado neste trabalho (TADAIESKY et al., 2008; CASTRO et al., 2013; VECCHIA et al., 2021). Barbiero et al. (2011) e (2014) demonstraram que ratos lesados com MPTP obtiveram baixos escores na tarefa de esquivar-se de duas vias, indicando um prejuízo de memória e aprendizado. Nos estudos acima mencionados, o prejuízo de memória parece estar relacionado à redução da concentração da DA no córtex pré-frontal e estriado, sugerindo que o sistema dopaminérgico nessas regiões exerce importante papel na modulação da memória e aprendizado. Entretanto, estes processos, possivelmente, têm a participação de outros sistemas, como o serotoninérgico. Hritcu et al. (2007) observaram que a infusão icv de uma neurotoxina serotoninérgica levou ao prejuízo na memória de curta duração, avaliado nos testes de alternância espontânea no labirinto em Y, e na memória operacional no labirinto radial de 8 braços. Ademais, os baixos escores obtidos nos testes foram associados com a redução dos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal. Em relação aos nossos dados obtidos no teste de reconhecimento social, o prejuízo na memória, observado no grupo rotenona, pode ser associado à redução dos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal. Embora, nosso estudo não tenha avaliado os níveis de DA estriatais, podemos sugerir que a disfunção da via nigroestriatal está envolvida no prejuízo da memória de curta duração.

Importante ressaltar que a memória social de curta duração é formada a partir de pistas olfatórias. A hiposmia (déficit olfatório) é um distúrbio não motor frequente, que ocorre nas fases prodrômica e inicial da DP (XIAO et al., 2014). Entretanto, o modelo utilizado no presente estudo – administração sistêmica de rotenona – causa uma destruição seletiva dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, e de certa forma, não afeta neurônios estriatais pós-sinápticos e neurônios de outras regiões (BETARBET et al., 2000; SHERER et al., 2003). Ademais, estudos demonstraram que a rotenona quando administrada por via intranasal foi capaz de causar a morte de neurônios dopaminérgicos no bulbo olfatório, e consequente prejuízo nas funções olfatórias de camundongos (SASAJIMA et al., 2015). Neste trabalho, a capacidade dos animais em discriminar odores não foi analisada, porém é possível sugerir que a função olfatória não estava prejudicada devido à relativa preservação dos neurônios dopaminérgicos do bulbo olfatório. Portanto, é possível atribuir os dados obtidos pelo grupo rotenona no teste de reconhecimento social como um prejuízo de memória, e não como déficit olfatório ou sensorial.

A extensão da lesão na SNpc induzida pela rotenona foi avaliada pela quantificação dos neurônios dopaminérgicos imunorreativos para TH. Os dados obtidos mostraram que no grupo rotenona houve uma redução de aproximadamente 20% dos neurônios TH-ir, em relação ao grupo controle. De forma semelhante, o protocolo utilizado na indução da lesão (2,5 mg/kg por 10 dias) já foi empregado por outros estudos e estes observaram uma redução de 21,7% dos neurônios TH-ir (BASSANI et al., 2014), e diminuição dos níveis estriatais de DA (MORAIS et al., 2012; BASSANI et al., 2014).

Um dos principais objetivos do trabalho foi avaliar o efeito do modelo da DP induzido por rotenona sobre os neurônios serotonérgicos dos núcleos da rafe. O núcleo dorsal da rafe (DRN) e o núcleo mediano da rafe (MRN) são responsáveis pela neurotransmissão serotonérgica no SNC (SOIZA-REILLY e COMMONS, 2014). Em relação ao DRN, a quantificação dos neurônios serotonérgicos imunorreativos para triptofano hidroxilase (TPH-ir) foram realizados de acordo com as sub-regiões do DRN ao longo dos níveis rostral-caudal. Nossos resultados revelaram que os ratos do grupo rotenona não apresentaram alterações significantes no número de neurônios TPH-ir nas sub-regiões do DRN (dorsal, ventral, ventrolateral, caudal e interfascicular). Curiosamente, observamos uma diminuição significativa dos neurônios TPH-ir na sub-região ventrolateral na porção média do DRN (bregma -7,80 mm). Além disso, essa redução foi encontrada em ambos os pontos temporais de 24 h e 28 dias após a última exposição de rotenona. De fato, a administração de rotenona levou a efeitos distintos nos núcleos rafe. Nesse sentido, nossos dados demonstraram uma diminuição significativa no número de neurônios TPH-ir no MRN no grupo rotenona, em comparação ao grupo controle, 28 dias após a última injeção da neurotoxina.

Esses dados corroboram, em parte, alguns estudos com diferentes modelos animais de DP. O estudo de Berghauzen-Maciejewska et al. (2016) demonstraram em ratos que a lesão intraestriatal induzida por 6-OHDA não causou uma redução de neurônios serotonérgicos no DRN. Além disso, no modelo de camundongo transgênico A53T da DP, foram detectados acúmulos de  $\alpha$ -sinucleína nos corpos celulares dos neurônios serotonérgicos do DRN e MRN. Entretanto, não foi observada a diminuição do número de neurônios TPH-ir em ambos os núcleos. Por outro lado, houve redução dos níveis de 5-HT quantificados nestes mesmos núcleos (DEUSSER et al., 2015). Diferentemente deste estudo, nossos dados mostraram que no modelo da rotenona houve redução dos neurônios TPH-ir no MRN. De fato, os resultados

relacionados aos neurônios serotoninérgicos são contraditórios. Nesse sentido, Shin et al. (2017) demonstraram que a administração sistêmica de rotenona (3,0 mg/kg por 14 dias) induziu à diminuição dos neurônios TPH-ir, e reduziu a expressão de 5-HT no DRN. Ainda, estudos em macacos com modelo de administração sistêmica de MPTP demonstraram que não foram detectadas diferenças na densidade de neurônios TPH-ir no DRN, e na morfologia somatodendrítica dos neurônios serotoninérgicos, em comparação ao controle (GAGNON et al., 2016). Dados de estudos em pacientes com DP adicionam um pouco mais de contradição aos resultados mencionados. Entretanto, alguns corroboram com os resultados do nosso trabalho. Evidências sugerem que os neurônios serotoninérgicos do MRN estão mais afetados em relação aos neurônios do DRN (HALLIDAY et al., 2011; HUOT et al., 2011). Ademais, análises *post mortem* de pacientes com DP revelaram agregados de  $\alpha$ -sinucleína nos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos TPH-ir, e estes achados foram acompanhados por uma perda neuronal no MRN (KOVACS et al. 2003). Em contrapartida, estudos *post mortem* demonstraram uma maior perda de neurônios serotoninérgicos no DRN em pacientes com DP e depressão, do que em pacientes com DP não deprimidos (PAULUS e JELLINGER, 1991).

De acordo com o que foi exposto acima, podemos levantar algumas hipóteses para explicar nossos resultados. Podemos sugerir que a administração de rotenona foi capaz de causar diminuição de neurônios serotoninérgicos em apenas um grupo de neurônios (MRN). Este achado pode ser explicado pelas evidências de que o DRN e o MRN constituem populações diferentes de neurônios com características distintas, podendo conferir às células uma maior sensibilidade. As fibras que se projetam a partir do DRN são finas e possuem pequenas varicoses, granulares ou fusiformes (axônios tipo D). As fibras que partem do MRN apresentam varicoses grandes e esféricas (axônios tipo M) e variações na espessura das fibras (MICHELSEN et al., 2008). Podemos sugerir também que a heterogeneidade dos núcleos da rafe, principalmente, do DRN, pode levar à resultados distintos de acordo com o protocolo utilizado no modelo animal, às doses das neurotoxinas, e a idade dos animais.

A avaliação dos níveis de 5-HT nas áreas que recebem projeções serotoninérgicas do DRN e MRN foi outro importante objetivo desse trabalho. Nossos resultados demonstraram que houve reduções significantes nos níveis de 5-HT no CPF e estriado. Por outro lado, a administração sistêmica de rotenona não levou à diminuição dos níveis de 5-HT na amígdala e no hipocampo.

Como mencionado anteriormente na seção introdutória, o DRN, em roedores, pode ser dividido ao longo de seu eixo rostral-caudal em sub-regiões denominadas dorsal, ventral, ventrolateral, caudal e interfascicular (MICHELSEN et al., 2008; MUZERELLE et al., 2016). A porção medial da sub-região ventral (DRV) envia projeções serotoninérgicas para o córtex pré-frontal medial (córtex infralímbico) (MUZERELLE et al., 2016). Nossos resultados não mostraram diferenças no número de neurônios TPH-ir na sub-região DRV (bregmas -7,80 mm e -8,04 mm). Entretanto, os resultados mostraram que os animais do grupo rotenona apresentaram diminuição do número de neurônios no MRN, e foi observada uma redução dos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal. Assim como a sub-região DRV, o MRN envia projeções serotoninérgicas para o córtex pré-frontal medial (MUZERELLE et al., 2016). Nosso trabalho não avaliou o conteúdo de 5-HT especificamente no componente medial do córtex pré-frontal. No entanto, podemos sugerir que a redução da neurotransmissão nessa via contribuiu, em parte, para o desenvolvimento do prejuízo na memória de curta duração. Além disso, a DA também possui um papel importante nos processos cognitivos, como no tipo de memória investigada, contribuindo também para o déficit observado nos animais tratados com rotenona. Várias funções executivas são atribuídas ao CPF como aprendizado, memória, controle inibitório e flexibilidade cognitiva (PUIG e GULLEDGE, 2011). Além disso, as projeções serotoninérgicas que chegam ao CPF também estão envolvidas com a regulação das emoções, e uma desregulação dessa via pode estar relacionada com o desenvolvimento de comportamentos tipo-depressivos (GARCIA-GARCIA et al., 2017). Dessa maneira, podemos sugerir que o comportamento tipo-depressivo no teste da natação forçada, e o prejuízo de memória no teste de reconhecimento social estão associados com a redução de neurônios TPH-ir na MRN e a redução dos níveis de 5-HT no CPF.

A análise neuroquímica do nosso estudo demonstrou que houve redução dos níveis de 5-HT no estriado dos animais do grupo rotenona. Entretanto, não foram encontradas diferenças entre os grupos no número de neurônios na sub-região dorsal do DRN (DRD), a qual envia as principais projeções para o estriado (caudado/putâmen). Neste caso, podemos sugerir que a desregulação dessa via serotoninérgica não está relacionada ao número de neurônios serotoninérgicos em si, mas relacionado com uma *downregulation* de receptores de 5-HT ou com uma redução na densidade do transportador de 5-HT (SERT) no estriado (MIGUELEZ et al., 2014). Estudos sugerem que a lesão da SNpc pode levar à redução do conteúdo

de 5-HT estriatal. Ainda, é possível que as alterações, nesse caso, ocorram primeiramente nos terminais e, então nos corpos celulares serotoninérgicos (RYLANDER et al., 2010).

Em continuação às análises neuroquímicas, os níveis de 5-HT na amígdala se mantiveram inalterados nos animais do grupo rotenona, em comparação ao grupo controle. Esse dado foi acompanhado pela ausência de alterações nas sub-regiões ventral do DRN (DRV) e dorsal (DRN), e pela ausência de comportamento tipansioso. A DRV envia a maior parte de suas projeções para a amígdala basolateral e núcleo central (MUZERELLE et al., 2016). O núcleo basolateral da amígdala é conhecido por estar envolvido na regulação do comportamento defensivo, assim como medo e ansiedade (BABAEV et al., 2018). Na sub-região ventrolateral do DRN (DRVL) na porção média (bregma -7,80 mm) houve uma redução significativa no número de neurônios TPH-ir no grupo rotenona (ambos pontos temporais 24 h e 28 dias), em relação ao controle. Especificamente, essa região envia projeções serotoninérgicas para a PAG dorsal, e essa via está envolvida na regulação de comportamentos defensivos relacionados ao pânico (VILELA-COSTA et al., 2019).

Por fim, nossos dados demonstraram que a administração de rotenona não alterou os níveis de 5-HT no hipocampo. Ademais, a redução do número de neurônios TPH-ir foi reduzido apenas no MRN. Ambos os núcleos enviam projeções: a sub-região caudal do DRN (DRC) envia eferências para o hipocampo ventral, e o MRN envia suas projeções para o hipocampo dorsal (MICHELSEN et al., 2008; MUZERELLE et al., 2016). A desregulação dessas vias tem sido atribuída a transtornos de humor, cognição e ansiedade. Nesse sentido, estudos em roedores têm demonstrado que o hipocampo dorsal está envolvido com aprendizado e memória espacial. O hipocampo ventral parece estar envolvido com a regulação do estresse, emoção e ansiedade (DALE et al., 2016; ABELA et al., 2020).

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em termos gerais, nossos resultados mostraram que a administração sistêmica de rotenona induziu à hipolocomoção no teste do campo aberto 24 h após a última aplicação da neurotoxina.

A administração de rotenona não induziu a comportamentos anedônicos nos testes da preferência por sacarose e *splash test*. Em contrapartida, o grupo rotenona exibiu comportamento tipo-depressivo no teste da natação forçada.

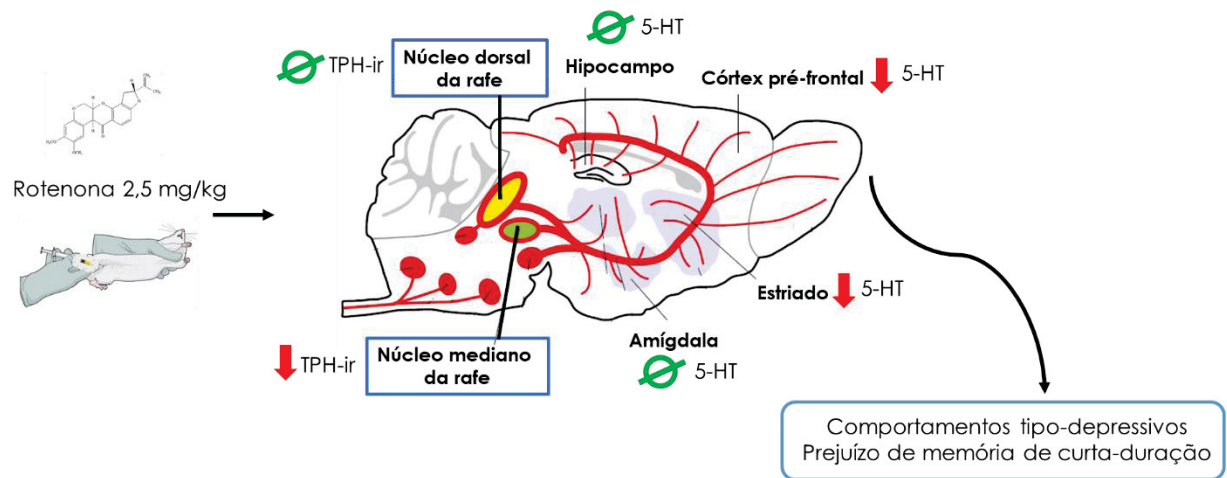
Os animais do grupo rotenona não desenvolveram comportamento tipo-ansioso no teste do LCE. Por outro lado, os animais apresentaram prejuízo de memória de curta duração avaliado no teste de reconhecimento social.

Em relação às análises imunohistoquímicas, o protocolo da rotenona empregado no trabalho induziu a uma lesão parcial da SNpc, evidenciada pela redução de cerca de 20% dos neurônios dopaminérgicos TH-ir. Além disso, a quantificação da região do MRN revelou que houve diminuição significativa do número de neurônios TPH-ir. Na análise das sub-regiões da DRN, apenas a sub-região DRVL apresentou diminuição no número de neurônios TPH-ir.

A quantificação neuroquímica dos níveis de 5-HT em estruturas-alvo da DRN e MRN, revelou que apenas no córtex pré-frontal e estriado ocorreu redução dos níveis da monoamina. Por outro lado, a administração da rotenona não induziu à redução dos níveis de 5-HT na amígdala e no hipocampo.



FIGURA 16 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS RESULTADOS DO ESTUDO



FONTE: Adaptado de LESCH e WAIDER (2012).

TPH-ir: triptofano hidroxilase imunorreativo; 5-HT: serotonina; Ø: inalterado; ↓: redução.



## 9 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que, no modelo da administração sistêmica de rotenona, apenas o núcleo mediano da rafe (MRN) parece estar envolvido no comportamento tipo-depressivo e prejuízo de memória de curta duração. Além disso, podemos sugerir que as reduções dos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal e estriado contribuíram para as alterações comportamentais acima mencionadas. Por outro lado, o comportamento tipo-depressivo observado nos animais no teste de natação forçada pode não ser dependente da 5-HT hipocampal.

É importante ressaltar o papel dos neurotransmissores DA e NA no desenvolvimento do comportamento tipo-depressivo e no prejuízo de memória no modelo da rotenona. Como perspectivas futuras, outras regiões podem ser investigadas, como o *locus coeruleus*, para o melhor entendimento das desordens não motoras no modelo animal da DP.

## REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D.; PÅHLHAGEN, S.; BALLARD, C. G.; EHRT, U.; SVENNINGSSON, P. Depression in Parkinson disease - epidemiology, mechanisms and management. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, p. 35–47, 2012.
- AARSLAND, D.; BATZU, L.; HALLIDAY, G. M.; et al. Parkinson disease-associated cognitive impairment. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 47, p. 1–21, 2021.
- ABELA, A. R.; BROWNE, C. J.; SARGIN, D.; et al. Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 168, p. 1–9, 2020.
- ALBERT, P. R.; VAHID-ANSARI, F.; LUCKHART, C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: Pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. 199, p. 1–13, 2014.
- ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA**, v. 323, n. 6, p. 548–560, 2020.
- ASSOGNA, F.; CRAVELLO, L.; CALTAGIRONE, C.; SPALLETTA, G. Anhedonia in Parkinson's disease: A systematic review of the literature. **Movement Disorders**, v. 26, n. 10, p. 1825–1834, 2011.
- BABAEV, O.; CHATAIN, C. P.; KRUEGER-BURG, D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 18, p. 1–16, 2018.
- BACQUÉ-CAZENAVE, J.; BHARATIYA, R.; BARRIÈRE, G.; et al. Serotonin in animal cognition and behavior. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1–23, 2020.
- BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. Parkinson disease. **European Journal of Neurology**, v. 27, p. 27–42, 2020.
- BALL, N.; TEO, W.; CHANDRA, S.; CHAPMAN, J. Parkinson's Disease and the Environment. **Frontiers in Neurology**, v. 10, n. 218, p. 1–8, 2019.
- BARBIERO, J. K.; SANTIAGO, R. M.; LIMA, M. M. S.; et al. Acute but not chronic administration of pioglitazone promoted behavioral and neurochemical protective effects in the MPTP model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 216, p. 186–192, 2011.
- BARBIERO, J. K.; SANTIAGO, R.; TONIN, F. S.; et al. PPAR- $\alpha$  agonist fenofibrate protects against the damaging effects of MPTP in a rat model of Parkinson's disease. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 53, p. 35–44, 2014.

BARONE, P.; ERRO, R.; PICILLO, M. Quality of Life and Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease. **International Review of Neurobiology**. 10 ed, v. 133, p.499–516, 2017. London: Elsevier Inc.

BASSANI, T. B.; GRADOWSKI, R. W.; ZAMINELLI, T.; et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain Research**, v. 1593, p. 95–105, 2014.

BELLOU, V.; BELBASIS, L.; TZOULAKI, I.; EVANGELOU, E.; IOANNIDIS, J. P. A. Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 23, p. 1–9, 2016.

BERGHAUZEN-MACIEJEWSKA, K.; WARDAS, J.; KOSMOWSKA, B.; et al. Adaptive down-regulation of the serotonin transporter in the 6-hydroxydopamine-induced rat model of preclinical stages of Parkinson's disease and after chronic pramipexole treatment. **Neuroscience**, v. 314, p. 22–34, 2016.

BERGQUIST, J.; CIUBISZ, A.; KACZOR, A.; SILBERRING, J. Catecholamines and methods for their identification and quantitation in biological tissues and fluids. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 113, p. 1–13, 2002.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; MACKENZIE, G.; et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, p. 1301–1306, 2000.

BIUNDO, R.; WEIS, L.; ANTONINI, A. Cognitive decline in Parkinson's disease: the complex picture. **npj Parkinson's Disease**, v. 2, p. 1–7, 2016.

BLAUWENDRAAT, C.; NALLS, M. A.; SINGLETON, A. B. The genetic architecture of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 19, p. 1–9, 2019.

BOUWKNECHT, J. A.; SPIGA, F.; STAUB, D. R.; et al. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Brain Research Bulletin**, v. 72, p. 32–43, 2007.

BRAAK, H.; TREDICI, Del K.; RÜBA, U.; VOS, de R. A. I.; JANSEN STEUR, E. N. H.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, p. 197–211, 2003.

BROEN, M. P. G.; LEENTJENS, A. F. G.; KOHLER, S.; KUIJF, M. L.; MCDONALD, W. M.; RICHARD, I. H. Trajectories of recovery in depressed Parkinson's disease patients treated with paroxetine or venlafaxine. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 23, p. 80–85, 2016.

BURRÉ, J.; SHARMA, M.; SÜDHOF, T. C. Cell biology and pathophysiology of  $\alpha$ -synuclein. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, p. 1–29, 2018.

- CALABRESE, V.; SANTORO, A.; MONTI, D.; et al. Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 115, p. 80–91, 2018.
- CAMPOS, F. L.; CARVALHO, M. M.; CRISTOVÃO, A. C.; et al. Rodent models of Parkinson's disease: Beyond the motor symptomatology. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n. 175, p. 1–11, 2013.
- CAN, A.; DAO, D. T.; ARAD, M.; et al. The mouse forced swim test. **Journal of Visualized Experiments**, v. 59, p. 1–5, 2012.
- CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 8, p. 464–474, 2009.
- CHIARAVALLLOTI, N. D.; IBARRETXE-BILBAO, N.; DELUCA, J.; et al. The source of the memory impairment in Parkinson's disease: Acquisition versus retrieval. **Movement Disorders**, v. 29, n. 6, p. 765–771, 2014.
- COMMONS, K. G. Ascending serotonin neuron diversity under two umbrellas. **Brain Structure and Function**, v. 221, n. 7, p. 3347–3360, 2016.
- CUNHA, M. P.; PAZINI, F. L.; LIEBERKNECHT, V.; et al. MPP<sup>+</sup>-Lesioned Mice: an Experimental Model of Motor, Emotional, Memory/Learning, and Striatal Neurochemical Dysfunctions. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 8, p. 6356–6377, 2017.
- CURRIER, M. B.; NEMEROFF, C. B. Inflammation and Mood Disorders: Proinflammatory Cytokines and the Pathogenesis of Depression. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 212–220, 2010.
- DALE, E.; PEHRSON, A. L.; JEYARAJAH, T.; et al. Effects of serotonin in the hippocampus : how SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. **CNS Spectrums**, v. 21, p. 143–161, 2016.
- DANTZER, R.; BLUTHE, R. M.; KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology**, v. 91, p. 363–368, 1987.
- DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, p. 889–909, 2003.
- DEUSSER, J.; SCHMIDT, S.; ETTLE, B.; et al. Serotonergic dysfunction in the A53T alpha-synuclein mouse model of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 135, n. 3, p. 589–597, 2015.
- DJAMSHIDIAN, A.; FRIEDMAN, J. H. Anxiety and depression in Parkinson's disease. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 16, n. 4, p. 1–13, 2014.

DORSEY, E. R.; ELBAZ, A.; NICHOLS, E.; et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 17, p. 939–953, 2018.

DUJARDIN, K.; SGAMBATO, V. Neuropsychiatric Disorders in Parkinson's Disease: What Do We Know About the Role of Dopaminergic and Non-dopaminergic Systems? **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. 25, p. 1–17, 2020.

ESTEVEZ, A. R.; CARDOSO, S. M. Differential protein expression in diverse brain areas of Parkinson's and Alzheimer's disease patients. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1–22, 2020.

FARES, M. B.; JAGANNATH, S.; LASHUEL, H. A. Reverse engineering Lewy bodies: how far have we come and how far can we go? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 22, p. 111–131, 2021.

GAGNON, D.; GREGOIRE, L.; DI PAOLO, T.; PARENT, M. Serotonin hyperinnervation of the striatum with high synaptic incidence in parkinsonian monkeys. **Brain Structure and Function**, v. 221, n. 7, p. 3675–3691, 2016.

GARCIA-GARCIA, A. L.; MENG, Q.; CANETTA, S.; et al. Serotonin Signaling through Prefrontal Cortex 5-HT 1A Receptors during Adolescence Can Determine Baseline Mood-Related Behaviors. **Cell Reports**, v. 18, n. 5, p. 1144–1156, 2017.

GIGUÈRE, N.; NANNI, S. B.; TRUDEAU, L. On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neurology**, v. 9, n. 455, p. 1–20, 2018.

GOEDERT, M.; JAKES, R.; SPILLANTINI, M. G. The Synucleinopathies: Twenty years on. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 7, p. S51–S69, 2017.

GÓMEZ-BENITO, M.; GRANADO, N.; GARCÍA-SANZ, P.; et al. Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. 356, p. 1–15, 2020.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 239–259, 2004.

GROSCH, J.; WINKLER, J.; KOHL, Z. Early degeneration of both dopaminergic and serotonergic axons – a common mechanism in Parkinson's disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, n. 293, p. 1–8, 2016.

HALE, M. W.; LOWRY, C. A. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: Implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. **Psychopharmacology**, v. 213, p. 243–264, 2011.

HALLIDAY, G. M.; LI, Y. W.; BLUMBERGS, P. C.; et al. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 27, p. 373–385, 1990.

HALLIDAY, G.; LEES, A.; STERN, M. Milestones in Parkinson's disease - Clinical and pathologic features. **Movement Disorders**, v. 26, n. 6, p. 1015–1021, 2011.

HASEGAWA, H.; NAKAMURA, K. Tryptophan Hydroxylase and Serotonin Synthesis Regulation. **Handbook of Behavioral Neuroscience**. 1o ed, v. 21, p.183–202, 2010. London: Elsevier B.V.

HAWKES, C. H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. A timeline for Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 16, n. 2, p. 79–84, 2010.

HEINZ, S.; FREYBERGER, A.; LAWRENZ, B.; et al. Mechanistic investigations of the mitochondrial complex I inhibitor rotenone in the context of pharmacological and safety evaluation. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–13, 2017.

HENSLER, J. G. Serotonergic modulation of the limbic system. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, p. 203–214, 2006.

HIJAZ, B. A.; VOLPICELLI-DALEY, L. A. Initiation and propagation of  $\alpha$ -synuclein aggregation in the nervous system. **Molecular Neurodegeneration**, v. 15, n. 19, p. 1–12, 2020.

HIRSCH, L.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, T.; PRINGSHEIM, T. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Neuroepidemiology**, v. 46, p. 292–300, 2016.

HOLMES, A. Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 1293–1314, 2008.

HRITCU, L.; CLICINSCHI, M.; NABESHIMA, T. Brain serotonin depletion impairs short-term memory, but not long-term memory in rats. **Physiology and Behavior**, v. 91, p. 652–657, 2007.

HUANG, K. W.; OCHANDARENA, N. E.; PHILSON, A. C.; et al. Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. **eLife**, v. 8, p. 1–34, 2019.

HUOT, P.; FOX, S. H.; BROTCHE, J. M. The serotonergic system in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 95, n. 2, p. 163–212, 2011.

HUOT, P.; FOX, S. H. The serotonergic system in motor and non-motor manifestations of Parkinson's disease. **Experimental Brain Research**, v. 230, n. 4, p. 463–476, 2013.

HUOT, P.; SGAMBATO-FAURE, V.; FOX, S. H.; MCCREARY, A. C. Serotonergic Approaches in Parkinson's Disease: Translational Perspectives, an Update. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 973–986, 2017.

HUSTAD, E.; AASLY, J. O. Clinical and Imaging Markers of Prodromal Parkinson's Disease. **Frontiers in Neurology**, v. 11, n. 395, p. 1–11, 2020.

ISINGRINI, E.; CAMUS, V.; LE GUIQUET, A. M.; et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. 1–8, 2010.

JIANG, T.; SUN, Q.; CHEN, S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 147, p. 1–19, 2016.

KAJI, Y.; HIRATA, K. Apathy and Anhedonia in Parkinson's Disease. **ISRN Neurology**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

KANO, O.; IKEDA, K.; CRIDEBRING, D.; et al. Neurobiology of depression and anxiety in Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

KIM, S.; KWON, S. H.; KAM, T. I.; et al. Transneuronal Propagation of Pathologic  $\alpha$ -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 103, n. 4, p. 627- 641.e7, 2019.

KISH, S. J.; TONG, J.; HORNYKIEWICZ, O.; et al. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. **Brain**, v. 131, n. 1, p. 120–131, 2008.

KOVACS, G. G.; KLÖPPEL, S.; FISCHER, I.; et al. Nucleus-specific alteration of raphe neurons in human neurodegenerative disorders. **NeuroReport**, v. 14, n. 1, p. 73–76, 2003.

KURIHARA, K.; NAKAGAWA, R.; ISHIDO, M.; et al. Impact of motor and nonmotor symptoms in Parkinson disease for the quality of life: The Japanese Quality-of-Life Survey of Parkinson Disease (JAQPAD) study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 419, p. 1–6, 2020.

LAPOINTE, N.; ST-HILAIRE, M.; MARTINOLI, M. G.; et al. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 6, p. 717–719, 2004.

LEENTJENS, A. F. G.; VAN DEN AKKER, M.; METSEMAKERS, J. F. M.; LOUSBERG, R.; VERHEY, R. J. Higher Incidence of Depression Preceding the Onset of Parkinson's Disease: A Register Study. **Movement Disorders**, v. 18, n. 4, p. 414–418, 2003.

LEMKE, M. R.; BRECHT, H. M.; KOESTER, J.; KRAUS, P. H.; REICHMANN, H. Anhedonia, depression, and motor functioning in Parkinson's disease during treatment with pramipexole. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 17, n. 2, p. 214–220, 2005.

LESCH, K. P.; WAIDER, J. Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. **Neuron**, v. 76, p. 175–191, 2012.



- LI, S.; VARGA, V.; SIK, A.; KOCSIS, B. GABAergic control of the ascending input from the median raphe nucleus to the limbic system. **Journal of Neurophysiology**, v. 94, p. 2561–2574, 2005.
- LIAN, T. H.; GUO, P.; ZUO, L. J.; et al. An investigation on the clinical features and neurochemical changes in Parkinson's disease with depression. **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, n. 723, p. 1–9, 2019.
- LIAN, T. H.; GUO, P.; ZHANG, Y. N.; et al. Parkinson's Disease with depression: The correlations between neuroinflammatory factors and neurotransmitters in cerebrospinal fluid. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 12, p. 1–8, 2020.
- LIM, J.; BANG, Y.; CHOI, H. J. Abnormal hippocampal neurogenesis in Parkinson's disease: relevance to a new therapeutic target for depression with Parkinson's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 41, p. 943–954, 2018.
- LIU, J.; DONG, J.; WANG, L.; et al. Comparative Efficacy and Acceptability of Antidepressants in Parkinson's Disease: A Network Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.
- LOAS, G.; DURU, C.; GODEFROY, O.; KRYSKOWIAK, P. Hedonic deficits in Parkinson's disease: is consummatory anhedonia specific? **Frontiers in Neurology**, v. 5, n. 24, p. 1–7, 2014.
- LOWRY, C. A.; EVANS, A. K.; GASSER, P. J.; et al. Topographical organization and chemoarchitecture of the dorsal raphe nucleus and the median raphe nucleus. **Serotonin and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects**. p.25–68, 2008. Basel: Birkhäuser Verlag.
- MADIHA, S.; HAIDER, S. Curcumin restores rotenone induced depressive-like symptoms in animal model of neurotoxicity: assessment by social interaction test and sucrose preference test. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, p. 297–308, 2019. *Metabolic Brain Disease*.
- MADIHA, S.; BATOOL, Z.; TABASSUM, S.; et al. Quercetin exhibits potent antioxidant activity, restores motor and non-motor deficits induced by rotenone toxicity. **Plos One**, v. 16, n. 11, p. 1–26, 2021.
- MAGNARD, R.; VACHEZ, Y.; CARCENAC, C.; et al. What can rodent models tell us about apathy and associated neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease? **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 3, p. e753-11, 2016.
- MAILLET, A.; KRACK, P.; LHOMMÉE, E.; et al. The prominent role of serotonergic degeneration in apathy, anxiety and depression in de novo Parkinson's disease. **Brain**, v. 139, p. 2486–2502, 2016.
- MARSH, L. Depression and Parkinson's Disease: Current Knowledge. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, n. 12, p. 1–7, 2013.



MICHELSSEN, K. A.; PRICKAERTS, J.; STEINBUSCH, H. W. M. The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. **Progress in Brain Research**, v. 172, n. 8, p. 233–264, 2008.

MIGUELEZ, C.; MORERA-HERRERAS, T.; TORRECILLA, M.; RUIZ-ORTEGA, J. A.; UGEDO, L. Interaction between the 5-HT system and the basal ganglia: functional implication and therapeutic perspective in Parkinson's disease. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, n. 21, p. 1–9, 2014.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 22–34, 2016.

MÖHLER, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 42–53, 2012.

MORAIS, L. H.; LIMA, M. M. S.; MARTYNHAK, B. J.; et al. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 1081–1090, 2012.

MORETTI, M.; NEIS, V. B.; MATHEUS, F. C.; et al. Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>). **Neurotoxicity Research**, v. 28, n. 3, p. 222–231, 2015.

MU, J.; CHAUDHURI, K. R.; BIELZA, C.; et al. Parkinson's disease subtypes identified from cluster analysis of motor and non-motor symptoms. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. 301, p. 1–10, 2017.

MÜLLER, M. L. T. M.; ALBIN, R. L.; BOHNEN, N. I. Association of Cardinal Motor Symptoms with Region-Specific Dopamine Transporter Activity in Mild to Moderate Parkinson's Disease. **European Neurology Journal**, v. 4, n. 2, p. 1–7, 2013.

MUZERELLE, A.; SCOTTO-LOMASSESE, S.; BERNARD, J. F.; SOIZA-REILLY, M.; GASPAR, P. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5 – B9) to the forebrain and brainstem. **Brain Structure and Function**, v. 221, p. 535–561, 2016.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; STAMELOU, M.; BHATIA, K. P.; BURN, D. J. The expanding universe of disorders of the basal ganglia. **The Lancet**, v. 384, p. 523–531, 2014.

O'GORMAN TUURA, R. L.; BAUMANN, C. R.; BAUMANN-VOGEL, H. Beyond dopamine: GABA, glutamate, and the axial symptoms of Parkinson disease. **Frontiers in Neurology**, v. 9, p. 1–9, 2018.

OLESCOWICZ, G.; NEIS, V. B.; FRAGA, D. B.; et al. Antidepressant and pro-neurogenic effects of agmatine in a mouse model of stress induced by chronic exposure to corticosterone. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 395–407, 2018.

- OLIVOLA, E.; PIERANTOZZI, M.; IMBRIANI, P.; et al. Serotonin impairment in CSF of PD patients, without an apparent clinical counterpart. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–5, 2014.
- PARKINSON, J. **An Essay on the Shaking Palsy**. London: Whittingham and Rowland, 1817.
- PASQUINI, J.; CERAVOLO, R.; BROOKS, D. J.; BONUCCELLI, U.; PAVESE, N. Progressive loss of raphe nuclei serotonin transporter in early Parkinson's disease: A longitudinal 123I-FP-CIT SPECT study. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 77, p. 170–175, 2019.
- PAULUS, W.; JELLINGER, K. The Neuropathologic Basis of Different Clinical Subgroups of Parkinson's Disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 50, n. 6, p. 743–755, 1991.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 5. ed., Amsterdam: Elsevier Academic, 2005.
- POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C. M.; HALLIDAY, G. M.; BRUNDIN, P.; VOLKMANN, J.; SCHRAG, A. E.; LANG, A. E. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.
- POLITIS, M.; NICCOLINI, F. Serotonin in Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 136–145, 2015.
- POURHAMZEH, M.; MORAVEJ, F. G.; ARABI, M.; et al. The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, p. 1–22, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10571-021-01064-9>>.
- PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; MIYOSHI, E.; TAKAHASHI, R. N. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 153, p. 149–157, 2004.
- PREDIGER, R. D. S.; MATHEUS, F. C.; SCHWARZBOLD, M. L.; LIMA, M. M. S.; VITAL, M. A. B. F. Anxiety in Parkinson's disease: A critical review of experimental and clinical studies. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 115–124, 2012.
- PRINGSHEIM, T.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, T. D. L. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 29, p. 1583-1590, 2014.
- PUIG, M. V.; GULLEDGE, A. T. Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits. **Molecular Neurobiology**, v. 44, n. 3, p. 449–464, 2012.
- QAMHAWI, Z.; TOWEY, D.; SHAH, B.; et al. Clinical correlates of raphe serotonergic dysfunction in early Parkinson's disease. **Brain**, v. 138, p. 2964–2973, 2015.

- REEVE, A.; SIMCOX, E.; TURNBULL, D. Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? **Ageing Research Reviews**, v. 14, p. 19–30, 2014.
- REMY, P.; DODER, M.; LEES, A.; TURJANSKI, N.; BROOKS, D. Depression in Parkinson's disease: Loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. **Brain**, v. 128, p. 1314–1322, 2005.
- ROUAUD, T.; CORBILLÉ, A. G.; LECLAIR-VISONNEAU, L.; et al. Pathophysiology of Parkinson's disease: Mitochondria, alpha-synuclein and much more.... **Revue Neurologique**, v. 177, n. 3, p. 260–271, 2021.
- RYLANDER, D.; PARENT, M.; SULLIVAN, S. S. O.; et al. Maladaptive Plasticity of Serotonin Axon Terminals in Levodopa-Induced Dyskinesia. **Annals of Neurology**, v. 68, p. 619–628, 2010.
- SANTIAGO, R. M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M. M. S.; DOMBROWSKI, P. A.; ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. B. F. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p. 1104-1114, 2010.
- SANTIAGO, R. M.; BARBIERO, J.; GRADOWSKI, R. W.; et al. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. **Behavioural Brain Research**, v. 259, p. 70–77, 2014.
- SANTIAGO, R. M.; TONIN, F. S.; BARBIERO, J.; et al. The nonsteroidal antiinflammatory drug piroxicam reverses the onset of depressive-like behavior in 6-OHDA animal model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 300, p. 246–253, 2015.
- SASAJIMA, H.; MIYAZONO, S.; NOGUCHI, T.; KASHIWAYANAGI, M. Intranasal administration of rotenone in mice attenuated olfactory functions through the lesion of dopaminergic neurons in the olfactory bulb. **NeuroToxicology**, v. 51, p. 106–115, 2015.
- SCHAPIRA, A. H. V; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, p. 435–450, 2017.
- SCHRAG, A.; TADDEI, R. N. Depression and Anxiety in Parkinson's Disease. **International Review of Neurobiology**, v. 133, p. 623–655, 2017.
- SHERER, T. B.; KIM, J. H.; BETARBET, R.; GREENAMYRE, J. T. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and  $\alpha$ -synuclein aggregation. **Experimental Neurology**, v. 179, p. 9–16, 2003.
- SHIN, M. S.; KIM, T. W.; LEE, J. M.; SUNG, Y. H.; LIM, B. V. Treadmill exercise alleviates depressive symptoms in rotenone-induced Parkinson disease rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 13, n. 2, p. 124–129, 2017.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 2012.

SOIZA-REILLY, M.; COMMONS, K. G. Unraveling the architecture of the dorsal raphe synaptic neuropil using high-resolution neuroanatomy. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, n. 105, p. 1–7, 2014.

SOIZA-REILLY, M.; GASPAR, P. From B1 to B9: a guide through hindbrain serotonin neurons with additional views from multidimensional characterization. **Handbook of Behavioral Neuroscience**. 2o ed, v. 31, p.23–40, 2020. London: Elsevier B.V.

SOUZA, L. C.; MARTYNHAK, B. J.; BASSANI, T. B.; et al. Agomelatine's effect on circadian locomotor rhythm alteration and depressive-like behavior in 6-OHDA lesioned rats. **Physiology and Behavior**, v. 188, p. 298–310, 2018.

STARKSTEIN, S. E.; BOLDUC, P. L.; MAYBERG, H. S.; PREZIOSI, T. J.; ROBINSON, R. G. Cognitive impairments and depression in Parkinson's disease: A follow up study. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 53, n. 7, p. 597–602, 1990.

STEFANOVA, E. D.; KOSTIC, V. S.; ZIROPADJA, L.; OCIC, G. G.; MARKOVIC, M. Declarative memory in early Parkinson's disease: Serial position learning effects. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 23, n. 5, p. 581–591, 2001.

STREKALOVA, T.; SPANAGEL, R.; BARTSCH, D.; HENN, F. A.; GASS, P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 2007–2017, 2004.

SURMEIER, D. J.; OBESO, J. A.; HALLIDAY, G. M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 101–113, 2017.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI, P. A.; FIGUEIREDO, C. P.; et al. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 830–840, 2008.

TANSEY, M. G.; GOLDBERG, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 3, p. 510–518, 2010.

TITOVA, N.; QAMAR, M. A.; CHAUDHURI, K. R. The Nonmotor Features of Parkinson's Disease. **International Review of Neurobiology**, v. 132, p. 33–54, 2017.

TOOMSOO, T.; RANDVER, R.; LIEPELT-SCARFONE, I.; et al. Prevalence of depressive symptoms and their association with brainstem raphe echogenicity in patients with Parkinson's disease and non-PD controls. **Psychiatry Research - Neuroimaging**, v. 268, p. 45–49, 2017.

TROEUNG, L.; EGAN, S. J.; GASSON, N. A meta-analysis of randomised placebo-controlled treatment trials for depression and anxiety in Parkinson's disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–10, 2013.

TRONCOSO-ESCUADERO, P.; PARRA, A.; NASSIF, M.; VIDAL, R. L. Outside in: Unraveling the role of neuroinflammation in the progression of Parkinson's disease. **Frontiers in Neurology**, v. 9, n. 860, p. 1–15, 2018.

TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, p. 901–905, 2017.

VECCHIA, D. D.; KANAZAWA, L. K. S.; WENDLER, E.; et al. Effects of ketamine on vocal impairment, gait changes, and anhedonia induced by bilateral 6-OHDA infusion into the substantia nigra pars compacta in rats: Therapeutic implications for Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 342, p. 1–10, 2018.

VECCHIA, D. D.; KANAZAWA, L. K. S.; WENDLER, E.; et al. Ketamine reversed short-term memory impairment and depressive-like behavior in animal model of Parkinson's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 168, p. 63–73, 2021.

VIEIRA, J. C. F.; BASSANI, T. B.; SANTIAGO, R. M.; et al. Anxiety-like behavior induced by 6-OHDA animal model of Parkinson's disease may be related to a dysregulation of neurotransmitter systems in brain areas related to anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 371, p. 1–6, 2019.

VILELA-COSTA, H. H.; SPIACCI, A.; BISSOLLI, I. G.; ZANGROSSI, H. A Shift in the Activation of Serotonergic and Non-serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe Lateral Wings Subnucleus Underlies the Panicolytic-Like Effect of Fluoxetine in Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 9, p. 6487–6500, 2019.

VRIEND, C.; BOEDHOE, P. S. W.; RUTTEN, S.; et al. A smaller amygdala is associated with anxiety in Parkinson's disease: A combined FreeSurfer - VBM study. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 87, n. 5, p. 493–500, 2016.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.

WASELUS, M.; VALENTINO, R. J.; BOCKSTAELE, E. J. VAN. Collateralized dorsal raphe nucleus projections: A mechanism for the integration of diverse functions during stress. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 41, p. 266–280, 2011.

WEE, N.; WEN, M. C.; KANDIAH, N.; et al. Neural correlates of anxiety symptoms in mild Parkinson's disease: A prospective longitudinal voxel-based morphometry study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 371, p. 131–136, 2016.

WEINTRAUB, D.; DOSHI, J.; KOKA, D.; et al. Neurodegeneration across stages of cognitive decline in Parkinson disease. **Archives of Neurology**, v. 68, n. 12, p. 1562–1568, 2011.

WEINTRAUB, D.; HAUSER, R. A.; ELM, J. J.; et al. Rasagiline for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: A placebo-controlled trial. **Movement Disorders**, v. 31, n. 5, p. 709–714, 2016.

WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited : Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, p. 90–110, 2005.

WILSON, H.; DERVENOULAS, G.; PAGANO, G.; et al. Serotonergic pathology and disease burden in the premotor and motor phase of A53T  $\alpha$ -synuclein parkinsonism: a cross-sectional study. **The Lancet Neurology**, v. 18, p. 748–759, 2019.

WINNER, B.; REGENSBURGER, M.; SCHREGLMANN, S.; et al. Role of  $\alpha$ -synuclein in adult neurogenesis and neuronal maturation in the dentate gyrus. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 47, p. 16906–16916, 2012.

XIAO, Q.; CHEN, S.; LE, W. Hyposmia: A possible biomarker of Parkinson's disease. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 134–140, 2014.

YALCIN, I.; AKSU, F.; BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **European Journal of Pharmacology**, v. 514, p. 165–174, 2005.

YOSHIMOTO, K.; UEDA, S.; KITAMURA, Y.; et al. Administration of rotenone enhanced voluntary alcohol drinking behavior in C57BL/6J mice. **Legal Medicine**, v. 14, p. 229–238, 2012.

ZAMINELLI, T.; GRADOWSKI, R. W.; BASSANI, T. B.; BARBIERO, J. K.; SANTIAGO, R. M.; FERREIRA, D. M.; BAGGIO, D. H.; VITAL, M. A. B. F. Antidepressant and antioxidative effect of ibuprofen in the rotenone model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 26, p. 351-362, 2014.