

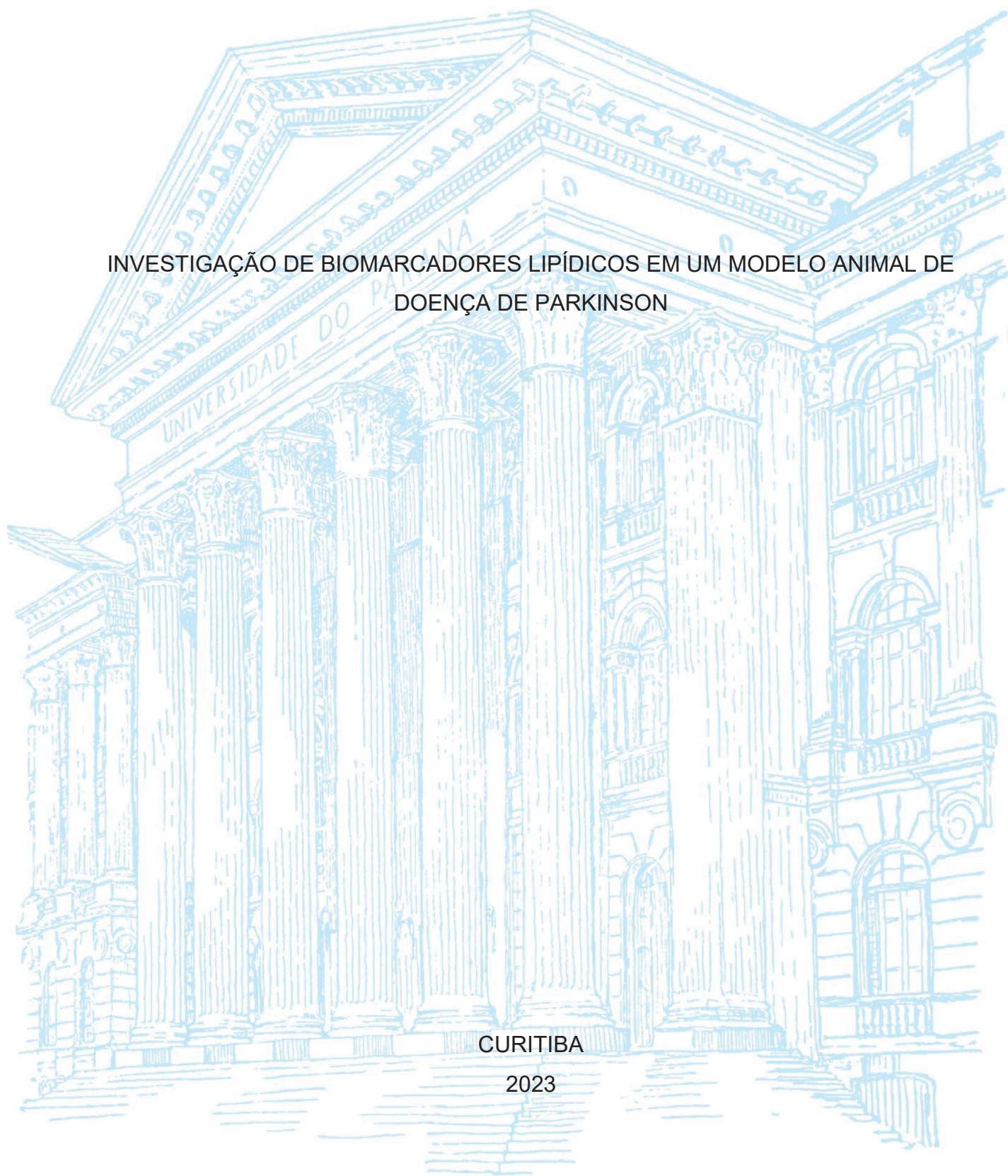
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA CHUPROSKI

INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EM UM MODELO ANIMAL DE
DOENÇA DE PARKINSON

CURITIBA

2023



ANA PAULA CHUPROSKI

INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EM UM MODELO ANIMAL DE
DOENÇA DE PARKINSON

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em
Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima

Curitiba

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Chuproski, Ana Paula.

Investigação de biomarcadores lipídicos em um modelo animal de Doença de Parkinson. / Ana Paula Chuproski. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima.

1. Parkinson, Doença de. 2. Rotenona. 3. Colesterol. 4. Dieta Hiperlipídica. 5. Apolipoproteínas E. I. Lima, Marcelo de Meira Santos, 1978-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. III. Título.

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM FISILOGIA

No dia quatro de maio de dois mil e vinte e tres às 13:30 horas, na sala 103, Auditório do Departamento de Fisiologia da UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **ANA PAULA CHUPROSKI**, intitulada: **INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON.**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), BRUNO JACSON MARTYNHAK (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), LETICIA FRACARO (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATOLICA DO PARANÁ- PUCPR), LYVIA LINTZMAIER PETIZ (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutora está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 04 de Maio de 2023.

Assinatura Eletrônica

11/05/2023 15:45:16.0

MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/05/2023 11:53:31.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

11/05/2023 15:37:31.0

LETICIA FRACARO

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATOLICA DO PARANÁ- PUCPR)

Assinatura Eletrônica

05/05/2023 10:25:58.0

LYVIA LINTZMAIER PETIZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA PAULA CHUPROSKI** intitulada: **INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON.**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA, 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, 04 de Maio de 2023.

Assinatura Eletrônica

11/05/2023 15:45:16.0

MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/05/2023 11:53:31.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

11/05/2023 15:37:31.0

LETICIA FRACARO

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
PARANÁ- PUCPR)

Assinatura Eletrônica

05/05/2023 10:25:58.0

LYVIA LINTZMAIER PETIZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Ao misericordioso Deus, que me agracia com tantos dons e me fortalece na caminhada.

À minha família e a meu namorado, Rodrigo, pela paciência, parceria, estímulo e carinho comigo. Por serem esse porto seguro e sempre me apoiarem nas decisões da minha vida. Vocês também fazem parte desta conquista!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima, pela atenção, oportunidade e confiança em mim depositada, pela disponibilidade e por todos os conhecimentos compartilhados comigo.

Aos professores membros da banca de qualificação, professores Bruno Martynhak e Anita Nishiyama pelas importantes contribuições que ampliaram nosso raciocínio e enriqueceram a versão final deste trabalho.

Aos professores membros da banca de defesa, pelo aceite e disponibilidade, contribuindo enormemente para o aprimoramento científico deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório do departamento de Fisiologia da UFPR, especialmente ao Fábio Caetano, pela presteza e auxílio na utilização dos laboratórios, empréstimo de materiais e reagentes, os quais facilitaram/viabilizaram a execução deste projeto de pesquisa.

À profa. Dra. María Eugenia Balbi, coordenadora do Laboratório de Bromatologia da UFPR, pela presteza e apoio concedido para a realização das análises da composição nutricional das rações. Seu auxílio foi indispensável à realização deste trabalho!

Aos funcionários do biotério, pela atenção e cuidado prestado aos animais utilizados nesta pesquisa.

Aos queridos colegas do laboratório de Neurofisiologia, pós-graduandos e alunos de IC, com quem convivi nesses anos. Agradeço a vocês por toda a troca de conhecimentos, pelos momentos de descontração e parceria nos dias de trabalho.

Aos pacientes neurológicos, muitos deles Parkinsonianos, que atendi e atendo na clínica como fonoaudióloga, quem, primeiramente, motivou (e motiva) minha escolha acadêmica pela Neurociência.

À Universidade Federal do Paraná, instituição pela qual tenho grande carinho e respeito e tornou-se minha segunda casa nesses anos, pela oportunidade em realizar meus estudos. Com orgulho, serei doutora pela UFPR!

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À minha família, amigos e a todas as pessoas que passaram por minha vida nesses 5 anos e me ajudaram, me fortaleceram e me apoiaram nesta caminhada, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença crônica, degenerativa e progressiva caracterizada tipicamente pela perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SN_{pc}) do mesencéfalo. Recentemente, tem ganhado maior relevância a influência da vias de sinalização lipídica e metabolismo, seu impacto na fisiopatologia da doença e nos sintomas não-motores. O objetivo geral deste trabalho é investigar os marcadores lipídicos relacionados ao comportamento tipo-depressivo em um modelo animal de doença de Parkinson induzida por rotenona. O capítulo I avalia o efeito agudo e precoce da lesão intranigral bilateral com rotenona (12 µg/µL) sobre os marcadores bioquímicos (perfil lipídico e glicemia) e comportamento motor dos animais. Aproximadamente após 24 horas da cirurgia estereotáxica, a lesão causou redução do colesterol total (P=0.04) e do HDL-colesterol (P=0.007) e redução de atividade locomotora no teste de campo aberto. Além disso, os animais submetidos à lesão apresentaram hiperglicemia, demonstrando os efeitos sistêmicos da exposição aguda à neurotoxina. O capítulo II, a fim de padronizar um modelo de dislipidemia, avalia os efeitos bioquímicos e comportamentais da High fat diet (HFD) (contendo 35% das calorias provenientes de gorduras) em três diferentes tempos de exposição (6, 8 ou 10 semanas). Parâmetros morfométricos e nutricionais (consumo alimentar, peso corporal e adiposidade), perfil lipídico, comportamento motor e comportamento tipo depressivo foram avaliados. Observou-se aumento de triglicerídeos, colesterol total e LDL-C nos grupos HFD após 6 e 8 semanas. O grupo HFD 8 semanas também apresentou maior tempo de imobilidade após 8 semanas. Coletivamente, esses resultados demonstram que a HFD produziu um fenótipo dislipidêmico sobretudo após 6 semanas de exposição além dos déficits comportamentais nos animais. Por fim, o capítulo III caracteriza as alterações bioquímicas, comportamentais, histológicas e moleculares, combinando os modelos de DP induzida por rotenona intranigral (12 µg/µL) e dislipidemia induzida pela HFD. Novamente, a HFD foi eficaz em reproduzir o fenótipo dislipidêmico com alterações expressivas nos marcadores lipídicos e glicemia. A lesão intranigral levou ao comportamento tipo-depressivo, confirmado pela degeneração dopaminérgica na SN e redução da expressão do BDNF no hipocampo dos animais. Expressão aumentada de ApoE na substância negra foi observada em um dos *time points* avaliados, assim como redução significativa dos níveis de GFAP na substância negra. Os resultados mostram que a lesão intranigral produz alterações metabólicas sistêmicas desde períodos mais agudos de exposição. ApoE pode ser um marcador chave para a DP, especialmente em estágios mais precoces.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Rotenona; High fat diet; Colesterol; ApoE.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a chronic, degenerative and progressive disease typically characterized by loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of the midbrain. Recently, the influence of lipid signaling pathways and metabolism has gained greater relevance, its impact on the pathophysiology of the disease and on non-motor symptoms. The general objective of this work is to investigate lipid markers related to depressive-like behavior in an animal model of rotenone-induced Parkinson's disease. Chapter I evaluates the acute and early effect of bilateral intranigral injury with rotenone (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) on biochemical markers (lipid profile and blood glucose) and motor behavior of animals. Approximately 24 hours after stereotaxic surgery, the lesion caused a reduction in total cholesterol ($P=0.04$) and HDL-cholesterol ($P=0.007$) and a reduction in locomotor activity in the open field test. In addition, the animals subjected to the injury showed hyperglycemia, demonstrating the systemic effects of acute exposure to the neurotoxin. Chapter II, in order to standardize a model of dyslipidemia, evaluates the biochemical and behavioral effects of a High fat diet (HFD) (containing 35% of calories from fat) at three different exposure times (6, 8 or 10 weeks). Morphometric and nutritional parameters (food consumption, body weight and adiposity), lipid profile, motor behavior and depressive-like behavior were evaluated. An increase in triglycerides, total cholesterol and LDL-C was observed in the HFD groups after 6 and 8 weeks. The 8-week HFD group also had a longer immobility time after 8 weeks. Collectively, these results demonstrate that HFD produced a dyslipidemic phenotype mainly after 6 weeks of exposure in addition to behavioral deficits in the animals. Finally, Chapter III characterizes the biochemical, behavioral, histological and molecular changes, combining the models of PD induced by intranigral rotenone (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and HFD-induced dyslipidemia. Again, HFD was effective in reproducing the dyslipidemic phenotype with significant changes in lipid markers and blood glucose. The intranigral lesion led to depressive-like behavior, confirmed by dopaminergic degeneration in the SN and reduced BDNF expression in the animals' hippocampus. Increased ApoE expression in the substantia nigra was observed at one of the evaluated time points, as well as a significant reduction in GFAP levels in the substantia nigra. The results show that the intranigral lesion produces systemic metabolic alterations from the most acute periods of exposure. ApoE may be a key marker for PD, especially in the earlier stages.

Key-words: Parkinson's disease; Rotenone; High fat diet; Cholesterol; ApoE.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MARCADORES NEUROPATOLÓGICOS DA DOENÇA DE PARKINSON	19
FIGURA 2 – ESTRUTURA DE UMA APOLIPOPROTEÍNA	28
FIGURA 3 - ESTRUTURA DA APOLIPOPROTEÍNA E (ApoE)	30
FIGURA 4 - SÍNTESE ENDÓGENA DO COLESTEROL NO ENCÉFALO	33
FIGURA 5 – CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	48
FIGURA 6 – TESTE DE CAMPO ABERTO.....	49
FIGURA 7 - COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À DEPRESSÃO AVALIADOS NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	50
FIGURA 8 – TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE.....	51
Figure 1. Motor Behavioral disruption induced by intranigral rotenone.....	63
Figure 2. Biochemical alterations inflicted by intranigral rotenone.....	64
Figure 1. Weight evolution over the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD), in weeks	81
Figure 2. Swimming time over the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD), in weeks	82
Figure 3. Immobility time over the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD), in weeks	83
Figure 4. Locomotion distance over the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD), in weeks	84
Supplementary Figure 1. Changes in the retroperitoneal, perigonadal and mesenteric adipose tissues weights during the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD), in weeks.	87
Figure 1. Experimental design.....	102
Fig. 2. Weight evolution, adiposity tissues and caloric intake over the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD) between the groups	107
Figure 3. Biochemical analysis	109
Fig. 4. Depressive-like behaviors during the modified forced swimming test	111
Fig 5. Anhedonic behavior and motor assessments	112
Figure 7. Immunohistochemistry of TH-ir neurons in the SNpc	114
Figure 8. Western Blot analysis.....	116

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PRINCIPAIS CLASSES DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS	29
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS CONTROLE E HIPERCALÓRICA (HIGH FAT DIET).....	47
TABELA 3 - ANÁLISES BIOQUÍMICAS	53
CAPÍTULO 1	
TABLE 1 – PEARSON’S CORRELATIONS BETWEEN BIOCHEMICAL AND MOTOR PARAMETERS	65
CAPÍTULO 2	
TABLE 1 – NUTRITIONAL COMPOSITION OF STANDARD DIET (SD) VERSUS HIGH FAT DIET (HFD).....	80
TABLE 2 – METABOLIC CHANGES, IN THE PLASMA, INDUCED BY HFD EXPOSURE COMPARED TO SD OVER THE WEEKS.....	86
CAPÍTULO 3	
TABLE 3 – NUTRITIONAL COMPOSITION OF STANDARD DIET (SD) VERSUS HIGH FAT DIET (HFD).....	101

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

27-OHC	-27-hydroxycholesterol
24-OHC	- 24-hydroxycholesterol
6-OHDA	- 6-hidroxidopamina
α -syn	- alfa-sinucleína
AI	- <i>Adiposity index</i>
ApoE	- Apolipoproteína E
BDNF	- Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CSF	- <i>Cerebrospinal Fluid</i>
CT	- Colesterol total
DAT	- <i>Dopamine transporter</i>
DM2	- Diabetes Mellitus tipo 2
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DP	- Doença de Parkinson
GFAP	- Proteína ácida fibrilar glial
GWAS	- <i>Genome Wide Association Study</i>
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HFD	- <i>High fat diet</i>
HMG-CoA	- β -hydroxy- β methylglutaryl-CoA
IDL	- Lipoproteína de densidade intermediária
IL-6	- Interleucina-6
LB	- <i>Lewy body</i> (corpos de Lewy)
LCR	- Líquido Cefalorraquidiano/ Líquor
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
MDS	- <i>International Parkinson's and Movement Disorder Society</i>
MFST	- <i>Modified forced swimming test</i>
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NT	- <i>Neurotrophins family</i>

OFT	- <i>Open Field Test</i>
PD	- Parkinson's Disease
PON1	- Paraoxonase-1
PUFA's	- Ácidos graxos poliinsaturados
SD	- <i>Standard diet</i>
SNpc	- Substância Negra pars compacta
SREBP's	- Proteínas de ligação a elementos reguladores de esteróis
TG	- Triglicerídeos
TP	- <i>Time point</i>
TH	- Tirosina hidroxilase
TNF- α	- Fator de necrose tumoral α
UPDRS	- Unified Parkinson's Disease Rating Scale
VLDL	- Lipoproteína de muito baixa densidade
WB	- <i>Western Blot</i>
WD	- <i>Western Diet</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 DOENÇA DE PARKINSON.....	16
2.1.1 Fisiopatologia.....	17
2.1.2 Diagnóstico e tratamento	21
2.1.3. Sintomas não motores da doença de Parkinson	23
2.1.4 Modelos animais de DP	26
2.2 LIPÍDIOS E LIPOPROTEÍNAS.....	27
2.2.1 Metabolismo lipídico no encéfalo	31
2.2.2 Dislipidemias.....	34
2.2.3 Alterações metabólicas e doença de Parkinson	37
3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES	41
4 OBJETIVOS	42
4.1 OBJETIVO GERAL	42
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5 MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1 ANIMAIS	44
5.2 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS	44
5.3 DIETAS.....	45
5.4 PESO CORPORAL	47
5.5 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	47
5.6 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	49
5.6.1 Teste de Campo Aberto.....	49
5.6.2 Teste de natação forçada	50
5.6.3 Teste de preferência de sacarose.....	51
5.7 DISSECAÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS	51
5.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	52
5.9 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	53
5.10 WESTERN BLOT	54
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
6 RESULTADOS	57
CAPÍTULO 1	57

Metabolic dysfunctions in the intranigral rotenone model.....	57
of Parkinson's disease	57
CAPÍTULO 2	75
Long-term exposure to a high fat diet is able to produce metabolic impairment and depressive-like behaviors.....	75
CAPÍTULO 3	97
High-fat diet induces dyslipidemia and exacerbates depressive-like behavior in the rotenone model of parkinson's disease	97
7 DISCUSSÃO	130
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
REFERÊNCIAS	137
ANEXOS	159
ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO PROJETO NO CEUA-UFPR	159

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum relacionada à idade. Possui fisiopatologia complexa, de caráter progressivo e irreversível, com prevalência estimada em 0,3% da população mundial e 1% a 4% da população idosa. É caracterizada neuropatologicamente pela degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta e pelo acúmulo de agregados proteicos citoplasmáticos, os corpos de Lewy, em uma topografia específica no Sistema Nervoso Central (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). A etiologia da DP ainda não é totalmente conhecida, embora pesquisas sugiram uma multicausalidade resultante da combinação de fatores, como genética, agentes ambientais e o próprio processo de envelhecimento.

Clinicamente, a DP caracteriza-se por manifestações motoras típicas que incluem tremor, bradicinesia, instabilidade postural e rigidez. Contudo, a DP é uma doença multidimensional com um espectro de alterações não-motoras, de alta prevalência e com grande impacto na qualidade de vida e manejo clínico dos pacientes (POSTUMA *et al.*, 2012; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). Os sintomas clínicos não motores da DP referem-se a uma combinação de distúrbios do sono, disfunção autonômica, complicações sensoriais, déficits olfativos e problemas neuropsiquiátricos. Entre os sintomas não motores de maior prevalência, destacam-se os sintomas depressivos, ocorrendo entre 40% e 90% dos pacientes, a depender dos critérios utilizados nos estudos (MARSH, 2013; REICHMANN; SCHNEIDER; LÖHLE, 2009).

Atualmente, as pesquisas envolvendo aspectos relacionados ao estilo de vida e fatores nutricionais no contexto das doenças neurodegenerativas têm ganhado relevância. Nesse sentido, diferentes evidências apontam para a influência do metabolismo, de marcadores e alterações metabólicas na fisiopatologia e progressão da DP. O encéfalo é um órgão essencialmente lipídico, de alta taxa metabólica e com vias de metabolismo endógenas, o que torna particularmente específica e importante a manutenção da homeostase lipídica para a função neuronal normal (MAHLEY, 2016a; ZHANG; LIU, 2015).

Nesse sentido, muitas evidências apontam o papel-chave de lipoproteínas e lipídios para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. As dislipidemias compreendem um conjunto amplo de anormalidades nos níveis lipídicos, relacionadas ao sobrepeso e obesidade, levando a um maior risco de doenças cardiovasculares e aterosclerose (PIRILLO *et al.*, 2021). Além disso, diferentes evidências mostram que os efeitos da *high fat diet* promovem dislipidemia, hiperglicemia, e um estado crônico de inflamação de baixo grau pode ter um impacto negativo no Sistema Nervoso Central, particularmente nos transtornos de humor (HASSAN *et al.*, 2019; TSAI *et al.*, 2022; VAGENA *et al.*, 2019).

Quanto à DP, alguns estudos indicam que um aumento dos níveis de colesterol estaria relacionado a um aumento do risco da DP ou, ao contrário, uma redução do risco da doença, ou seja, os estudos ainda são insuficientes e controversos em indicar uma possível relação causal nesse sentido (FANG *et al.*, 2020; JIN; PARK; PARK, 2019; WANG, *et al.*, 2021). A apolipoproteína E (ApoE) é a principal lipoproteína do encéfalo e considerada o maior fator de risco genético para a doença de Alzheimer esporádica (TZIORAS *et al.*, 2019). Atualmente, pesquisas têm buscado investigar a sua influência na DP (SHI *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2020).

Em conjunto, esses estudos sugerem que alterações na homeostase lipídica cerebral podem contribuir para vias neurodegenerativas na DP e, possivelmente, também para os sintomas depressivos, altamente prevalentes entre os pacientes. Um melhor conhecimento sobre as manifestações fisiopatológicas no que se refere aos marcadores lipídicos pode ser útil na exploração de novos biomarcadores diagnósticos e prognósticos da doença, além de melhor explicitar a relação entre essas condições crônicas. Considerando a relevância do tema, o presente trabalho buscou investigar amplamente os marcadores lipídicos relacionados ao comportamento tipo-depressivo em um modelo animal de doença de Parkinson induzida pela neurotoxina rotenona.

A fim de responder ao nosso objetivo, os resultados que compõem a presente tese foram divididos em três seções (capítulos) que se referem a experimentos diferentes e foram escritos na forma de artigo científico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) foi descrita inicialmente em 1817, pelo médico inglês James Parkinson, a partir da publicação do artigo “*An essay on the Shaking Palsy*”, em que descrevia anormalidades motoras ainda desconhecidas de seis casos de pacientes. Parkinson a denominou “Paralisia Agitante” devido à presença de movimentos tremulantes involuntários, redução da força muscular, tendência à inclinação do tronco e alteração de marcha (PARKINSON, 1817). Posteriormente, o neurologista francês Jean Martin Charcot fez uma descrição clínica mais detalhada, definindo os sinais cardinais da doença e apontando também para a existência de alterações cognitivas (TEIVE *et al.*, 2001).

Atualmente, a DP é considerada a 2ª doença neurodegenerativa mais comum relacionada à idade, superada apenas pela doença de Alzheimer, com prevalência de cerca de 0,3% da população total e 1-2% na população acima de 65 anos (PRINGSHEIM *et al.*, 2014). Na Europa, estima-se que no ano de 2030, existirão aproximadamente oito milhões de pessoas portadoras da doença (DORSEY *et al.*, 2007). No Brasil, não há dados oficiais consolidados sobre o número de pacientes com a doença, mas um estudo estimou que 3,3%, dentre os idosos com idade maior ou igual a 65 anos, possuam DP (BARBOSA *et al.*, 2006). Em decorrência da elevação da expectativa de vida e o conseqüente envelhecimento da população, é esperado um significativo aumento no número de casos da DP, apontando a idade como o principal fator de suscetibilidade para o desenvolvimento da doença (POEWE *et al.*, 2017; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020).

A DP surge geralmente entre os 50 e os 80 anos de idade, com um pico de incidência na sétima década de vida. Além da idade, também se observa que a DP é mais prevalente no sexo masculino (proporção 1,5:1), o que poderia ser atribuído a um possível papel neuroprotetor do hormônio estrogênio a mecanismos genéticos ligados ao sexo ou até mesmo diferenças na exposição a fatores de risco ambientais (POEWE *et al.*, 2017).

A causa da doença ainda não é totalmente definida. Contudo, acredita-se que uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais esteja envolvida, conferindo-lhe uma etiologia multifatorial (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). A maior parte dos casos de DP é idiopática, mas uma pequena parte (5% a 10% dos casos) pode ser atribuída a formas familiares da doença, sendo as mutações monogênicas nos genes SNCA, GBA e LRRK2 as mais descritas, ocorrendo geralmente nos indivíduos com início mais precoce da DP. O forte componente genético de risco para a doença foi confirmado por um recente e abrangente estudo, o Genome Wide Association Study (GWAS) o qual identificou cerca de 90 *loci* com variantes patogênicas para a doença (NALLS *et al.*, 2019).

Entre os fatores de risco ambientais, destacam-se as exposições a contaminantes, como pesticidas e herbicidas (TANNER *et al.*, 2011), metais pesados e, até mesmo, condições adquiridas, como infecções e trauma craniano ligadas ao maior risco de DP esporádica (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). Quanto ao fator idade, o próprio envelhecimento predispõe a um aumento do status neuroinflamatório e estresse oxidativo que compromete a função e sobrevivência dos neurônios, (STEINER; QUANSAH; BRUNDIN, 2018), principalmente da região da substância negra, devido à presença de dopamina, altas quantidades de ferro e neuromelanina (SMEYNE; SMEYNE *et al.*, 2013).

2.1.1 Fisiopatologia

A principal característica neuropatológica da doença de Parkinson é a degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc) do mesencéfalo (HUSTAD; AASLY, 2020; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). Macroscopicamente, observa-se a despigmentação da SNpc devido à perda de neuromelanina, um produto da auto-oxidação da dopamina (Figuras 1A, 1B e 1C) (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). Como os núcleos dos neurônios dopaminérgicos da SNpc projetam eferências para o estriado, há uma redução da entrada de dopamina no estriado, prejudicando a sinalização da via nigroestriatal (OBESO *et al.*, 2000). O circuito dos núcleos da base está envolvido diretamente no controle da motricidade voluntária e em várias funções cognitivas, modulando o fluxo

de informação do córtex cerebral para os neurônios motores da medula espinhal (CALABRESI *et al.*, 2014).

O segundo marcador neuropatológico da DP idiopática é a presença de agregados proteicos insolúveis no citoplasma dos neurônios, os corpos de Lewy (do inglês Lewy Bodies - LB). Braak *et al.* (2003) descreveu a presença dos LB em encéfalos *post mortem* de pacientes com a DP. Além disso, três mutações do gene PARK1/SNCA, que codifica a proteína alfa-sinucleína (α -syn) causam uma forma autossômica dominante da doença (DUNNING; GEORGE; BRUNDIN, 2013). Animais que superexpressam esse gene desenvolvem sintomas parkinsonianos e exibem os marcadores motores típicos da DP (CHEN *et al.*, 2022; GIASSEN *et al.*, 2002).

O principal componente proteico dos LB é a proteína α -syn, um pequeno polipeptídeo citoplasmático de 140 aminoácidos (peso molecular 14 kDa) encontrado principalmente nos terminais nervosos pré-sinápticos que está envolvida na montagem dos complexos SNARE (JAN *et al.*, 2021; STEINER; QUANSAH; BRUNDIN, 2018). Quando anormalmente fosforilada e oxidada, com solubilidade anormal, sua forma monomérica é propensa à formação de agregados e fibrilas insolúveis (XIA *et al.*, 2009). Essa conformação anômala é neurotóxica, culminando na morte celular, principalmente dos neurônios dopaminérgicos (DUNNING; GEORGE; BRUNDIN, 2013).

Uma hipótese mais atual da sinucleinopatia na DP postula que a formação dos LB seguiria um mecanismo *prion-like*, em que a proteína segue uma sequência de eventos dobrando-se incorretamente (*misfolded*) e transmitindo esses agregados proteicos a outras células (DUNNING; GEORGE; BRUNDIN, 2013; JAN *et al.*, 2021; KORDOWER *et al.*, 2008; STEINER; QUANSAH; BRUNDIN, 2018).

Segundo a deposição dos LB, foi proposto um modelo de estadiamento clínico da DP cuja progressão se daria em uma sequência topográfica específica dividida em seis estágios neuropatológicos. Segundo esse modelo, inicialmente, há o envolvimento de áreas extranigrais do Sistema Nervoso, o qual coincide com a fase prodrômica da doença (BRAAK *et al.*, 2004). Os estágios 1 e 2 caracterizam-se pelo acometimento do núcleo motor dorsal do nervo vago (X par craniano) e no bulbo olfatório e correspondem à disfunção autonômica e prejuízo olfatório. Em seguida, nos estágios 3 e 4, os pacientes apresentam os sintomas motores parkinsonianos típicos. Por fim, há o acometimento de regiões corticais (estágios 5 e 6), resultando em sinais

e sintomas, como a demência, e distúrbios emocionais (BRAAK *et al.*, 2003) (Figura 1).

Outro marcador que está sendo relacionado à DP é o transportador de dopamina (DAT, do inglês *dopamine transporter*). Os níveis de DAT podem ser considerados preditores da integridade e do número de neurônios dopaminérgicos. A redução nos níveis desse transportador no estriado acomete 95% dos pacientes com a DP (WANG *et al.*, 2013).

FIGURA 1 – MARCADORES NEUROPATOLÓGICOS DA DOENÇA DE PARKINSON

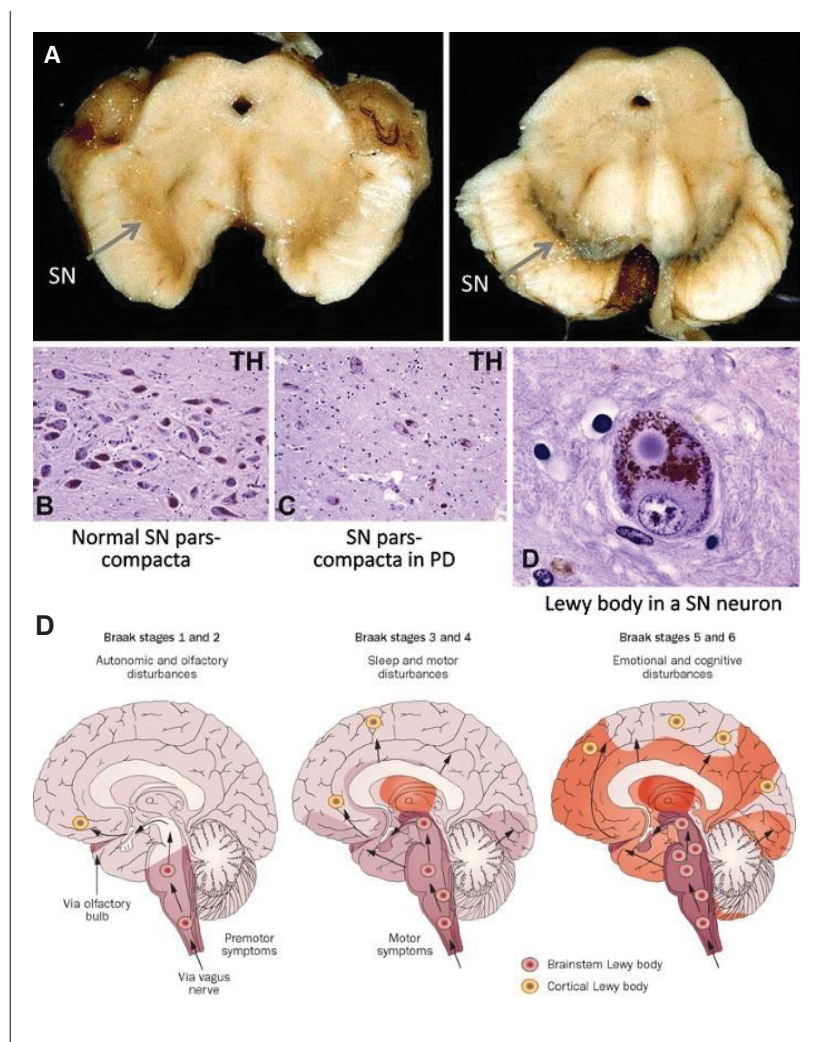


FIGURA 1 – Marcadores neuropatológicos na doença de Parkinson. **A.** Despigmentação da substância negra pars compacta devido à morte dos neurônios dopaminérgicos (**B**) (MANDEL *et al.*, 2010). **C.** Agregados protéicos formados principalmente da proteína alfa-sinucleína formando inclusões eosinofílicas no citoplasma dos neurônios, chamados Corpos de Lewy (Lewy Bodies). **D.** Distribuição topográfica dos corpos de Lewy no Sistema Nervoso em estágios da doença definidos por Braak *et al.* (2003).

Na DP, além da via nigroestriatal, outras vias dopaminérgicas, como as vias mesolímbica e mesocortical, também podem estar acometidas. Essas outras vias dopaminérgicas relacionam-se com estruturas, como o córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo, refletindo-se em alterações cognitivas e emocionais presentes na doença (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

A degeneração neuronal na DP compreende vários eventos moleculares ainda não totalmente entendidos, incluindo acúmulo de proteínas, dano mitocondrial, estresse oxidativo, neuroinflamação, autoimunidade, apoptose, excitotoxicidade, desregulação homeostática do cálcio, bem como como autofagia e disbiose (TIZABI; GETACHEW; ASCHNER, 2021).

A neuroinflamação e a ativação da micróglia desempenham um papel fundamental na patogênese da DP, seja como causa ou consequência da perda de células nigrais (GELDERS; BAEKELANDT; VAN DER PERREN, 2018). Aumento de mediadores inflamatórios tem sido observado em modelos animais da DP ou em resposta à formação de agregados de alfa-sinucleína (PAJARES *et al.*, 2020). Pacientes com DP idiopática apresentam uma ativação microglial intensa nos núcleos da base, córtex frontal e temporal, quando comparadas com os controles saudáveis de idades semelhantes (GERHARD *et al.*, 2006).

A disfunção mitocondrial é um outro importante aspecto na fisiopatologia da DP. A mitocôndria é responsável pela maior parte da síntese de adenosina trifosfato (ATP) na célula, sendo que uma falha no suprimento energético tem diferentes consequências deletérias no ambiente celular (HATTORI; MIZUNO, 2002). Pacientes com DP têm menor atividade do complexo I mitocondrial (KEENEY *et al.*, 2006). Modelos animais da doença e toxinas ambientais têm como mecanismo a interrupção da cadeia respiratória mitocondrial, causando sintomas de Parkinsonismo (ZENG; GENG; JIA, 2018).

Evidências experimentais sugerem que um contribuinte significativo para a degeneração dopaminérgica na DP é a formação de espécies reativas de oxigênio. Esse acúmulo de espécies reativas poderia ser consequência do metabolismo da dopamina, menor atividade de enzimas antioxidantes e/ou altos níveis de ferro e cálcio na SNpc (DIAS; JUNN; MOURADIAN, 2013).

2.1.2 Diagnóstico e tratamento

O início da DP é insidioso, e a progressão e a sobrevida esperada são variáveis. Contudo, nas formas esporádicas, a progressão é mais lenta. O espectro de manifestações motoras pode ser avaliado e quantificado pelas escalas Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS), assim como o estadiamento motor é feito pela escala de Hoehn-Yahr.

Em geral, os sintomas motores iniciam com um comprometimento motor leve unilateral, acompanhado ou não de tremor distal de repouso (entre 4Hz a 6Hz). Gradativamente, o paciente evolui para alteração postural e uma marcha lenta de passos curtos (marcha festinante). Em fases avançadas, o paciente apresenta uma capacidade motora muito reduzida, prejuízo de equilíbrio e risco aumentado de quedas. Bloqueios motores (*freezing*), flutuações motoras e discinesias podem ser frequentes, especialmente após longo período de evolução da doença (MIRELMAN *et al.*, 2019).

Atualmente, o diagnóstico da DP é essencialmente clínico, baseado na confirmação dos sintomas motores e na exclusão de outros sintomas de Parkinsonismo secundário ou Parkinsonismos Atípicos (MASSANO; BHATIA, 2012). Segundo os critérios do Banco de cérebros de Londres (UK Parkinson's Disease Society Brain Bank), a DP provável requer a presença de bradicinesia e uma das seguintes características: rigidez, tremor de repouso de 4Hz a 6Hz ou instabilidade postural. Além disso, três recursos de suporte são obrigatórios (TOLOSA *et al.*, 2021). Os critérios mais atuais recomendados aos clínicos são estabelecidos pela International Parkinson's and Movement Disorder Society (MDS), que operacionalizam dois níveis de certeza diagnóstica para a DP: "cl clinicamente estabelecida" e "cl clinicamente provável". Um diagnóstico completamente definitivo é confirmado somente por autópsia (POSTUMA *et al.*, 2015).

O tratamento farmacológico da DP foi instituído ainda na década de 1960 e baseia-se na reposição de dopamina, por meio de sua precursora, a Levodopa (L-Dopa) (SY; FERNANDEZ, 2020). Frequentemente, a L-Dopa é combinada com carbidopa, um inibidor de descarboxilase ácida, reduzindo seu metabolismo periférico, de forma a aumentar sua concentração no SNC. A resposta favorável à terapia

dopaminérgica, sobretudo à Levodopa, também corrobora o diagnóstico, constituindo-se em uma prova terapêutica nos casos de incerteza e diagnóstico diferencial com outras formas de Parkinsonismo Atípico (CABREIRA; MASSANO, 2019; POSTUMA *et al.*, 2015).

Entretanto, o tratamento é apenas sintomático e não há uma terapia capaz de reverter ou impedir a progressão da doença. Inicialmente, a terapia dopaminérgica mostra-se efetiva no controle dos sintomas motores. Porém, ao longo da evolução da doença, a L-Dopa reduz sua eficácia, sendo necessário um aumento da dose da medicação, o que também eleva o risco de efeitos adversos, como discinesias (ARMSTRONG; OKUN, 2020). Essas complicações relacionadas à L-Dopa ocorrem em até 80% dos pacientes após 4-6 anos de tratamento, e até 90% após 10 anos (BASTIDE *et al.*, 2015). Além disso, na fase motora, quando se inicia a Levodopaterapia, em torno de 70-80% dos terminais dopaminérgicos no corpo estriado e cerca de 50% dos neurônios dopaminérgicos na substância negra estão perdidos (PICCA *et al.*, 2021).

Dessa forma, há crescente interesse nas pesquisas dedicadas à possibilidade de um diagnóstico mais precoce e assertivo da doença por meio de biomarcadores, que são definidos como uma característica que é objetivamente mensurada e avaliada como um indicador de um processo biológico, processo patológico ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (ATKINSON *et al.*, 2001). Esses marcadores diagnósticos podem ser úteis tanto para o reconhecimento da DP anteriormente à sintomatologia motora quanto para detectar indivíduos assintomáticos em risco para a doença (COVA; PRIORI, 2018).

Essa extensiva pesquisa de biomarcadores precoces na DP justifica-se, pois o diagnóstico ainda em uma fase pré-clínica ou até mesmo pré-motora representaria uma oportunidade para se investigar a fisiopatologia e tratamentos modificadores da doença, quando estes forem clinicamente acessíveis (COVA; PRIORI, 2018). Pacientes na fase prodrômica seriam os candidatos ideais para terapias neuroprotetoras, a fim de se retardar a evolução da doença (TESSITORE; CIRILLO; DE MICCO, 2019).

2.1.3. Sintomas não motores da doença de Parkinson

Clinicamente, a DP é conhecida por ser um distúrbio motor complexo, manifestada principalmente por quatro sinais cardinais: tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (MIRELMAN *et al.*, 2019). Porém, além dos sintomas motores clássicos, antecedendo em muitos anos e até mesmo décadas aos sintomas motores, há uma fase latente, em que o processo neurodegenerativo já está iniciado em outras regiões do Sistema Nervoso Central e Periférico, chamada de fase prodrômica da doença (CABREIRA; MASSANO, 2019; POSTUMA; BERG, 2016). Nessa fase, os sintomas ou sinais de neurodegeneração da DP estão presentes, mas um quadro clínico clássico de parkinsonismo motor totalmente evoluído ainda não ocorre (BERG *et al.*, 2015; KHOO *et al.*, 2013).

Embora os sinais motores clássicos da doença de Parkinson sejam ligados à degeneração nigral e à conseqüente depleção de dopamina na via nigroestriatal, os sintomas não motores provavelmente estão relacionados também à neurodegeneração de outras estruturas do SNC (POSTUMA *et al.*, 2012), incluindo o sistema nervoso autônomo periférico, conforme prevê o modelo de estadiamento de Braak (BRAAK *et al.*, 2004). O espectro de sintomas não motores na DP inclui: hiposmia, fadiga, dor, disfunção autonômica, distúrbios do sono, prejuízo cognitivo e sintomas neuropsiquiátricos (depressão, ansiedade, apatia, psicose) (KHOO *et al.*, 2013; PELLICANO *et al.*, 2007; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). Tipicamente, indivíduos diagnosticados com DP têm um desenvolvimento gradual desses sintomas anos antes de os primeiros sintomas motores surgirem (ARMSTRONG; OKUN, 2020). Embora os sintomas motores definam a doença, a sintomatologia não motora é altamente prevalente e heterogênea na DP (GULUNAY *et al.*, 2020; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). A maioria dos pacientes com DP há mais tempo, ou com DP severa, apresenta de 6 a 10 sintomas não motores (KARIMI-MOGHADAM *et al.*, 2018), mostrando a alta incidência dessas alterações nos pacientes.

Um estudo observacional mostrou que fadiga, dor e tontura foram os sintomas não motores mais prevalentes com frequências de 78%, 75% e 69%, respectivamente (KARRI; RAMASAMY; KALIDOSS, 2020). Já outro estudo mostrou que fadiga (58%),

ansiedade (56%) e dores nos membros inferiores (38%) foram os sintomas mais frequentes (BARONE *et al.*, 2009). Pacientes com maior prejuízo motor, medido pela escala MDS-UPDRS, tiveram maior número de sintomas não motores da doença (KHOO *et al.*, 2013), mostrando a correlação entre severidade da doença e presença dos sintomas não-motores.

A depressão é um dos principais sintomas não motores da DP, ocorrendo entre 30% a 50% dos pacientes, sendo um dos mais frequentes sintomas neuropsiquiátricos da doença, relacionados à maior morbidade e mortalidade e piora da qualidade de vida dos pacientes (BALESTRINO; MARTINEZ-MARTIN, 2017; CHENG *et al.*, 2010; MARSH, 2013). Alguns estudos têm mostrado que o risco de depressão cresce nos 2-3 anos prodrômicos imediatos ao diagnóstico da doença (ALONSO *et al.*, 2009; DARWEESH *et al.*, 2016).

A depressão é um fenômeno complexo na DP, que tanto pode ser endógena à doença, uma reação à incapacidade motora nos estágios mais avançados, quanto à combinação de ambas (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). O próprio diagnóstico da depressão pode ser complicado devido à sobreposição dos sintomas motores. Tem sido observado um aumento do risco do desenvolvimento da DP em sujeitos depressivos comparados àqueles sem sintomas de depressão (KAZMI *et al.*, 2021; SCHUURMAN *et al.*, 2002)

A depressão na DP é um distúrbio heterogêneo entre os pacientes e ainda não está claro se esta apresenta o mesmo substrato anatômico e neuroquímico que aquele presente nos transtornos depressivos presentes na população em geral (POEWE *et al.*, 2017). Clinicamente, o perfil sintomático nesses pacientes é diferente, com maiores dificuldades de concentração, anedonia, sentimentos de culpa e perda de energia (CONNOLLY; FOX, 2014). A anedonia, definida como a incapacidade de sentir prazer em atividades geralmente consideradas agradáveis, é um sintoma-chave de depressão e apatia em pacientes com DP (FUJIWARA *et al.*, 2011). A associação entre apatia, anedonia e depressão é bastante complexa devido à frequente sobreposição dessas condições neuropsiquiátricas (ASSOGNA *et al.*, 2019). A depressão varia de severidade, e outras condições neuropsiquiátricas, como transtornos de ansiedade, comprometimento cognitivo e psicose frequentemente acompanham os quadros depressivos na DP (CHIKATIMALLA *et al.*, 2022).

Do ponto de vista neurobiológico, sabe-se que a depressão como sintoma prodrômico é manifestação de um processo degenerativo que se estende para áreas

não dopaminérgicas, resultado de múltiplas disfunções de vias de neurotransmissores, incluindo serotonina (núcleos da rafe) e noradrenalina (*locus coeruleus*). Além disso, o envolvimento dos núcleos da rafe e *locus coeruleus* proposto no estágio 2 de Braak também parece indicá-la como sintoma prodromático da DP (POSTUMA *et al.*, 2012). Estudos de neuroimagem funcional também indicaram déficits nessas vias de neurotransmissores. O sistema serotoninérgico está alterado nos doentes com DP e depressão, particularmente em áreas límbicas, como o córtex e o hipocampo, nas regiões frontais e núcleos da rafe (ASSOGNA *et al.*, 2019).

Como a terapia dopaminérgica não se mostra eficaz para o manejo clínico dos sintomas depressivos, o tratamento é estabelecido pelas usuais classes de drogas antidepressivas: inibidores seletivos da recaptação de serotonina, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina e antidepressivos tricíclicos (MARSH, 2013; SEPPI *et al.*, 2019). Em específico, o agonista dopaminérgico Pramipexol também pode ser útil para tratar depressão em alguns pacientes, particularmente naqueles com anedonia (BARONE *et al.*, 2010; REKTOROVÁ *et al.*, 2003; SEPPI *et al.*, 2019). Contudo, a responsividade ao tratamento farmacológico é variada, dependendo da intensidade dos sintomas, do tempo de duração da doença e do quadro motor (QUELHAS, 2013).

Medidas não farmacológicas também são adjuvantes no tratamento clínico da depressão na DP. A psicoterapia cognitivo-comportamental tem sido considerada uma abordagem eficiente (DOBKIN *et al.*, 2011). Além disso, mudanças de estilo de vida, como a prática de atividade física (WU; LEE; HUANG, 2017), mudanças na dieta (ALFONSETTI; CASTELLI; D'ANGELO, 2022) e, até mesmo, suplementações dietéticas (DA SILVA *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2011) têm se mostrado benéficas, embora com limitações de suas evidências.

A depressão e o seu manejo clínico influenciam fortemente na progressão da doença. Se não tratada, está associada a piores desfechos motores, maior incapacidade, início mais precoce da terapia dopaminérgica e pior qualidade de vida do paciente e familiares (PAUMIER *et al.*, 2012). Apesar da relevância da depressão como sintoma não motor na DP, esse quadro, muitas vezes, é subdiagnosticado e, conseqüentemente, subtratado (MARTINEZ-MARTIN, 2011; REICHMANN; SCHNEIDER; LÖHLE, 2009).

2.1.4 Modelos animais de DP

Os modelos animais são uma importante ferramenta para a compreensão da fisiopatologia e desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas na DP. Idealmente, um modelo animal deveria reproduzir as características clínicas da PD; porém, nem todos os modelos reproduzem essas características com fidelidade. Apesar dessas limitações, os modelos animais contribuíram significativamente para a compreensão dos processos da doença e potenciais alvos terapêuticos em PD (ZENG; GENG; JIA, 2018).

De forma geral, os modelos animais dividem-se em duas categorias: modelos genéticos e modelos com toxinas (LE; SAYANA; JANKOVIC, 2014). Os modelos com neurotoxinas utilizam-se da premissa da exposição a contaminantes ambientais como uma das etiologias da DP. Atualmente, os modelos com toxinas mais utilizados são o 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP), hidroxidopamina (6-OHDA), rotenona e paraquat (TIEU, 2011).

A rotenona é um composto natural derivado de plantas com atividade herbicida, pesticida e no controle populacional de peixes. O mecanismo principal de toxicidade é a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (JAGMAG *et al.*, 2016). A inibição acarreta uma redução na síntese de ATP intracelular e a formação de espécies reativas de oxigênio que danificam o próprio complexo I e outras macromoléculas celulares (SANDERS; GREENAMYRE, 2013; BASSANI *et al.*, 2014). Além disso, por meio da produção de radicais livres, a rotenona ativa células da micróglia, contribuindo para o estado oxidativo em áreas seletivas do encéfalo (TIEU, 2011). Por ser lipofílica, é capaz de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (BHE) e pode promover a formação de LB. Os modelos de DP induzida por rotenona em roedores podem ser obtidos por meio de injeção sistêmica intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea, ou ainda com microinfusão direta na via nigroestriatal por cirurgia estereotáxica (XIONG *et al.*, 2009). Em camundongos, a administração intragástrica crônica foi capaz de induzir o acúmulo de α -sinucleína no sistema nervoso entérico, no núcleo motor dorsal do vago e núcleo intermediolateral da medula espinhal (PAN-MONTOJO *et al.*, 2010).

2.2 LIPÍDIOS E LIPOPROTEÍNAS

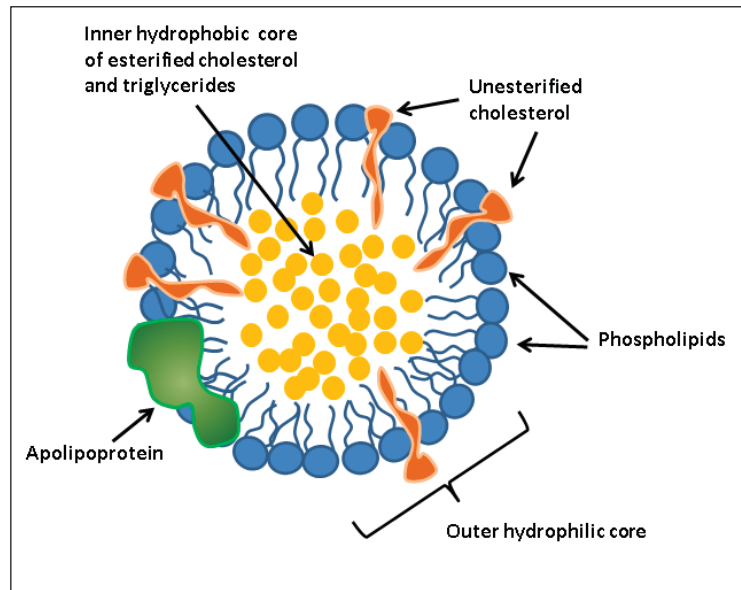
Os lipídios constituem uma classe heterogênea de moléculas orgânicas caracterizados pela baixa solubilidade em água. Eles são a maior fonte de energia do organismo, além de possuírem funções estruturais e regulatórias. Dos pontos de vista fisiológico e clínico, os lipídios biologicamente mais relevantes são os fosfolípidos, o colesterol, os triglicérides (TG) e os ácidos graxos. Os lipídios são requeridos em até 20% a 30% do valor energético total. Destes, mais de 90% estão na forma de TG (STONE, 1990).

Os fosfolipídios formam a bicamada lipídica, unidade biofísica e estrutural das membranas plasmáticas, influenciando não apenas em sua estrutura, mas também em proteínas e receptores de membrana, conseqüentemente, em muitas vias de sinalização celular (VANCE, 2015).

O colesterol, na membrana plasmática, é um componente essencial estrutural e funcionalmente, já que regula a fluidez e a permeabilidade da membrana (GORITZ; MAUCH; PFRIEGER, 2005). Também é uma molécula precursora para a biossíntese de ácidos biliares, hormônios esteroides e vitamina D que, por suas vezes, têm importantes papéis biológicos como transdutores de sinal e solubilizadores de lipídios (ZHANG; LIU, 2015).

Devido à sua característica hidrofóbica, os lipídios são insolúveis em soluções aquosas, por isso precisam ser transportados pelo sistema circulatório em agregados moleculares hidrossolúveis, as lipoproteínas. Tais lipoproteínas plasmáticas são macromoléculas hidrossolúveis esféricas formadas por um *core* lipídico contendo triglicérides e ésteres de colesterol, envolvido por uma camada de lipídios anfipáticos (fosfolipídios) e uma ou mais proteínas, chamadas de apolipoproteínas (Figura 2) (MAHLEY, 2016b). A principal função das lipoproteínas é realizar a distribuição dos lipídios entre os tecidos do corpo. O colesterol obtido da dieta ou recém-sintetizado pelo fígado é transportado por lipoproteínas para os tecidos periféricos, onde as células utilizam o colesterol para síntese de membranas celulares, hormônios esteroides e outras moléculas à base de colesterol.

FIGURA 2 – ESTRUTURA DE UMA APOLIPOPROTEÍNA



Fonte: KAREINEN (2016)

Segundo critérios de tamanho e densidade, estas lipoproteínas podem ser divididas em quatro categorias: quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). As VLDL são moléculas que transportam triglicérides e colesterol do fígado e os redistribuem aos vários tecidos. Elas são hidrolisadas em ácidos graxos livres, gerando pequenas moléculas ricas em colesterol, as IDL e LDL. Já as HDL são as menores lipoproteínas, fazendo o transporte reverso do colesterol dos tecidos em direção do fígado (Tabela 1) (DE GRUYTER, 2014). O transporte reverso do colesterol confere às HDL uma função protetora contra aterosclerose, doenças cardiovasculares e acidente vascular encefálico (AMARENCO; STEG, 2007; AMARENCO *et al.*, 2004; MORA *et al.*, 2008).

As características das principais lipoproteínas são descritas na Tabela 1 a seguir.

TABELA 1 – PRINCIPAIS CLASSES DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Lipoproteína	Função Fisiológica	Conteúdo relativo (%)			
		TG	Col	Flp	Pr
Quilomícrons	Transporte de TG da dieta do TGI para a periferia e fígado	90	5	3	2
VLDL	Transporte de TG endógeno do fígado para tecidos periféricos	60	20	14	6
IDL	Formadas a partir da degradação de VLDL ou HDL	20	40	22	18
LDL	Transporte do colesterol do fígado para os tecidos periféricos	7	50	22	21
HDL	Transporte reverso do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado	5	25	26	44

Fonte: Adaptado de KWAN *et al.* (2007)

Legendas: Col: Colesterol; IDL: lipoproteína de densidade intermediária; Flp: Fosfolipídios; Pr: Proteínas; TG; triglicerídeos.

A Apolipoproteína E (ApoE) é uma glicoproteína com 299 aminoácidos e peso molecular de 34 kDa, sendo codificada pelo gene de mesmo nome localizado no cromossomo 19 (19q13.2), contendo 4 éxons e 5 transcritos (GIAU *et al.*, 2015). É produzida em diversos tecidos, majoritariamente no fígado (75%), mas também altamente presente no encéfalo e em outros tecidos, como baço e rins (EMAMZADEH, 2017).

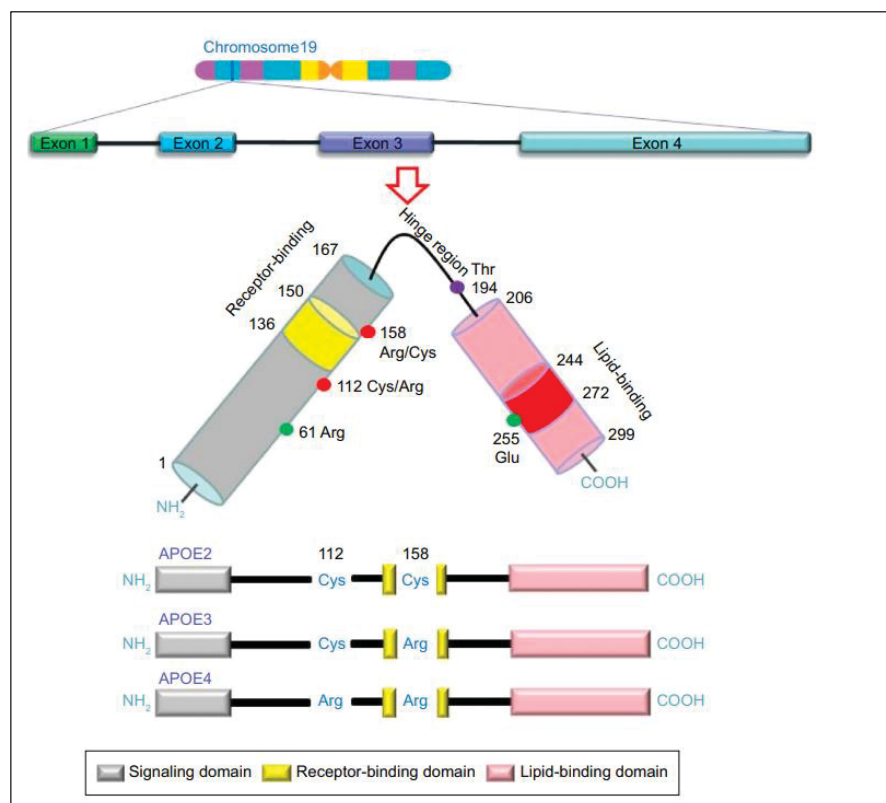
No plasma, a ApoE é o principal componente das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de um grupo de lipoproteínas de alta densidade (HDL), envolvida na redistribuição de triglicerídeos e colesterol em diferentes tecidos (MENSENKAMP *et al.*, 1999). No encéfalo, a ApoE tem papel fundamental, contribuindo na homeostase do colesterol, sendo modulada em diferentes condições patológicas (MAHLEY, 2016b).

Estruturalmente, a ApoE é formada por dois domínios distintos: uma extremidade N-terminal hidrofílica e outra C-terminal hidrofóbica conectadas a uma

região de dobradiça. O domínio C-terminal da ApoE inicia uma interação entre a apoE e a superfície lipídica da lipoproteína, enquanto N terminal interage com o receptor (GIAU *et al.*, 2015).

Geneticamente, a ApoE pode ter três isoformas: ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3 e ApoE ϵ 4. Na população, os alelos estão distribuídos em frequências de 3.9%, 59.4% e 36.7%, respectivamente. Como observamos na Figura 3, cada polimorfismo de ApoE determinará uma conformação estrutural da proteína. Essas três principais isoformas de APOE diferem umas das outras por duas trocas de cisteína/arginina na posição 112 e 158 (GIAU *et al.*, 2015). ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3 e ApoE ϵ 4 contêm cisteína/cisteína, cisteína/arginina e arginina/arginina nessas duas posições, respectivamente (PAPAIOANNOU, 2012).

FIGURA 3 - ESTRUTURA DA APOLIPOPROTEÍNA E (ApoE)



Fonte: GIAU *et al.* (2015)

2.2.1 Metabolismo lipídico no encéfalo

O encéfalo é um órgão de composição essencialmente lipídica e de alta taxa metabólica. É o órgão com maior conteúdo e complexidade de lipídios, sendo que o cérebro contém cerca de 20% do total de colesterol do corpo (DIETSCHY; TURLEY, 2004) e apresenta uma concentração de colesterol duas vezes maior em comparação com outros tecidos (ZHANG; LIU, 2015). 70% a 80% do colesterol do encéfalo adulto está nas bainhas de mielina formadas pelos oligodendrócitos do Sistema Nervoso Central, sendo que o restante está presente no plasmalema e sistema de endomembranas de astrócitos e neurônios (substância cinzenta) (BJÖRKHEM, 2006). Além disso, os neurônios requerem uma alta quantidade de superfície de membrana para axônios, espinhas dendríticas e vesículas pré-sinápticas, o que torna os lipídios essenciais para a ocorrência dos processos de neurogênese e transmissão sináptica e eventos biológicos que promovem a neuroplasticidade (GORITZ; MAUCH; PFRIEGER, 2005; MAHLEY, 2016c).

Dessa forma, uma disponibilidade suficiente de colesterol é necessária para a manutenção da morfologia e da função neuronal, sendo que regiões específicas podem ter diferenças na síntese e *turnover* do colesterol. A taxa de síntese do colesterol é relacionada ao estágio de neurodesenvolvimento e depende da região do encéfalo (SAHER *et al.*, 2005). O período inicial de neurodesenvolvimento até a adolescência é quando há maior quantidade de colesterol necessária para a neurogênese e mielinização (QUAN *et al.*, 2003). Após a mielinização, o *turnover* do colesterol é muito baixo, já que sua meia vida no encéfalo adulto varia de 6 meses a 5 anos, enquanto no plasma é de apenas alguns dias (DIETSCHY; TURLEY, 2001).

No cérebro, a regulação dos níveis de colesterol é viabilizada pelas proteínas de ligação a elementos reguladores de esteróis (SREBPs), que regulam a transcrição de genes que codificam enzimas de colesterol e biossíntese de ácidos graxos, bem como receptores de lipoproteínas, como a HMG-CoA sintase (ZHANG; LIU, 2015).

Devido à BHE, o metabolismo do colesterol é separado do restante do corpo, caracterizando, portanto, uma biossíntese *in situ* no cérebro, a chamada síntese endógena ou síntese *de novo*. Nesse processo, neurônios e astrócitos cooperam na homeostase, síntese, regulação e distribuição do colesterol nas diferentes áreas do encéfalo (DIETSCHY; TURLEY, 2004). O colesterol é sintetizado principalmente no

retículo endoplasmático dos astrócitos e oligodendrócitos. Acetyl-CoA é a molécula precursora, a qual é convertida em 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA pela β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase (BERG *et al.*, 2002). A partir do lanosterol, o colesterol pode ser obtido por duas formas: pela via Kandutsch–Russel e pela via de Bloch em uma série de cerca de 20 reações enzimáticas sucessivas (DORIA *et al.*, 2016). As vias de Bloch e Kandutsch-Russel usam o desmosterol e 7-hidroxicolesterol como os precursores imediatos de colesterol através da sua redução pelo 24-desidrocolesterol redutase (DHCR24) e 7-desidrocolesterol redutase (DHCR7) (MARTIN *et al.*, 2014).

Aproximadamente 1% do conteúdo total de colesterol existe na forma esterificada como um meio de armazenar o colesterol excedente. Esse processo é realizado pela acil coenzima A: colesterol aciltransferase 1 (ACAT1/SOAT1) (ZHANG; LIU, 2015).

As células regulam seu conteúdo de colesterol por meio de um mecanismo de feedback que equilibra biossíntese, importação e excreção. A principal forma de excreção do colesterol no encéfalo (40% a 50% do total) é feita na forma de metabólitos de oxisterol, como o 27-hydroxycholesterol (27-OHC) e 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC). A síntese de 24-hydroxycholesterol (24-OHC) é catalisada pela enzima colesterol 24-hydroxylase codificado pelo gene CYP46A1, membro da família do citocromo p450. Essa forma oxidada do colesterol é mais solúvel, capaz de se difundir através da BHE e alcançar o plasma, onde é captado pelas lipoproteínas plasmáticas e, assim, incorporado à bile (DIETSCHY; TURLEY, 2004). A taxa de metabolismo do colesterol no encéfalo pode ser estimada por meio da razão 27-OHC e 24S-OHC do plasma. O aumento dessa razão pode ser atribuída à disfunção da BHE e encontrada em pacientes com doença de Alzheimer e doença de Parkinson, por exemplo (HUGHES *et al.*, 2012).

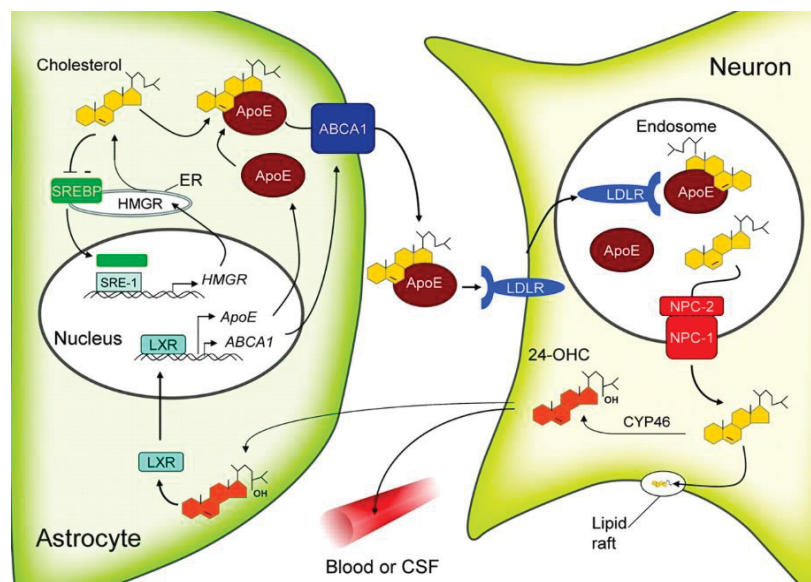
Outra via secundária para a secreção do colesterol ocorre via transportadores *ATP binding-cassete* (ABCA1, ABCG1 e ABCG4). O colesterol é liberado diretamente em lipoproteínas do líquido que se ligam a receptores LRP1 dos capilares e células endoteliais (GOSSELET *et al.*, 2009).

Os astrócitos são capazes de secretar lipoproteínas ricas em colesterol que são levados pelos neurônios via endocitose mediada por LDLR e LRP1 (KOLDAMOVA *et al.*, 2015).

As principais apolipoproteínas presentes no líquido (LCR) são a ApoE e a ApoAI, com menores quantidades de apoAII, apoCs, apoJ e apoD. ApoE é a mais abundante e principal lipoproteína mediadora do metabolismo lipídico no SNC (TAKEDA *et al.*, 2010). É secretada principalmente por astrócitos, mas oligodendrócitos, micróglia e neurônios podem expressar ApoE em situações específicas, como em lesões teciduais (MAHLEY, 2016b). Algumas apolipoproteínas, como apoAI e ApoAII, são sintetizadas periféricamente e transportadas para o SNC através do plexo coroide. Além disso, observa-se que as células endoteliais do cérebro também são capazes de produzi-las, porém, em quantidades mais baixas (ELLIOT *et al.*, 2010).

A ApoE é o principal ligante para membros da família do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), localizado no fígado e outros tecidos (GIAU *et al.*, 2015). Já a ApoE do SNC é completamente específica desse tecido. Por isso, não há intercâmbio entre ApoE derivada do plasma e ApoE encefálica (BALES, 2010).

FIGURA 4 - SÍNTESE ENDÓGENA DO COLESTEROL NO ENCÉFALO



Fonte: BENNARROCH (2008)

Síntese Endógena do Colesterol no Encéfalo. O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático (RE) dos astrócitos pela 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGR), que é regulada pela proteína de ligação do elemento regulado por esteróis (SREBP). Os astrócitos secretam colesterol ligado à apolipoproteína E (apoE) através do transportador ABCA1. O complexo apoE-colesterol é internalizado via lipoproteína de baixa densidade receptores (LDLR).

Destaca-se que o polimorfismo genético de ApoE é tido como o maior fator de risco genético para a doença de Alzheimer, sendo o alelo ApoE ϵ 4 associado com o aumento do risco para a doença, sendo detectado em até 40% a 50% dos pacientes com a forma esporádica da doença (BEKRIS *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2022). Tem sido demonstrado que apoE pode desempenhar um papel importante no metabolismo da proteína beta-amiloide, influenciando assim a sua deposição em placas amiloides, marcador neuropatológico da doença (GIAU *et al.*, 2015). Corroborando com essa afirmação, animais nocaute para a proteína ApoE apresentam anormalidades neurológicas e comportamentais, mimetizando a doença de Alzheimer (DAVIS *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2017).

Assim, o metabolismo do colesterol e as vias de transporte de lipoproteínas são únicas e especializadas, reiterando a importância crítica da homeostase lipídica para a estrutura e função do SNC (MAHLEY, 2016b). Devido a esse papel-chave para a homeostase do colesterol e para a morfologia e funcionamento neuronal, diferentes evidências mostram a ocorrência de repercussões negativas para o SNC, deflagradas por distúrbios metabólicos (VANCE, 2012). Sugere-se que tais distúrbios, relacionados principalmente ao desbalanço no metabolismo lipídico, podem contribuir aditiva ou sinergicamente na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas, com especial impacto sobre as manifestações clínicas dessas doenças. A depleção de colesterol, tanto no neurodesenvolvimento quanto na vida adulta, leva a prejuízos na sinalização sináptica, já que diferentes doenças neurológicas associam-se a alterações no metabolismo do colesterol, como doença de Huntington, doença de Alzheimer e a própria DP (LINETTI *et al.*, 2010).

2.2.2 Dislipidemias

As dislipidemias compreendem um conjunto amplo de anormalidades nos níveis lipídicos. Segundo a Diretriz Brasileira de Dislipidemias (FALUDI *et al.*, 2017), as dislipidemias secundárias são aquelas relacionadas a estilo de vida inadequado, condições mórbidas ou uso de certos medicamentos. São caracterizadas no diagnóstico laboratorial pela presença de, no mínimo, uma alteração do perfil lipídico: elevação da concentração sérica de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL-C), Triglicerídeos (TG) e/ou reduzida de Lipoproteína de Alta Densidade (HDL-C).

Estudos populacionais mostram que a prevalência de dislipidemias no Brasil varia de 43% a 60% (GARCEZ *et al.*, 2014; GUS *et al.*, 2015).

Ao lado de outros fatores de risco, como hipertensão arterial e sobrepeso, a dislipidemia é considerada um dos fatores de risco para a doença arterial coronariana (NELSON, 2013), uma das maiores causas de morbimortalidade no Brasil e no mundo. Particularmente, a obesidade, considerada como problema de saúde pública global, é um importante fator de risco ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares. O sobrepeso, resultante da hipernutrição e do comportamento sedentário, favorece o acúmulo excessivo de tecido adiposo, tendo como consequência hiperlipidemia e resistência à insulina.

Nesse sentido, as dislipidemias impactam significativamente para o aumento do risco cardiovascular e para o desenvolvimento da aterosclerose, doença inflamatória crônica multifatorial que acomete a camada íntima de artérias de médio e grande calibres, como aorta e carótidas. O dano endotelial tem início com o aumento da permeabilidade da íntima, favorecendo a deposição do tecido gorduroso, especialmente LDL oxidado na parede das artérias. Estas tornam-se imunogênicas e, como consequência, levam à infiltração e à ativação de macrófagos, aumentando a resposta inflamatória endotelial pela liberação de moléculas mediadoras e linfócitos T. Como consequência, há o espessamento da parede arterial e redução do fluxo sanguíneo. As placas ateroscleróticas podem permanecer estáveis por vários anos, mas podem romper devido à ação de metaloproteinases, formando trombos. Os trombos podem ocluir artérias, tendo como desfechos clínicos principais o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular encefálico (TABAS; GARCIA-CADEÑA; OWENS, 2015).

Há um robusto conjunto de evidências proveniente tanto de modelos *in vitro* e modelos animais quanto de estudos populacionais mostrando uma significativa relação entre os níveis de colesterol e LDL-C e o surgimento de doenças cardiovasculares (KUTKIENE *et al.*, 2018). Nesse sentido, elevados níveis plasmáticos de LDL-C (superiores a 100 mg/dL) representam o principal fator de risco da aterosclerose, tendo correlação direta o risco de ocorrência de eventos cardiovasculares. Por outro lado, aumento dos níveis de colesterol HDL-C mostram um forte efeito protetor contra essas doenças (MUSUNURU, 2010). Tratamentos efetivos com estatinas tendo como alvo a redução de LDL-C reduzem

significativamente a morbimortalidade por eventos vasculares (CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS' COLLABORATORS, 2005).

Além disso, o acúmulo de tecido adiposo leva a diversas alterações homeostáticas no metabolismo de lipídios e glicose, nas funções hormonais e na modulação da resposta inflamatória (SALTIEL; OLEFSKY, 2017; ZY'SK *et al.*, 2021). O aumento do índice de massa corporal teve associação com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6).

Além de seu efeito sistêmico, tem sido cada vez mais frequente a associação entre as desordens metabólicas e doenças do Sistema Nervoso Central (MILANESCHI *et al.*, 2019). A inflamação crônica de baixo grau, resistência à insulina e alterações vasculares promovidas pela desordem metabólica têm sido relacionadas com transtornos como depressão e déficit cognitivo. Em especial, o aumento de um ambiente pró-inflamatório seria o ponto comum na fisiopatologia das desordens metabólicas e transtornos mentais (SCHMIDT *et al.*, 2014).

Dessa forma, o estilo de vida, incluindo dieta e atividade física, pode ser um dos fatores de risco modificáveis capazes de prevenir ou mudar o curso de doenças crônicas. A fim de se estudar os efeitos fisiológicos dessas, têm-se utilizado modelos animais de indução por meio de dieta, pois seriam mais naturais para mimetizar os efeitos do consumo alimentar na elevação do peso corporal, aumento de gordura e desenvolvimento de condições mórbidas delas decorrentes. Nesse sentido, as dietas mais comumente utilizadas são a dieta de cafeteria, *high fat diet* e *western diet*, escolhidas de acordo com o fenótipo desejado e os parâmetros bioquímicos e fisiopatológicos (BUETTNER *et al.*, 2006; BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007). A dieta de cafeteria é composta por uma variedade de alimentos altamente palatáveis e de elevada densidade energética com quantidades aumentadas de sódio, açúcar e gordura e pobre em fibras, como queijos, biscoitos e refrigerantes. Já a *Western Diet* (WD) baseia-se em alimentos com alta quantidade de gordura, alta concentração de açúcares e sal. Por fim, a *High fat diet*, com altas concentrações de gordura sem elevação de açúcares, por adição de alimentos ou acréscimo de gordura na própria dieta dos animais (CUSTERS *et al.*, 2022).

2.2.3 Alterações metabólicas e doença de Parkinson

Há um crescente interesse na compreensão dos mecanismos metabólicos envolvidas na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas. Essa relação justifica-se por diferentes aspectos que demonstram o quanto as interações metabólicas do Sistema Nervoso podem se refletir nas alterações lipídicas (DAI *et al.*, 2021; VANCE, 2012).

Como a etiologia da doença de Parkinson é complexa e multifatorial, fatores associados a estilo de vida, como hábitos alimentares, podem estar implicados em seu desenvolvimento e progressão. Em um estudo que incluiu 9.414 participantes do Rotterdam Study, sendo 129 deles com diagnóstico de DP em um seguimento de 14.1 anos, os resultados mostraram que a dieta mediterrânea (consumo dos seus principais alimentos) possivelmente está associada a menor risco da doença (STRIKWERDA *et al.*, 2021). Essa relação ainda não é completamente estabelecida. Contudo, suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes poderiam ter efeito protetor. Uma dieta baseada em plantas e peixe, ou seja, o consumo regular de vegetais e frutas frescas, nozes e sementes, azeite, vinho e óleo de coco foi associada a uma progressão mais lenta da DP (MISCHELEY *et al.*, 2017). A aderência à dieta mediterrânea também foi associada a menor ocorrência de sintomas não motores, como depressão, distúrbios do sono e hiposmia (MOLSBERRY *et al.*, 2020)

Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) ômega-3 são uma classe de lipídios com importantes propriedades fisiológicas na prevenção de doenças neurodegenerativas. A ingestão de ácido graxo ômega-3 pode ter efeito neuroprotetor, reduzindo a ativação microglial e a liberação de espécies reativas de oxigênio, aumento do *turnover* da dopamina pela relação DOPAC/DA e redução da peroxidação lipídica. Suplementação com óleo de peixe e coenzima Q10 foi associada estatisticamente com menores taxas de progressão da DP (MISCHELEY *et al.*, 2017). O consumo de alimentos ricos em flavonoides (frutas vermelhas, chá e vinho) afeta positivamente o risco de desenvolver distúrbios neurodegenerativos, incluindo DP (CASTELLI *et al.*, 2017)

Nesse contexto, cada vez mais a relação entre o trato gastrointestinal e o encéfalo tem sido alvo de pesquisas (*gut brain axis*). Esse eixo cérebro-intestino envolve diferentes vias, como o sistema nervoso autônomo e entérico, o sistema

endócrino, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o sistema imunológico e a microbiota e seus metabólitos. O trato gastrointestinal é afetado de forma precoce na DP, com sintomas prodrômicos como constipação, disfagia, gastroparesia e desidratação (MULAK; BONAIZ, 2015; SAMPSON *et al.*, 2016). As inclusões de agregados de alfa-sinucleína não estão restritas apenas ao Sistema Nervoso Central, mas também a fluidos e tecidos periféricos, como glândulas salivares e mucosa intestinal, estabelecendo a hipótese de que a sinucleinopatia dissemina-se via nervo vago até alcançar o encéfalo (KLANN *et al.*, 2022). Além disso, pacientes com DP possuem uma microbiota intestinal distinta dos controles saudáveis (HASEGAWA *et al.*, 2015), levando a um aumento da resposta imune e ao aumento da permeabilidade intestinal (KLANN *et al.*, 2022). Animais que superexpressam alfa-sinucleína (Th1-a Syn) têm, além dos sinais motores clássicos, distúrbios da motilidade gástrica com acúmulo anormal da proteína no sistema nervoso entérico (CHESSELET *et al.*, 2012). Outro estudo mostrou que a administração de antibióticos foi associada com a melhora estatisticamente significativa das funções motoras entre pacientes com DP (BAIZABAL-CARVALLO; ALONSO-JUAREZ; FEKETE, 2021).

Nesse sentido, há diversas evidências mostrando o papel-chave das lipoproteínas e vias de sinalização lipídica na DP, embora poucos trabalhos explorem diretamente essa relação diante da lesão intranigral. Um estudo anterior do nosso laboratório a partir de análise metabolômica (LC-MS) mostrou que a lesão na via nigroestriatal com a neurotoxina rotenona causou um aumento significativo na concentração das lipoproteínas plasmáticas VLDL e LDL, com prejuízo no teste de memória de reconhecimento de objetos (FAGOTTI *et al.*, 2019).

Quanto à relação entre metabolismo lipídico e DP, algumas evidências trazem uma relação inversa entre o colesterol sérico e o risco da doença, suportando, ao contrário do que se imaginava, que o colesterol poderia ter papel neuroprotetor na patogênese da DP. Um dos experimentos mostrou que o esqualeno reduziu a toxicidade da 6-hidroxi-dopamina (KABUTO *et al.*, 2013) e outro mostrou que o lanosterol poderia proteger os neurônios dopaminérgicos na substância negra de morte induzida por MPTP (ROY *et al.*, 2012). Níveis mais elevados de colesterol de LDL-C séricos foram inversamente associados ao risco subsequente de DP (RR 0,73, IC 95% 0,57–0,93), sendo que um acréscimo de 38,6mg/dL (1mmol/L) no LDL-C sérico correlaciona-se com uma redução de 7% no risco de DP (JIANG *et al.*, 2020). Contudo, outros estudos apontam no sentido oposto, de que a elevação do colesterol

e suas frações podem impactar significativamente em um aumento do risco de DP, o que mostra uma divergência quanto aos resultados dos estudos, tornando incertas essas associações.

Além disso, os níveis de plasma e LCR de metabólitos do colesterol, como o 24S-HC, têm sido sugeridos como biomarcadores para doenças neurodegenerativas. Um dos estudos encontrou uma elevação estatisticamente significativa de 24S-HC no LCR de paciente com DP (GRIFFITHS *et al.*, 2021). Outro estudo mostrou que os níveis de 27-OHC regulam positivamente a alfa-sinucleína, um dos marcadores neuropatológicos da DP (DORIA *et al.*, 2016).

Outra linha de evidências nesse tema provém do uso de drogas hipolipemiantes, como estatinas e fibratos, as quais têm sido alvo de estudos associados ao risco de DP (BYKOV *et al.*, 2017; ROY; PAHAN, 2011). Em geral, no entanto, os resultados desses estudos não são conclusivos no sentido de confirmar um papel protetor (BYKOV *et al.*, 2017). A simvastatina reduziu a agregação de sinucleína, um dos marcadores patológicos da doença (BAR-ON *et al.*, 2008).

Tem sido cada vez mais discutida a influência do metabolismo lipídico na patogênese e progressão dos distúrbios neuropsiquiátricos, comuns entre pacientes com DP, porém, observa-se na literatura uma maior ênfase aos sintomas cognitivos e demência. Observa-se que comparativamente a outras linhas de pesquisa na DP, os estudos relacionando DP, depressão e metabolismo lipídico são escassos e permanecem incertas as características metabólicas e sintomas depressivos na doença (DONG; WEI; HU, 2021).

Um estudo mostrou que pacientes com DP possuem menores níveis de triglicerídeos e aumento de HDL-C. Análise de correlação mostrou que os níveis de triglicerídeos foram negativamente correlacionados com o escore na Escala de Ansiedade de Hamilton (HAMA) (DONG *et al.*, 2021). Outro estudo encontrou que pacientes com DP e sintomas depressivos tinham níveis mais elevados de LDL-C e ApoB do que os pacientes não depressivos. A análise metabolômica (LC-MS), mostrou que os metabólitos diferencialmente expressos no grupo depressivo eram principalmente lipídios e moléculas relacionadas ao metabolismo lipídico, sendo a via relacionada ao metabolismo do ácido linoléico (ácido graxo poliinsaturado) a mais significativamente distinta (DONG *et al.*, 2018). Outro estudo utilizando LC-MS mostrou que a presença do 7 α -hydroxycholesterol no LCR foi correlacionada com depressão em pacientes com DP, avaliada por meio do Inventário de Depressão de

Beck (BDI), mostrando que o processo imunomodulatório sistêmico pode ser um fator importante mediando a relação entre oxisteróis e depressão (GRIFFITHS *et al.*, 2021).

Apesar de todas as evidências apontadas, percebe-se que há diversas lacunas e incertezas quanto ao papel dos marcadores lipídicos na fisiopatologia da DP, bem como a influência destes na manifestação e progressão em um dos sintomas não motores, a depressão. Nesse sentido, a investigação das moléculas do metabolismo lipídico poderia ser uma ferramenta útil como biomarcador da doença, seja no diagnóstico ou mesmo na evolução da doença. Da mesma forma, é possível considerar a relevância dos marcadores lipídicos por meio de intervenções dietéticas e/ou farmacológicas que poderiam melhorar a qualidade de vida dos pacientes, amenizando os sintomas como também podendo prevenir ou retardar a progressão da doença.

Em conjunto, as evidências sobre o papel dos lipídios e lipoproteínas ainda permanecem inconclusivas e controversas. Assim, nosso objetivo no conjunto deste trabalho é investigar os marcadores lipídicos em um modelo animal de doença de Parkinson e sua influência no comportamento tipo-depressivo, um dos sintomas prodrômicos da doença.

3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

A DP é uma desordem multissistêmica de grande prevalência na população global, de etiologia complexa e multifatorial e com um amplo espectro de sintomas não-motores, os quais podem manifestar-se muitos anos antes dos sintomas motores. A depressão é um dos sintomas não-motores mais frequentes entre os pacientes com prejuízos significativos à sua qualidade de vida, refletindo-se em piora dos desfechos motores e maior incapacidade, agravando ainda mais o curso da doença. A terapia dopaminérgica, embora seja considerada há algumas décadas o padrão ouro para o tratamento da doença, é um tratamento sintomático incapaz de reverter a doença. Além disso, o diagnóstico é fundamentalmente clínico, realizado na fase motora, quando a neurodegeneração já se encontra em fase bastante adiantada. Dessa forma, urge a necessidade de um diagnóstico mais precoce e assertivo, ainda na fase prodrômica, o que abriria caminhos para um tratamento mais efetivo, para a identificação de indivíduos em risco para a doença ou tratamentos modificadores da doença quanto estes forem clinicamente acessíveis.

Devido às características bioquímicas e constitutivas únicas e especializadas do Sistema Nervoso, há uma importância crítica da homeostase lipídica para a sua estrutura e função. Nesse sentido, diante da revisão bibliográfica realizada, até o momento, observa-se que há um crescente número de evidências apontando a importância da sinalização de lipídios e lipoproteínas na fisiopatologia da DP. Contudo, percebe-se que há diversas lacunas e incertezas quanto ao papel dos marcadores lipídicos na fase pré-motora, sobretudo quanto à sua associação com os sintomas depressivos. Um desses marcadores-chave é a Apolipoproteína E (ApoE), principal lipoproteína do encéfalo, completamente tecido-específica, cujo polimorfismo genético (alelo ApoE ϵ 4) é tido como maior fator de risco genético para a doença de Alzheimer. Diante do exposto, o presente estudo buscou investigar amplamente se há uma relação entre os marcadores lipídios sistêmicos e comportamento tipo-depressivo na DP. Inicialmente, se a condição de dislipidemia seria associada a lesão intranigral com a neurotoxina rotenona e ainda, se a dislipidemia teria influência em relação ao comportamento tipo-depressivo causado pela lesão intranigral, aumentando ou agravando a ocorrência desse comportamento, refletindo-se em maior degeneração dopaminérgica e/ou piora de marcadores da lesão, como as proteínas GFAP, BDNF, α -syn e propriamente, ApoE.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os marcadores lipídicos relacionados ao comportamento tipo-depressivo em um modelo animal de doença de Parkinson induzida por rotenona.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I

- Investigar os efeitos bioquímicos sistêmicos observados após a lesão intranigral com a neurotoxina rotenona sobre o perfil lipídico e glicemia dos animais;
- Avaliar os efeitos motores precoces da exposição aguda à neurotoxina rotenona.
- Correlacionar os marcadores lipídicos e glicemia ao comportamento motor frente à lesão aguda por rotenona.

Capítulo II

- Padronizar um modelo de dislipidemia, avaliando os efeitos bioquímicos da *High fat diet* quanto ao perfil lipídico dos animais em três diferentes tempos de exposição;
- Avaliar os efeitos comportamentais da dislipidemia induzida pela *High fat diet*.

Capítulo III

- Avaliar os efeitos da lesão e da dislipidemia sobre os parâmetros morfométricos e nutricionais dos animais;
- Avaliar os efeitos da lesão e da dislipidemia no comportamento motor e comportamento tipo-depressivo dos animais;
- Verificar as alterações no perfil lipídico e glicemia resultantes da lesão e da dislipidemia;
- Quantificar o efeito da *High fat diet* sobre a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos na SNpc frente a lesão por rotenona.

- Caracterizar a expressão de diferentes proteínas no tecido encefálico relacionadas ao sistema dopaminérgico dentro do paradigma de lesão da via nigroestriatal combinado ou não à dislipidemia.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir será descrita a metodologia geral empregada nos experimentos. Um maior detalhamento do método utilizado em cada experimento poderá ser obtido nos capítulos específicos.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas, com peso aproximado de 200 gramas e cerca de 30 dias de vida ao início dos experimentos. Os animais foram agrupados em grupos de 4 por gaiola de polipropileno, forradas com aparas de madeira e mantidos em condições de biotério sob ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob o número 1216 (anexo 1), seguindo as recomendações éticas do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

5.2 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

O presente estudo consistiu em 3 diferentes experimentos, os quais serão descritos brevemente a seguir.

Capítulo 1. O protocolo experimental utilizou 20 ratos machos da linhagem Wistar com peso aproximado de 280-330 g ao início dos experimentos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, grupo Sham e grupo Rotenona (n= 10 animais por grupo). O grupo rotenona recebeu infusão bilateral de 1 μL de rotenona (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). No grupo Sham foi injetado 1 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Cerca de 24 horas após as cirurgias estereotáxicas, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto seguido de posterior coleta de amostras de sangue periférico e líquido cefalorraquidiano (LCR).

Capítulo 2. Foram utilizados um total de 60 ratos Wistar machos, com peso aproximado de 200 gramas e cerca de 30 dias de vida ao início dos experimentos. Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos segundo o tipo de dieta a ser consumida. O grupo controle foi alimentado com dieta padrão de manutenção do biotério (Nuvilab CR1 - Quimtia – 386 kcal/100g) e os grupos HFD foram alimentados com dieta hipercalórica/hiperlipídica (descrita no item 4.3). Os grupos HFD, por sua vez, foram subdivididos em 3 grupos de acordo com diferentes tempos de consumo das dietas: 6, 8 e 10 semanas. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto e teste de natação forçada. Semanalmente, os animais tiveram a aferição do seu peso corporal e ao final, dissecação dos sítios adiposos. Foram coletadas amostras de sangue para realização de testes bioquímicos do perfil lipídico.

Capítulo 3. Um total de 120 ratos machos Wistar com aproximadamente 30 dias de vida (200 g) ao início dos experimentos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de acordo com suas dietas (dieta padrão - SD, ou HFD) e lesão SNpc induzida por rotenona, a saber: SHAM/SD (n= 15); SHAM/HFD (n= 15); Rotenone/SD (n= 15) e Rotenone/HFD (n= 15). Todos os grupos SD foram alimentados com ração padrão (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, Paraná, Brasil). Os grupos HFD foram alimentados com dieta rica em gordura por 6 semanas. Todos os ratos receberam suas respectivas dietas *ad libitum* e foram pesados semanalmente. Os testes comportamentais para atividade motora e comportamento do tipo depressivo foram medidos em 2 períodos de tempo (*time points*). Ao final dos experimentos, foram coletados tecidos adiposos, LCR, sangue e tecido encefálico para análises posteriores (capítulo 3).

5.3 DIETAS

A dieta experimental utilizada consistiu em uma mistura hiperlipídica e hipercalórica adaptada do protocolo utilizado por Estadella *et al.*, 2004, e Arcego *et al.*, 2018, sendo preparada em nosso laboratório (*“in house”*). É composta por ração comercial Nuvilab® triturada, acrescida de alimentos como banha de porco,

amendoim granulado torrado e chocolate ao leite na proporção 3:2:2:1, respectivamente.

Para o preparo da ração experimental, os ingredientes eram misturados e homogeneizados até formarem uma “massa”. Em seguida, a ração era modelada em *pellets* com aproximadamente 15g e seca em estufa a $65^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$ por um período aproximado de 48 horas. A dieta foi preparada semanalmente e armazenada a -20°C até o momento de ser oferecida aos animais.

O consumo alimentar foi acompanhado em dias intercalados e de acordo com o período do experimento: 6, 8 ou 10 semanas. O cálculo do consumo da ração consumida foi realizado pela subtração do peso da alimentação inicial fornecida pelo peso da sobra da caixa.

O reabastecimento das dietas ocorreu a cada dois dias, conforme as seguintes proporções, estabelecidas de acordo com a observação do consumo dos animais:

- a) 150 g de Ração HFD para os animais HFD;
- b) 200 g de Ração Padrão para os animais controles.

A ingestão calórica foi obtida multiplicando-se o consumo alimentar pela densidade calórica da dieta, conforme a determinação da composição centesimal da dieta.

A determinação da composição centesimal da dieta modificada foi realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Farmácia da UFPR, de acordo com o *Official Methods of Analysis of AOAC International* (2016). Para determinação da quantidade de lipídios da dieta hipercalórica, foi utilizado o método de Soxhlet e o método de Kjeldahl para determinar a quantidade de nitrogênio. A umidade foi determinada pela diferença de pesos de amostras de ração secas em estufa a 105°C , durante 24 horas e as cinzas foram obtidas em forno mufla a 550°C .

A partir da composição de macronutrientes, determinou-se o valor energético total da dieta por 100g, conforme Tabela 1:

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS CONTROLE E HIPERCALÓRICA (HIGH FAT DIET)

Determinação	Ração Hipercalórica % em 100 g	Ração Controle % em 100 g
Umidade	5,83 (± 0,37)	11,71 (± 0,21)
Proteínas	10,33 (± 0,20)	23,90 (± 0,15)
Gorduras Totais	34,64 (± 0,16)	4,52 (± 0,02)
Carboidratos	34,41	46,79
Fibras	11,81 (± 1,25)	16,96 (± 0,80)
Minerais	2,98 (± 0,15)	6,12 (± 0,17)
Kcal	508,72 Kcal	323,44 Kcal

Fonte: Análise realizada no Laboratório de Bromatologia, UFPR (2022)

5.4 PESO CORPORAL

Inicialmente, os animais foram pesados aos 30 dias de idade, a fim de equilibrar os grupos em relação ao peso corporal antes da exposição às dietas. Assim, foram escolhidos animais com pesos equivalentes para formarem os distintos grupos. A partir da divisão dos grupos experimentais, o peso corporal dos animais foi aferido semanalmente até o dia da eutanásia.

5.5 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

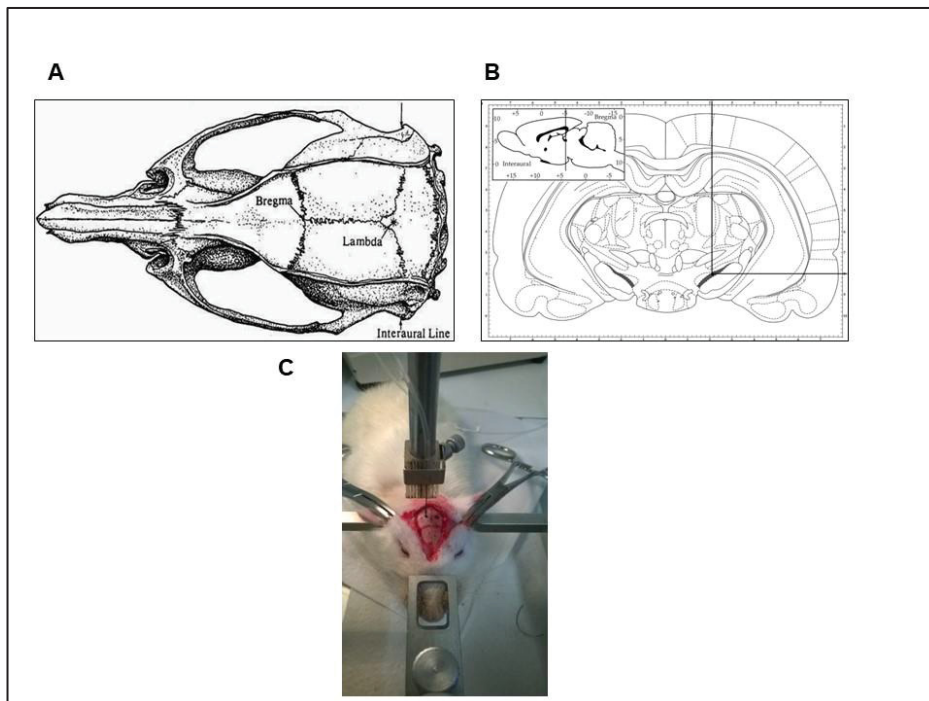
Os animais foram inicialmente sedados com xilazina intraperitoneal (10 mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Brasil) e anestesiados com quetamina (90mg/kg, i.p.; Syntec do Brasil Ltda, Brasil). A seguir, realizou-se a tricotomia da região craniana. Em seguida, o animal foi posicionado no aparelho estereotáxico e, com uma lâmina de bisturi, foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 3cm e o afastamento da pele e do músculo epicrânio. Após a exposição da superfície do crânio, foi localizado o bregma, local de fusão das suturas frontal e coronal do crânio e ponto de referência para determinação dos locais para inserção da agulha e injeção da neurotoxina (ou veículo) na SNpc do animal. Em seguida, foi infundida a

neurotoxina rotenona (12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ou veículo (Dimetilsulfóxido) na substância negra pars compacta de acordo com as coordenadas estereotáticas em relação ao bregma:

- Anteroposterior (AP) – 5,0 mm do bregma;
- Médio-lateral (ML) \pm 2,1 mm da linha média;
- Dorsoventral (DV) – 8,0 mm do crânio;
- Barra nasal – 3,3 mm

O crânio foi perfurado com uma broca de baixa rotação (BELTEC LB2000) e a agulha inserida até o ponto obtido de acordo com a coordenada dorsoventral. A infusão da neurotoxina ou veículo foi realizada por meio de agulha gengival calibre 30 G conectada a uma microseringa Hamilton de 25 μL , por um tubo de polietileno ligado a uma bomba infusora (Harvard Apparatus®) com taxa de infusão de 0,33 $\mu\text{L}/\text{min}$ por um período de 3 minutos. A cânula foi retirada 1 minuto após o término da infusão para evitar refluxo da toxina. Após a realização da cirurgia, o animal foi aquecido e mantido em caixa individual até a total recuperação do procedimento, retornando posteriormente à sua caixa original.

FIGURA 5 – CIRURGIA ESTEREOTÁXICA



A. Localização do bregma no crânio do rato. **B.** Local de infusão da neurotoxina é representado no ponto de intersecção entre as retas, correspondendo à SNpc, de acordo com as coordenadas descritas acima (PAXINOS; WATSON, 1997) **C.** Fotografia da cirurgia estereotática no momento da microinfusão da neurotoxina (arquivo pessoal da autora, 2021).

5.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara (8h:00min - 12h:00min), em uma sala com temperatura controlada (23 ° C, umidade entre 40% e 60%) e com baixa intensidade de luz (12 lx).

5.6.1 Teste de Campo Aberto

O teste de campo aberto tem como objetivo avaliar a capacidade motora do animal (SANTIAGO *et al.*, 2014). O aparato de teste de campo aberto consistiu em uma arena circular (1m de diâmetro) limitada por uma parede de 40cm de altura. Os animais foram gentilmente colocados no centro da arena e puderam explorá-lo livremente por 5 minutos. O teste foi gravado e o número de cruzamentos das linhas, assim como o tempo de imobilidade, foi contado manualmente. Após o final do teste e antes de iniciar o teste com o animal subsequente, a arena foi cuidadosamente limpa com solução de etanol 10% e seca com papel toalha.

FIGURA 6 – TESTE DE CAMPO ABERTO

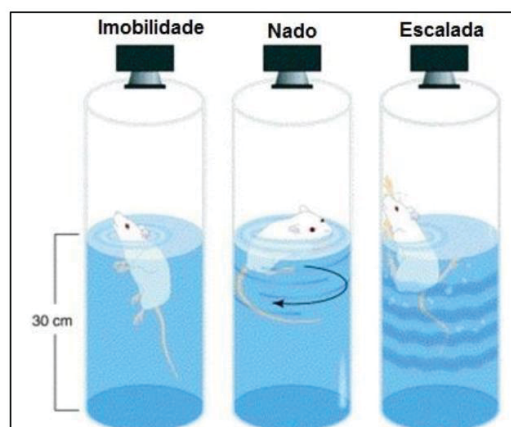


Fonte: Acervo pessoal da autora (2021)

5.6.2 Teste de natação forçada

Esse teste permite avaliar o comportamento tipo depressivo dos animais (PORSOLT, 1978). O teste se desenvolveu em duas etapas: uma sessão treino e o teste propriamente dito com um intervalo de 24 horas entre eles. Os ratos foram submetidos a natação forçada em um tanque cilíndrico com 50cm de altura e 20cm de diâmetro impassível de fuga, contendo água em uma profundidade de 30cm, a uma temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$. O teste consistiu em dois momentos, uma sessão treino e outra sessão teste. Durante a sessão treino, os animais eram colocados no recipiente durante 15 minutos para adaptação. Após 24 horas da sessão de treino, era realizada a sessão teste também com duração de 5 minutos. O teste de natação forçada permite avaliar os seguintes parâmetros: tempo de imobilidade (*immobility*), escalada (*climbing*) e natação (*swimming*). O comportamento de imobilidade corresponde à manutenção de atividade mínima para que o animal mantivesse sua cabeça acima da superfície da água. O comportamento de escalada consiste em movimentos das patas dianteiras dirigidos para cima na lateral do cilindro de natação. O comportamento de natação foi definido como movimentos, em geral, horizontais, por toda a extensão do cilindro (SLATTERY; CRYAN, 2012). Entre um teste e outro, a água do recipiente era trocada para que os odores deixados pelo animal não tivessem influência no teste seguinte. Os testes foram filmados para análise posterior.

FIGURA 7 - COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À DEPRESSÃO AVALIADOS NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.



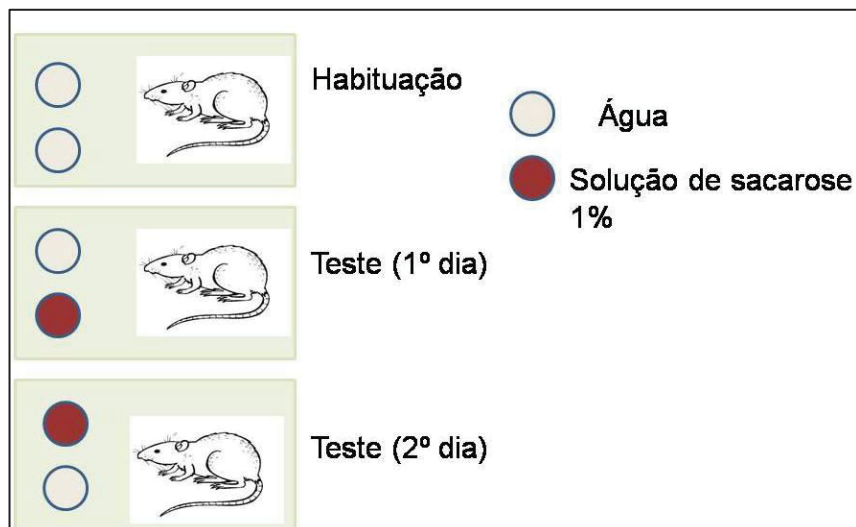
Fonte: modificado de CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002.

5.6.3 Teste de preferência de sacarose

Esse teste visa a medir a anedonia em roedores (WANG, 2009). Os animais foram transferidos para gaiolas individuais com livre acesso à alimentação. Cada rato teve acesso a duas garrafas de água durante a fase de habituação de 24 horas para se adaptar à ingestão dos líquidos das duas garrafas. No segundo dia, a água de um dos frascos foi substituída por uma solução de sacarose a 1%, conforme descrito anteriormente. Após 24 horas, as garrafas foram invertidas de sua posição inicial para evitar o efeito de uma possível preferência lateral do animal. O consumo de água e solução de sacarose foi estimado pela diferença dos pesos inicial e final de cada frasco em relação ao consumo total de líquidos. A preferência por sacarose foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de preferência por sacarose} = \text{ingestão de sacarose} / \text{ingestão total} \times 100.$$

FIGURA 8 – TESTE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

5.7 DISSECAÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS

Após a realização dos testes comportamentais e anteriormente à eutanásia, mensuramos o peso corporal final (PCF) de todos os animais. Em seguida, realizamos a eutanásia quando realizamos a coleta de sangue e a dissecação dos tecidos

adiposos brancos: mesentérico, retroperitoneal e perigonadal. Após a dissecação, os tecidos adiposos foram pesados em balança semi-analítica. Com base na relação entre a soma de peso dos sítios adiposos e o peso corporal final, foi calculado o Índice de Adiposidade:

$$\text{Soma dos pesos das gorduras/ peso corporal} \times 100$$

Imediatamente após a decapitação, o sangue foi coletado por método de inversão (em que tanto sangue arterial quanto sangue venoso são coletados) em tubos heparinizados (BD Vacutainer® Plus), rapidamente homogeneizadas e centrifugados (3000 rpm por 15 minutos). Então, o plasma foi alíquotado em microtubos de 1 mL e armazenado em ultrafreezer (-80°C) até o momento das análises bioquímicas.

Também o líquido cefalorraquidiano (LCR) foi coletado pelo método descrito anteriormente (PEGG et al., 2010). O rato anestesiado foi colocado em um aparelho estereotáxico e posicionado com a cabeça para baixo em um ângulo de aproximadamente 45°. Imediatamente após a exposição da superfície depressível, uma agulha 30G conectada a uma seringa de 1 ml foi inserida horizontal e centralmente na cisterna magna em ângulo de 30° com a dura-máter, a partir da extremidade caudal da incisão. Cuidadosamente, foram coletados cerca de 50-100 µl de CSF de cada rato. Apenas LCR claro sem sinais visuais de contaminação sanguínea foi coletado em microtubos de 0,5 ml e congelado a -80 °C até uso posterior. A avaliação laboratorial da glicose líquórica foi realizada por ensaio enzimático colorimétrico (Labtest®, Brasil).

5.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises bioquímicas foram conduzidas a partir das amostras de plasma anteriormente obtidas. Para avaliação do perfil bioquímico e glicemia, as análises de plasma foram realizadas com kits comerciais Labtest® (LABTEST, Lagoa Santa MG, Brasil) por meio de ensaios enzimáticos colorimétricos e analisadas por espectrofotometria. Os resultados foram expressos em mg/dL.

TABELA 3 - ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Analito	Amostra	Tipo de Reação	Método	(λ)
Triglicerídeos	Plasma Heparinizado	Lipoproteína lipase	Enzimático colorimétrico Reação de ponto final	505 nm
Colesterol total		Hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase	Enzimático colorimétrico Reação de ponto final	500 nm
HDL-C		Polianiónico, CHOD, CHER, Peroxidase	Surfactante seletivo Reação de ponto final em 2 etapas	600 nm
LDL-C		Polianiónico, CHOD, CHER, Peroxidase	Surfactante seletivo Reação de ponto final em 2 etapas	600/700nm
Glicose	Plasma/ LCR	Glicose oxidase	Enzimático colorimétrico Reação de ponto final	505 nm

Fonte: a autora (2023).

5.9 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para o estudo imuno-histoquímico dos neurônios contendo tirosina hidroxilase na SNpc, os ratos foram profundamente sedados com xilazina intraperitoneal (10mg/kg) e anestesiados com cetamina intraperitoneal (90mg/kg). Em seguida, cada animal foi perfundido transcardialmente com tampão PBS 0,1 M (pH 7,4) por 4 minutos. Em seguida, com solução fixadora de formaldeído (4%) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) igualmente pelo período de 4 minutos. Em seguida, os cérebros foram cuidadosamente removidos dos crânios e imersos por 48 horas nessa solução fixadora a 4°C. Posteriormente, os cérebros foram colocados em solução de sacarose 30% por 3 dias (4°C) e depois armazenados à temperatura de -80° em ultrafreezer até o processamento dos cortes em criostato. Seis cortes de 40µm por animal foram retirados da região correspondente à SNpc (- 4,92mm a - 5,28mm) (PAXINOS; WATSON, 2005) sendo coletados de 4-5 animais de cada grupo. Para realização da imunomarcagem, inicialmente, os cortes foram incubados (30 minutos) em tampão

fosfato salino 0,1 M (pH 7,4) e posteriormente submetidos à inibição da peroxidase endógena por incubação com 0,3% H₂O₂ (0,3%; 10 min) e bloqueados em soro de normal de cabra 0,1 M a 10% em tampão fosfato salino (pH 7,4) por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo anti-TH (Chemicon;CA, EUA; 1 :500; em PBS; 0,3% triton x-100) overnight a 4°C. Após lavagens sucessivas, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com biotina (anti-mouse 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 2 horas em temperatura ambiente. Por fim, após novas lavagens, o complexo formado foi localizado usando o sistema ABC (kit Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), seguido de 3,3-diaminobenzidina (DAB) com sulfato de níquel visando o aumento do contraste da reação. As secções foram montadas em lâminas revestidas com gelatina e cobertas com lamínula após desidratação em concentrações crescentes de soluções de etanol-xilol. A determinação da densidade neuronal foi realizada usando o software Image J (National Institutes of Health, Rockville, MD, EUA). Para cada grupo, um valor médio foi calculado e convertido em porcentagem em relação ao grupo de controle simulado e comparado com os outros grupos. As imagens foram obtidas usando um microscópio motorizado Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), equipado com um VSlide de varredura automatizada (Metasystems, Altussheim, Alemanha).

5.10 WESTERN BLOT

Para realização de Western blot, os animais foram eutanasiados por decapitação e as estruturas de interesse rapidamente dissecadas e armazenadas (-80°C) até o processamento. Amostras de encéfalo (SN, estriado e hipocampo) foram lisadas em tampão (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 1% TX-100) suplementado com inibidores de coquetel protease (Pierce protease Inhibitor tablets, #A32963, Pierce, EUA) com sonicador (3 pulsos de 15 segundos cada). Os homogenatos foram centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 30 min. O sobrenadante foi retirado e aliquoteado em microtubos e armazenado a -80°C para posterior análise de proteínas. As concentrações de proteína para cada amostra foram determinadas usando o ensaio de Bradford. cerca de 20 µg de proteínas totais foram diluídas em tampão de amostra (5x; 1,6% SOS; 4% 2-Mercaptoetanol; 8% glicerol; 0,0016% azul de bromofenol; O,

125M tris-HCl) e então separadas por SDS-page. Amostras foram separadas por géis de 10-12-15% SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose em um tampão gelado contendo 25 mM Tris-Base, 192 mM glicina e 20% metanol. As membranas foram bloqueadas com uma solução de 5% de leite desnatado em TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5), por 1 hora em temperatura ambiente, seguido de três lavagens com TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5) e incubados com anticorpos primários *overnight* a 4°C. Os seguintes anticorpos primários foram usados: *rabbit* anti-GFAP (1:3000), *rabbit* anti-ApoE (1:1500, Invitrogen), *rabbit* anti-BDNF (1:2000), *rabbit* anti-alfa sinucleína (1:1000, ThermoFisher Scientific) e anti-actina *mouse* (1:20000, ThermoFisher Scientific) (controle endógeno). No dia seguinte, os blots foram lavados três vezes em TBST e incubados com anticorpo secundário conjugado com HRP apropriado (anti-rabbit HRP, Invitrogen, 31460, 1 :25.000; anti-mouse HRP, Chemicon, AP126P; 1 h; temperatura ambiente). Após três lavagens finais com TBST, as bandas imunorreativas foram visualizadas com sistema de detecção ECL prime (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). As intensidades das bandas foram medidas usando o sistema de quimioluminescência (AI600 GE Healthcare Bioscience) e as bandas imunorreativas foram quantificadas. As densidades ópticas das bandas de proteínas foram medidas pelo software ImageJ, em duplicata.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram previamente analisados para avaliar a normalidade da distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnoff. Em seguida, foram realizados os seguintes testes estatísticos a depender do número de grupos, tipo de distribuição dos dados e objetivo do teste: Test t de Student para diferenças entre dois grupos; Análise de Variância (ANOVA) de uma via e ANOVA de uma via de medidas repetidas seguido por teste post hoc de Neuman-keuls; ANOVA de 2 vias com teste post hoc de Bonferroni foi utilizada a fim de se comparar os diferentes grupos conforme os fatores analisados, sendo esses: lesão e dieta. Por fim, o coeficiente de correlação de Pearson (r) também foi empregado a fim de se correlacionar 2 variáveis quantitativas. Os dados obtidos foram expressos em média \pm (mais ou menos) o erro padrão da

média (EPM). O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$ para que se rejeite a hipótese de nulidade. Todos os testes foram conduzidos através do software GraphPad Prism 8.0.

6 RESULTADOS

Esta seção apresenta os resultados a partir dos artigos desenvolvidos ao longo do doutorado. A formatação dos artigos segue as normas da revista a que o artigo foi submetido/publicado.

CAPÍTULO 1

Artigo publicado na revista “Experimental Brain Research”

Metabolic dysfunctions in the intranigral rotenone model of Parkinson’s disease

Ana Paula Chuproski¹, Evellyn Mayla Azevedo¹, Jéssica Ilkiw¹, Jéssica Miloch¹,
Marcelo M. S. Lima^{1,2}

¹Neurophysiology Laboratory, Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

²Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

ABSTRACT

Parkinson Disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta. In the last years, a growing interest to study the relationship between metabolic dysfunction and neurodegenerative disease, like PD has emerged. This study aimed to evaluate the occurrence of possible changes in metabolic homeostasis due to intranigral rotenone administration, a neurotoxin that damages dopaminergic neurons leading to motor impairments mimicking those that happen in PD. Male Wistar rats were distributed into 2 groups: sham (n=10) or rotenone (n=10). Sham group received, bilaterally, within the SNpc, 1 μ L of vehicle dimethyl-sulfoxide (DMSO) and the experimental group was bilaterally injected with 1 μ L of rotenone (12 μ g/ μ L). Twenty

four hours after the stereotaxic surgeries, the animals underwent the open field test followed by subsequent peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) samples collection for biochemical testing. The results showed that rotenone was able to replicate the typical motor behavior impairment seen in the disease, i.e. decrease in locomotion ($P=0.05$) and increase in immobility ($P=0.01$) with a strong correlation ($r=-0.85$; $P<0.0001$) between them. In addition, it was demonstrated that this model is able to decrease plasmatic total-cholesterol ($P=0.04$) and HDL-cholesterol ($P=0.007$) potentially impacting peripheral metabolism. Also, it was revealed a potential ability to reproduce type-2 diabetes mellitus-like hyperglycemic which could be explained by acute and systemic mitochondrial rotenone toxicity and SNpc nigral toxicity. Such mechanisms may still be responsible for the potential occurrence of CSF-hyperglycemia ($d=0.7$). Since intranigral rotenone is an early-phase model of PD, the present results open a new road for studies aiming to investigate metabolic changes in PD.

Keywords: Parkinson disease, Rotenone, Intranigral, Glucose, Cholesterol.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease affecting about 1% of people over 65 years old and 4-5% of people over 85 years (HIRSCH *et al.* 2016; TYSNES; STORSTEIN, 2017). The main neuropathological hallmark of PD is the progressive and irreversible dopaminergic loss of the substantia nigra pars compacta (SNpc) neurons resulting in decreased dopamine release in the striatum and consequent abnormal motor control (STERN *et al.*, 2012; VOLTA *et al.*, 2015). The motor signs include bradykinesia, rigidity, resting tremor, and disturbances in balance (SCHAPIRA *et al.*, 2017) which emerge when dopaminergic cells reduce about 70-80% (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). The mechanism that underlies the selective dopaminergic neuronal death is still unknown, but several recent findings suggest a novel role of lipid metabolism being closely

related with the pathogenesis and clinical progression of PD (JIN *et al.* 2019; HUANG *et al.* 2019; GARCÍA-SANZ *et al.*, 2021).

Lipid and lipoprotein signaling represent important key players in regulating oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and *Lewy* body formation (NAKAMURA *et al.*, 2015; DORIA *et al.*, 2016; JIN *et al.*, 2019). It has been recently reported that statins, alongside their typical pharmacological mechanism as competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, they promote a somewhat significant anti-inflammatory and immunomodulatory effects, which led the hypothesis that statins could be neuroprotective agents in PD (BAR-ON *et al.*, 2008; MUTEZ *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2021). Some clinical studies show that statins treatment would be associated with a reduction in the risk of PD, however, this relationship is still unclear (BYKOV *et al.*, 2017; JEONG *et al.*, 2019). Additionally, diabetes type 2 has been associated with a major risk of PD (HU *et al.*, 2007; SCHERNHAMMER *et al.*, 2011; PAGANO *et al.*, 2018; CHOHAN *et al.*, 2021; SÁNCHEZ-GÓMEZ *et al.*, 2021). In fact, pioglitazone, an antidiabetic drug, reduced dopaminergic neurodegeneration within the SNpc (BONATO *et al.*, 2018) and attenuated neuroinflammation in mice (PINTO *et al.*, 2016; PIATKOWSKA-CHMIEL *et al.*, 2022). Besides, abnormal glucose tolerance has also been under investigation in PD patients (HOGG *et al.*, 2018; MARQUES *et al.*, 2018).

Rotenone is extensively used as a neurotoxin able to mimic several features of PD. This agent specifically inhibits the complex I (NADH CoQ dehydrogenase) of the electron transport chain, one of the five enzymatic complexes of the inner mitochondrial membrane that are involved in oxidative phosphorylation (CHIA *et al.*, 2020). Deficits in this complex are observed in the SNpc of people with sporadic and genetic PD (KEENEY *et al.*, 2006; ZANELLATI *et al.*, 2015). Furthermore, acute nigrostriatal degeneration can be reached by means of intranigral rotenone infusion which inflicts, in few hours, an extensive dopaminergic lesion and consequent several behavioral and biochemical effects from hours to many days after (SARAVANAN *et al.*, 2005; NOSEDA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014; MADIHA *et al.*, 2021).

Therefore, in the present study we sought to investigate the early-phase motor and systemic biochemical effects observed after the rotenone-induced intranigral model of PD.

METHODS

Ethics statement

All procedures with animal were conducted according guidelines of ethics and experimental care and use of laboratory animals (SBCAL) and were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Paraná (approval ID #1216).

Animals

Male Wistar rats weighing 280-320 g at the beginning of the experiments. The animals were randomly housed in groups of four in polypropylene cages with wood shavings as bedding and maintained in a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) on a 12:12-h light dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The animals had free access to food and water throughout the experiment.

Experimental design

The animals were distributed randomly in two groups called sham and rotenone (n= 10). The rotenone grouped received bilateral infusion of 1 μ L of rotenone (12 μ g/ μ L). Sham operations followed the same procedure, but 1 μ L of dimethylsulfoxide (DMSO) was injected instead. Twenty four hours after the stereotaxic surgeries, the animals underwent the open field test followed by subsequent peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) samples collection.

Nigrostriatal lesion

The animals were deeply anesthetized with ketamine (90mg/kg) and xylazine (10mg/kg) and fixed on a stereotaxic frame. Rotenone (12 μ g/ μ L) was bilaterally infused into SNpc at a rate of 0,33 μ L/min for 3 minutes, controlled by an electronic infusion pump (*Insight Instruments*, Ribeirão Preto, Brazil ®). The following coordinates were used (having the bregma as a reference): (AP): -5.0; (ML): \pm 2.1 mm and (DV): -8.0 mm (PAXINOS; WATSON, 1997). In the SHAM groups, stereotactic surgery was performed, but the animals received 1 μ l of vehicle solution instead of the rotenone infusion.

Open Field test

The open field test apparatus consisted of a circular arena (1 m diameter) limited by a 40 cm high wall. The animals were gently placed in the center of the arena and were allowed to freely explore the area for 5 min. Two motor parameters were recorded and quantified: number of crosses (locomotion frequency) and immobility time (rats kept without any movement). The open-field was cleaned with a 10% water-ethanol solution before behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by previous rat. The tests were recorded and all analysis were conducted for unbiased researcher.

CSF Collection

At the end of the behavioral tests, CSF was collected by the method previously described (PEGG *et al.*, 2010). The anesthetized rat was placed in a stereotaxic frame and was secured with ear bars. The position of the animal's head was maintained downward at approximately 45°. Immediately after the exposure of the depressible surface with the appearance of a rhomb, a 30G-needle connected to a 1 ml syringe was inserted horizontally and centrally into the cisterna magna at 30° angle to the dura, from the caudal end of the incision. About 50-100 µl of CSF were obtained from each rat. Only clear CSF without visual signs of blood contamination was collected into 0.5 ml microtube and frozen at -80 °C until further use. Laboratory evaluation of CSF glucose was conducted using enzymatic assay (Labtest®, Brazil).

Biochemical blood analysis

After CSF collection, the rats were quickly decapitated followed by total blood sample collection from the carcasses. About 7 ml of blood was collected, for each animal, in tubes containing sodium heparin to prevent clotting. The separation of plasma was achieved by centrifugation at 3000 x g 4° for 15 min. Afterwards, 2 ml of plasma was pipetted and transferred to identified plastic tubes and stored at -80° C until analysis. Quantification of lipid profile and glucose from the plasma was obtained with the use of commercial kits (Labtest®, Brazil) using spectrophotometric methods.

Statistical Analysis

Normality of the data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Unpaired Student's *t* tests were used to compare values between the two groups sham and rotenone. Pearson's correlation coefficients ($r=0.2$ - weak, $r=0.5$ - moderate, $r\geq 0.8$ - strong) were calculated to investigate the possible association or similarity measures between two parameters such as locomotion and immobility or total-cholesterol and HDL-cholesterol or plasma-glucose and CSF-glucose.

Comparisons of Pearson's correlation coefficients were performed according to Fisher's Z-transformation (z-score). Relative effect sizes (*d*) were calculated for the CSF-glucose and LDL-cholesterol concentration comparisons (sham x rotenone) in order to establish the type of the effect size observed ($d=0.2$ - small, $d=0.5$ - medium, $d\geq 0.8$ - large) (Cohen, 1989; Sullivan and Feinn 2012). Values are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). The level of significance was set at $p\leq 0.05$.

RESULTS

As shown in figure 1A, there was a significant reduction [$t(16)=2.16$; $P=0.05$] in the locomotion parameter for the rotenone group, compared to the sham. Complementary, the analysis of the immobility time (figure 1B) demonstrated a significant increase of this parameter for the rotenone group, when compared to the sham [$t(16)=2.76$; $P=0.001$]. In order to provide a clear behavioral demonstration of the intrinsic association between these two parameters (locomotion and immobility) as a validation of our PD model, we showed (figure 1C) the existence of a strong negative correlation between them ($r=-0.85$; $P<0.0001$). In addition, we demonstrated that dopaminergic lesion within the SNpc, by the rotenone infusion, did not affect the mean weight of the animals (figure 1D), compared to the sham group [$t(16)=1.64$; $P=0.12$].

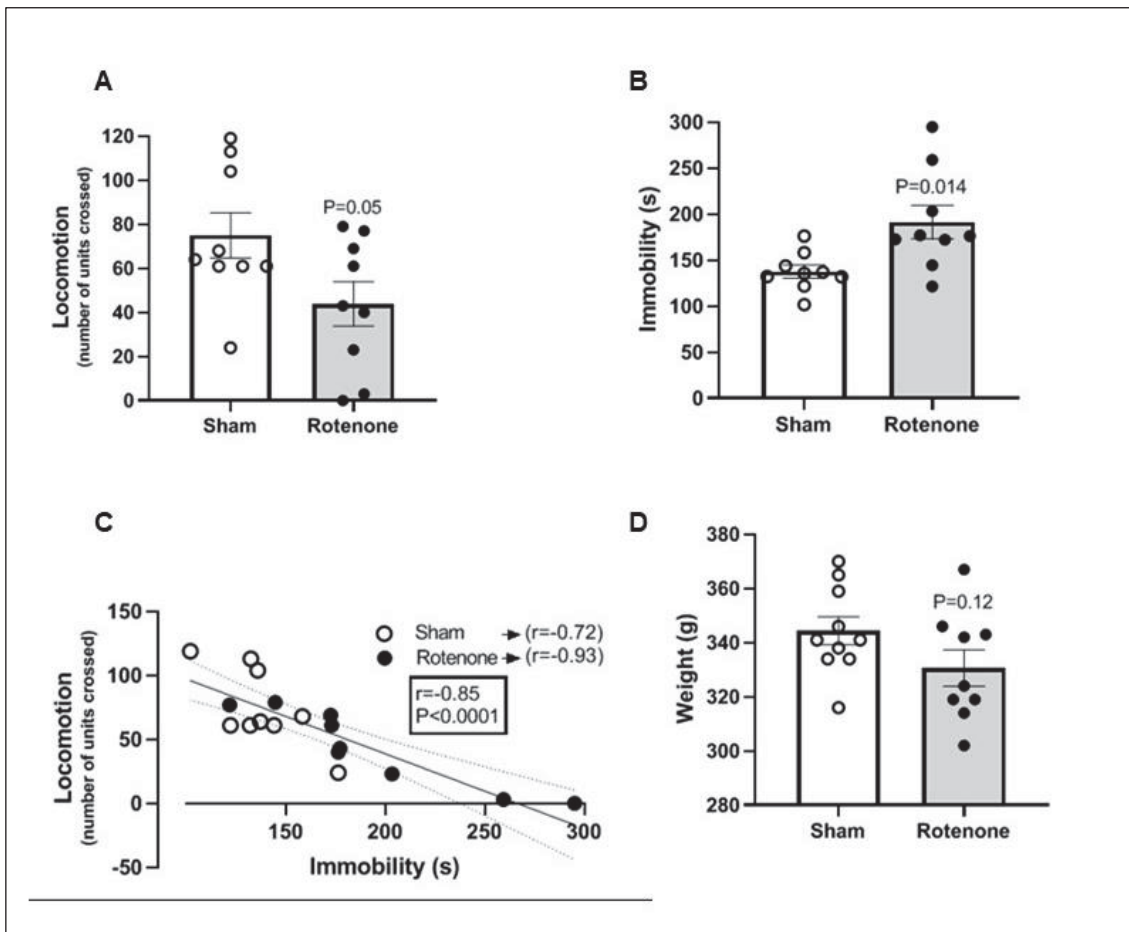


Figure 1. Motor Behavioral disruption induced by intranigral rotenone. **(A)** Locomotion (number of units crossed), $t(16)=2.164$; $P=0.05$. **(B)** Immobility time (seconds), $t(16)=2.76$; $P=0.014$. **(C)** Pearson's correlation between locomotion (number of units crossed) and immobility time (seconds). Arrows indicate correlations considering only sham or rotenone groups. Also, considering these separate correlations, it was obtained a z-score (z) for sham ($z=-0.72$) and rotenone ($z=-1.66$) groups. **(D)** Weights (grams) $t(16)=1.64$; $P=0.12$. The data are expressed as mean \pm standard error of the mean ($n=9-10$ per group). Unpaired t test.

The evaluation of the biochemical parameters indicated the occurrence of a significant decrease in the total cholesterol concentration (figure 2A) in the rotenone group, compared to the sham group [$t(17)=2.27$; $P=0.036$]. However, we did not observe statistical differences concerning the levels of triglycerides concentrations (figure 2B) between both groups [$t(17)=1.07$; $P=0.28$]. Further, HDL-cholesterol showed to be reduced [$t(17)=3.08$; $P=0.007$] as a product of the rotenone intranigral lesion, considering the comparison with the sham group (figure 2C). However, as shown by figure 2D, no difference was detected, between the groups, regarding the

levels of LDL-cholesterol [$t(17) = 0.43; P = 0.67$]. Interestingly, the detection of plasma-glucose (figure 2E) revealed a significant increase of this parameter induced by rotenone, compared to the sham group [$t(17) = 2.43; P = 0.03$]. In contrast, we could not find a significant difference between the groups, when the levels of CSF-glucose (figure 2F) were measured [$t(8) = 1.06; P = 0.3$].

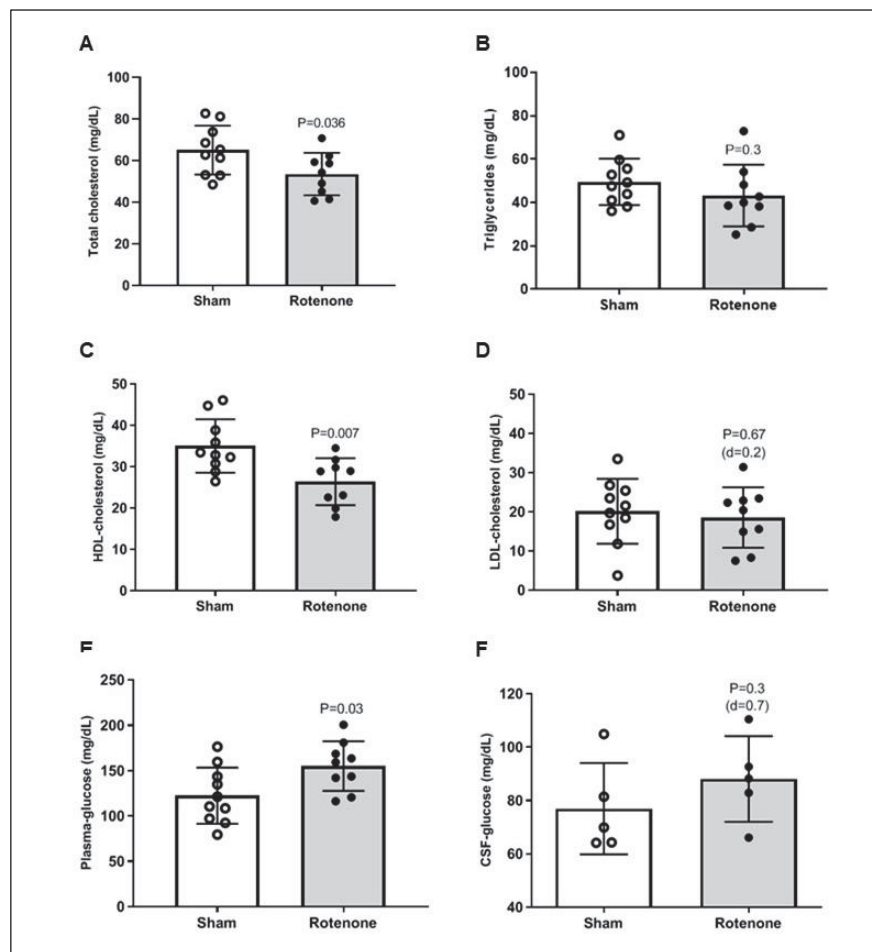


Figure 2. Biochemical alterations inflicted by intranigral rotenone. **(A)** Cholesterol, $t(17) = 2.27; P = 0.036$. **(B)** Tryglicerids, $t(17) = 1.107; P = 0.28$. **(C)** HDL-cholesterol, $t(17) = 3.08; P = 0.007$. **(D)** LDL-cholesterol $t(17) = 0.43; P = 0.67$, effect size ($d = 0.2$) small. **(E)** Plasma glucose $t(17) = 2.43; P = 0.03$. **(F)** CSF glucose $t(8) = 1.06; P = 0.3$, effect size ($d = 0.7$) medium/large. The data are expressed as mean \pm standard error of the mean ($n = 9-10$ per group for plasmatic samples and $n = 5$ for CSF samples). Unpaired t test.

A complementary analysis emphasized the existence of a significant and strong positive correlation ($r = 0.80; P = 0.0001$) between total-cholesterol and LDL-cholesterol. Likewise, there was observed an equally strong correlation between plasma-glucose and CSF-glucose ($r = 0.81; P = 0.004$). In opposite, we could not find

any other significant correlation for the following variables: total-cholesterol and HDL-cholesterol ($r=0.19$; $P=0.43$); total-cholesterol and triglycerides ($r=0.006$; $P=0.9$); total-cholesterol and plasma-glucose ($r=-0.15$; $P=0.5$); total-cholesterol and CSF-glucose ($r=-0.37$; $P=0.3$); total-cholesterol and locomotion ($r=0.013$; $P=0.96$); total-cholesterol and immobility ($r=-0.091$; $P=0.71$); HDL-cholesterol and LDL-cholesterol ($r=0.051$; $P=0.84$); HDL-cholesterol and locomotion ($r=0.15$; $P=0.55$); HDL-cholesterol and immobility ($r=-0.07$; $P=0.76$); plasma-glucose and locomotion ($r=-0.03$; $P=0.92$); plasma-glucose and immobility ($r=0.19$; $P=0.44$).

TABLE 1 – PEARSON'S CORRELATIONS BETWEEN BIOCHEMICAL AND MOTOR PARAMETERS

Parameter correlations	r and P values
Total-cholesterol x HDL-cholesterol	0.19; 0.43
Total-cholesterol x LDL-cholesterol	0.80; 0.0001 *
Total-cholesterol x triglycerides	0.006; 0.9
Total-cholesterol x plasma-glucose	-0.15; 0.5
Total-cholesterol x CSF-glucose	-0.37; 0.3
Total-cholesterol x locomotion	0.013; 0.96
Total-cholesterol x immobility	-0.091; 0.71
Plasma-glucose x CSF-glucose	0.81; 0.004*
HDL-cholesterol x LDL-cholesterol	0.051; 0.84
HDL-cholesterol x locomotion	0.15; 0.55
HDL-cholesterol x immobility	-0.07; 0.76
Plasma-glucose x locomotion	-0.03; 0.92
Plasma-glucose x immobility	0.19; 0.44

Statistical significant correlations are indicated with an asterisk.

DISCUSSION

In the present study, we investigated the metabolic and motor effects following an acute intranigral lesion induced by rotenone. As expected, our PD model was able to replicate the typical motor behavior impairment seen in this disease (SWARNKAR *et al.*, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2010; FATHALLA *et al.*, 2016; KMITA *et al.*, 2019). Complementary, we settled this pattern of motor deficit with the observation of a strong negative correlation between locomotion and immobility time ($r=-0.85$), including both groups (sham and rotenone). That is, the higher was the immobility time, the lower was the locomotion units counted during the test. In order to isolate the effect produced by each group we correlated the motor parameters solely using the data from the sham or rotenone groups. Thus, such analysis showed a moderate coefficient value ($r=-0.72$; $P=0.03$) obtained for the sham group and a strong coefficient ($r=-0.93$; $P=0.0003$) for the rotenone group. Since both coefficients were significant, but different in terms of probabilities, we decided to compare the equivalent z-scores for each of the groups. Accordingly, it was generated a critical z-score, for the sham group ($z=-0.91$) and for the rotenone group ($z=-1.66$). Since z-score is a measure of how many standard deviations below or above the population mean a raw score is, these results revealed that 81.8% of the correlation effect was associated with the sham group, although 95.1% of the correlation effect was due to rotenone lesion itself. Hence, this increment in 13.3% of the effect, due to the presence of the rotenone group, strongly corroborates the behavioral validity of the intranigral model of PD.

Biochemical analysis of plasma showed a reduction in both total cholesterol and HDL-cholesterol concentrations associated with the rotenone exposure. Nevertheless, we failed to detect statistical differences, between groups, regarding the triglycerides and LDL-cholesterol plasmatic concentrations. Instead, it was observed a strong correlation ($r=0.8$; $P=0.0001$) between total cholesterol and LDL-cholesterol concentrations. Since the latter was not affected by the rotenone lesion itself, we calculated the effect size (d), after this comparison, in order to assess the impact of the intranigral rotenone in LDL-cholesterol. In fact, we obtained a small ($d=0.2$) relative effect size, firmly indicating that the correlation described is entirely a product of the rotenone-induced reduction in the total-cholesterol levels. Moreover, no significant correlation was noticed between total-cholesterol and HDL-cholesterol concentrations (both affected by rotenone lesion), probably because both parameters were equally

affected by the neurotoxin. These rotenone-induced reductions in total and HDL-cholesterol levels could indicate that this neurotoxin is able to promote some significant modulation in cholesterol extrusion (HUANG; MAHLEY, 2014), perhaps hampering the apolipoprotein-E binding activity (COLARDO *et al.*, 2022), thus impacting in cholesterol imbalance in the brain, as well. Cholesterol brain homeostasis is indispensable for neuronal physiology, as a structural component for cellular membrane, synapses metabolism and myelin sheath (MAHLEY, 2016). For instance, in SH-SY5Y neurons co-exposed to a hypercholesterolemic condition and to the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium it was reported an exacerbation of mitochondrial toxicity, probably due to increased membrane lipid peroxidation and free radical generation (RAJU *et al.*, 2018). Certainly, the mechanisms of rotenone-induced cholesterol changes are still far from being understood, but our data are the first evidence that intranigral rotenone could potentially impact such peripheral metabolism with conceivable repercussions for locomotor behaviors, probably in later time points.

Another parameter that was strikingly affected by the intranigral rotenone lesion is the plasma-glucose concentration. In fact, the significant increase induced by rotenone, apparently, was not equally extended to CSF-glucose concentration. Notwithstanding, the verification of a strong correlation ($r=0.81$; $P=0.004$) between those two parameters build up a hypothesis related to a hyperglycemia repercussion from the plasma to the CSF. Indeed, the calculation of the effect size for CSF-glucose levels showed a medium to large effect ($d=0.7$) attributed to rotenone lesion, which emphasizes our hypothesis of a peripheral and central hyperglycemic-induced effect. Glucose is the obligatory energy substrate of the adult brain and dopaminergic neurons in the SNpc consume a significant amount of energy during their pace making activity, which leads to increased levels of basal oxidative stress (GUZMAN *et al.*, 2010). Therefore, energy failure associated with mitochondrial dysfunction is the hallmark of PD (GIBSON *et al.*, 2003; PERIER; VILA, 2012). Moreover, rotenone is largely used to induce mitochondrial dysfunction in dopaminergic cells (TESTA *et al.*, 2005; PANOVA *et al.*, 2005; MARTINEZ; GREENAMYRE, 2012) through a mechanism associated with complex I inhibition (DE LA FUENTE *et al.*, 2017) and the generation of ROS (CARTELLI *et al.*, 2010; DRANKA *et al.*, 2012). Together, we suggest that this apparent type-2 diabetes mellitus-like hyperglycemic effect observed could be related, at least, with two, not excluding, mechanisms: (i) acute and systemic mitochondrial rotenone toxicity, (ii) SNpc nigral toxicity. The first mechanism supports the peripheral

changes herein described, whilst the second may hold the explanation for the purportedly central effects of hyperglycemia within the CSF. Also, the literature brings interesting evidence of profound alterations in the pentose phosphate pathway induced by mitochondrial complex I inhibition (LEI *et al.*, 2014). The same study also found an increase in the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase due to this mitochondrial inhibition and associated such increment with a higher cellular toxicity (LEI *et al.*, 2014). Complementary, type-2 diabetes mellitus affects the regulation of dopaminergic transmission and maintenance of synapses metabolism (BASSIL *et al.* 2014) The brains of PD patients with type-2 diabetes mellitus exhibit a process similar to peripheral insulin resistance, suggesting potential common molecular pathways, which brings more relevance to our findings. In animal models, both mice treated with high-fat diets and leptin receptor homozygous deficient mice exhibit increased vulnerability to nigrostriatal neurodegeneration (PÉREZ-TABOADA *et al.*, 2020), again indicating the close relationship between diseases. Considering that all the metabolic changes observed were acutely detected, it was not a surprise to see that no significant difference in body weight of the groups was detected. However, it is conceivable to propose that some changes may occur in a longer protocol of detection. Surely, this will be the focus of an upcoming study.

In conclusion, we showed that the intranigral rotenone PD model was able to replicate the typical motor behavior impairment seen in this disease. In addition, it was demonstrated the first evidence indicating that this model is able to decrease plasmatic total-cholesterol and HDL-cholesterol potentially impacting peripheral metabolism with conceivable repercussions for locomotor behaviors, probably in later time points. Also, it was revealed a potential ability to reproduce type-2 diabetes mellitus-like hyperglycemic which could be explained by acute and systemic mitochondrial rotenone toxicity and SNpc nigral toxicity. Such mechanisms may still be responsible for the potential occurrence of CSF-hyperglycemia. Since intranigral rotenone is an early-phase model of PD, the present results open a new road for studies aiming to investigate metabolic changes in PD, particularly because patients with type-2 diabetes mellitus have a higher risk of developing PD, and the presence of type-2 diabetes mellitus is associated with greater PD severity and faster progression (PAGANO *et al.*, 2018; KOMICI *et al.*, 2021), suggesting that metabolic dysfunctions may be facilitating factors of neurodegeneration.

Acknowledgments

The authors wish to express their sincere gratitude to Fabio Roberto Caetano from Physiology Department of UFPR for the technical assistance.

Funding

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), (Financecode 001), Edital Pro-equipamentos, FINEP – Edital Pró-Infra 2009 (CT-INFRA), Fundação Araucária (Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – PRONEX, #116/2018), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (Universal #431279/2016-0). MMSL is recipient of CNPq fellowship.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- BAR-ON, P.; CREWS, L.; KOOB, A. O. *et al.* Statins reduce neuronal α -synuclein aggregation in in vitro models of Parkinson's disease. **J Neurochem**. 105:1656-1667, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05254>.
- BASSIL, F.; FERNAGUT, P. O.; BEZARD, E.; MEISSNER, W. G. Insulin, IGF-1 and GLP-1 signaling in neurodegenerative disorders: Targets for disease modification? **Prog Neurobiol**. 118:1-18, 2014.
- BONATO, J. M.; BASSANI, T. B.; MILANI, H. *et al.* Pioglitazone reduces mortality, prevents depressive-like behavior, and impacts hippocampal neurogenesis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in rats. **Exp Neurol**. 300:188-200, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.11.009>.
- BYKOV, K.; YOSHIDA, K.; WEISSKOPF, M. G.; GAGNE, J. J. Confounding of the association between statins and Parkinson disease: systematic review and meta-analysis. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**. 26:294–300, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pds.4079>.
- CARTELLI, D.; RONCHI, C.; MAGGIONI, M. G. *et al.* Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP⁺-induced neurodegeneration. **J Neurochem**. 115:247–258, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06924>.

CHIA, S. J.; TAN, E. K.; CHAO, Y. X. Historical perspective: Models of Parkinson's disease. **Int J Mol Sci.** 21, 2020.

CHOHAN, H.; SENKEVICH, K.; PATEL, R. K. *et al.* Type 2 Diabetes as a Determinant of Parkinson's Disease Risk and Progression. **Movement Disorders.** 36:1420-1429, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.28551>.

COHEN, J. Things I have learned (so far). **Am Psychol.** 45:1304-1312, 1990.

COLARDO, M.; PETRAROIA, M.; LERZA, L. *et al.* (2022) NGF Modulates Cholesterol Metabolism and Stimulates ApoE Secretion in Glial Cells Conferring Neuroprotection against Oxidative Stress. **Int J Mol Sci.** 23, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23094842>.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron.** 39: 889-909, 2003. Disponível em: [https://doi: 10.1016/s0896-6273\(03\)00568-3](https://doi: 10.1016/s0896-6273(03)00568-3).

DE LA FUENTE, C.; BURKE, D. G.; EATON, S.; HEALES, S. J. R. Inhibition of neuronal mitochondrial complex I or lysosomal glucocerebrosidase is associated with increased dopamine and serotonin turnover. **Neurochem Int.** 109:94-100, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.02.013>.

DORIA, M.; MAUGEST. L.; MOREAU, T. *et al.* Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med.** 101:393-400, 2016.

DRANKA, B. P.; ZIELONKA, J.; KANTHASAMY, A. G.; KALYANARAMAN, B. Alterations in bioenergetic function induced by Parkinson's disease mimetic compounds: Lack of correlation with superoxide generation. **J Neurochem.** 122:941-951, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07836>.

FATHALLA, A. M.; SOLIMAN, A. M.; ALI, M. H.; MOUSTAFA, A. A. Adenosine A2A receptor blockade prevents rotenone-induced motor impairment in a rat model of parkinsonism. **Front Behav Neurosci.** 10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00035>.

GARCÍA-SANZ, P, M.F.G. AERTS, J.; MORATALLA, R. The Role of Cholesterol in α -Synuclein and Lewy Body Pathology in GBA1 Parkinson's Disease. **Movement Disorders.** 36:1070-1085, 2021.

GIBSON, G. E.; KINGSBURY, A. E.; XU, H. *et al.* Deficits in a tricarboxylic acid cycle enzyme in brains from patients with Parkinson's disease. **Neurochem Int.** 43:129-135, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00225-5](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00225-5).

GUZMAN, J.N.; SANCHEZ-PADILLA, J.; WOKOSIN, D. *et al.* Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. **Nature.** 468:696-700, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature09536>.

HIRSCH, L.; JETTE, N.; FROLKIS, A. *et al.* The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Neuroepidemiology.** 46:292-300, 2016.

- HOGG, E.; ATHREYA, K.; BASILE, C. *et al.* High prevalence of undiagnosed insulin resistance in non-diabetic subjects with Parkinson's disease. **J Parkinsons Dis.** 8:259-265, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/JPD-181305>.
- HU, G.; JOUSILAHTI, P.; BIDEL, S. *et al.* Type 2 Diabetes and the Risk of Parkinson's Disease. **Xxxx.** 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/dc06>.
- HUANG, X.; STERLING, N. W.; DU, G. *et al.* Brain cholesterol metabolism and Parkinson's disease. **Movement Disorders.** 34:386-395, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.27609>.
- HUANG, Y.; MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. **Neurobiol Dis.** 72:3-12, 2014.
- JEONG, S. M.; JANG, W.; SHIN, D. W. Association of statin use with Parkinson's disease: Dose-response relationship. **Movement Disorders.** 34:1014-1021, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.27681>.
- JIN, U.; PARK, S. J.; PARK, S. M. Cholesterol metabolism in the brain and its association with Parkinson's disease. **Exp Neurobiol.** 28:554-567, 2019.
- KEENEY, P. M.; XIE, J.; CAPALDI, R. A.; BENNETT, J. P. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. **Journal of Neuroscience.** 26:5256-5264, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0984-06.2006>.
- KMITA, L. C.; ILKIW, J. L.; RODRIGUES, L. S. *et al.* Absence of a synergic nigral proapoptotic effect triggered by REM sleep deprivation in the rotenone model of Parkinson's disease. In: Sleep Science. **Brazilian Association of Sleep and Latin American Federation of Sleep Societies.** P. 196-202, 2019.
- KOMICI, K.; FEMMINELLA, G. D.; BENCIVENGA, L.; RENGO, G.; PAGANO, G. Diabetes Mellitus and Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analyses. **J Parkinsons Dis.** 1(4):1585-1596, 2021. Disponível em: [doi:10.3233/JPD-212725](https://doi.org/10.3233/JPD-212725).
- LEI, S.; ZAVALA-FLORES, L.; GARCIA-GARCIA, A. *et al.* Alterations in energy/redox metabolism induced by mitochondrial and environmental toxins: A specific role for glucose-6-phosphate-dehydrogenase and the pentose phosphate pathway in paraquat toxicity. **ACS Chem Biol.** 9:2032-2048, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cb400894a>.
- LIN, C. H.; CHANG, C. H.; TAI, C. H. *et al.* A Double-Blind, Randomized, Controlled Trial of Lovastatin in Early-Stage Parkinson's Disease. **Movement Disorders.** 36:1229-1237, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.28474>
- 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.** 16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258928>.
- MAHLEY, R. W. Central nervous system lipoproteins: ApoE and regulation of cholesterol metabolism. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 36:1305-1315, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307023>.

MARQUES, A.; DUTHEIL, F.; DURAND, E. *et al.* Glucose dysregulation in Parkinson's disease: Too much glucose or not enough insulin? **Parkinsonism Relat Disord.** 55:122-127, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.05.026>.

MARTINEZ, T. N.; GREENAMYRE, J. T. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal.** 16:920–934, 2012.

MUTEZ, E.; DUHAMEL, A.; DEFEBVRE, L. *et al.* Lipid-lowering drugs are associated with delayed onset and slower course of Parkinson's disease. **Pharmacol Res.** 60:41-45, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.03.010>.

NAKAMURA, K.; MORI, F.; TANJI, K. *et al.* Isopentenyl diphosphate isomerase, a cholesterol synthesizing enzyme, is localized in Lewy bodies. **Neuropathology.** 35:432-440, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/neup.12204>.

NOSEDA, A. C. D.; RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D. S. *et al.* Putative role of monoamines in the antidepressant-like mechanism induced by striatal MT2 blockade. **Behavioural Brain Research.** 275:136-145, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.007>.

PAGANO, G.; POLYCHRONIS, S.; WILSON, H. *et al.* Diabetes mellitus and Parkinson disease. **Neurology.** 90:E1654–E1662, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005475>.

PANOV, A.; DIKALOV, S.; SHALBUYEVA, N. *et al.* Rotenone model of Parkinson disease: Multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. **Journal of Biological Chemistry.** 280:42026-42035, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M508628200>.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press, Orlando.** 1997.

PÉREZ-TABOADA, I.; ALBERQUILLA, S.; MARTÍN, E. D. *et al.* Diabetes Causes Dysfunctional Dopamine Neurotransmission Favoring Nigrostriatal Degeneration in Mice. **Movement Disorders.** 35:1636-1648, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.28124>.

PERIER, C.; VILA, M. Mitochondrial biology and Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med.** 2:2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009332>.

PIATKOWSKA-CHMIEL, I.; HERBET, M.; GAWROŃSKA-GRZYWACZ, M.; DUDKA, J. Regulation of Neuroinflammatory Signaling by PPAR γ Agonist in Mouse Model of Diabetes. **Int J Mol Sci.** 23:2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23105502>.

PINTO, M.; NISSANKA, N.; PERALTA, S. *et al.* Pioglitazone ameliorates the phenotype of a novel Parkinson's disease mouse model by reducing neuroinflammation. **Mol Neurodegener.** 11:2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0090-7>.

RAJU, A.; JAISANKAR, P.; BORAH, A.; MOHANAKUMAR, K. P. 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Death of Differentiated SH-SY5Y Neurons Is Potentiated by

Cholesterol. **Ann Neurosci.** 24:243-251, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000481551>.

RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D. S.; NOSEDA, A. C. D. *et al.* Olfactory impairment in the rotenone model of parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. **Front Cell Neurosci.** 8:2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00383>.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, A.; DÍAZ, Y.; DUARTE-SALLES, T., *et al.* Prediabetes, type 2 diabetes mellitus and risk of Parkinson's disease: A population-based cohort study. **Parkinsonism Relat Disord.** 89:22-27, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.06.002>.

SANTIAGO, R. M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M. M. S. *et al.* 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. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 34:1104-1114, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.004>.

SARAVANAN, K. S.; SINDHU, K. M.; MOHANAKUMAR, K. P. Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. **Brain Res.** 1049:147-155, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.051>.

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nat Rev Neurosci.** 18:435-450, 2017.

SCHERNHAMMER, E.; HANSEN, J.; RUGBJERG, K. *et al.* Diabetes and the risk of developing Parkinson's disease in Denmark. **Diabetes Care.** 34:1102-1108, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/dc10-1333>.

STERN, M. B.; LANG, A.; POEWE, W. Toward a redefinition of Parkinson's disease. **Movement Disorders.** 27:54-60, 2012.

SULLIVAN, G. M.; FEINN, R. Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough. **J Grad Med Educ.** 4:279-282, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4300/jgme-d-12-00156.1>.

SWARNKAR, S.; SINGH, S.; MATHUR, R. *et al.* A study to correlate rotenone induced biochemical changes and cerebral damage in brain areas with neuromuscular coordination in rats. **Toxicology.** 272:17-22, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.03.019>.

TESTA, C. M.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. **Molecular Brain Research.** 134:109-118, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.11.007>.

TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neural Transm.** 124:901-905, 2017.

VOLTA, M.; MILNERWOOD, A. J.; FARRER, M. J. Insights from late-onset familial parkinsonism on the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 14:1054-1064, 2015.

ZANELLATI, M. C.; MONTI, V.; BARZAGHI, C. *et al.* Mitochondrial dysfunction in Parkinson disease: Evidence in mutant PARK2 fibroblasts. **Front Genet.** 6:78, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00078>.

CAPÍTULO 2

Long-term exposure to a high fat diet is able to produce metabolic impairment and depressive-like behaviors

Ana Paula Chuproski¹, Evellyn Mayla Azevedo¹, Jéssica Ilkiw¹, Jéssica Miloch¹,
Maria Eugênia Balbi³ and Marcelo M. S. Lima^{1,2}

¹Neurophysiology Laboratory, Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

²Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

³Bromatology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

ABSTRACT

Last decades, overweight, obesity and metabolic syndrome are global public health concerns. Several evidence has shown that increased fat intake is associated with mental brain disorders, such as depression chronic mild inflammation including obesity-induced neuroinflammation. Here, we investigate the biochemical and behavioral effects of high fat diet in 3 times of exposure. Wistar rats were randomly submitted either to HFD (containing 35% of calories from fat) or a regular chow diet (containing 5% of calories from fat) for 6, 8 or 10 weeks. Physiological measures such as food consumption, body weight, blood biochemistry and behaviors such as motor activity and depressive-like behaviors (open field and forced swim test) were evaluated. Biochemical analysis showed increased in triglycerides, total cholesterol and LDL-C in HFD groups after 6 and 8 weeks. For behavioral effects, the HFD 10 weeks group exhibited an increase motor activity in the open field test and HFD 8 weeks group also showed higher immobility time. Collectively, these results

demonstrate that HFD produced a dyslipidemic phenotype and behavioral deficits in rats.

INTRODUCTION

In modern western society, metabolic disorders have acquired epidemic proportions, and are therefore a global public health concern (AASETH *et al.*, 2021; CABALLERO, 2019). Since the industrial revolution, dietary habits have drastically changed with an increase in the consumption of industrialized and processed foods with low nutritional value (CABALLERO, 2019) led to an increase in the intake of saturated fatty acids and trans fat (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). Thus, there is observed in the population a dramatic change in the normal concentration of lipids in the blood with an increase in total cholesterol, a reduction in HDL cholesterol and an increase in the LDL fraction, contributing to a dyslipidemic phenotype (BERBERICH; HEGELE, 2022)

Obesity, metabolic syndrome, and diabetes affect millions of people worldwide (CHEW *et al.*, 2023; O'NEILL; O'DRISCOLL, 2015), one of the factors closely related to them is a lifestyle with physical inactivity and, of course, inadequate diet (PIRILLO *et al.*, 2021; STANAWAY *et al.*, 2018)

There is a strong relationship between obesity and depression. Obesity increases the risk of developing depression and depression to be associated with being overweight (LUPPINO *et al.*, 2010). A possible link between cholesterol metabolism disruption and depression is under scrutiny in both clinical and preclinical studies (HAN, 2022; LI *et al.*, 2017; LUDKA *et al.*, 2014). Several evidence indicates that high fat intake has negative effects on emotional health and cognitive function capable of altering the inflammatory response profile (GAWLINSKA *et al.*, 2019), the release of neurotransmitters (ZEMDEGS *et al.*, 2016) and even the gut microbiota (HASSAN *et al.*, 2019). Besides, the use of low density lipoprotein (LDL)-cholesterol receptors knockout mice, as a genetic model of hypercholesterolemia, showed the occurrence of depressive-like behaviors, which were correlated to hypercholesterolemia (ENGEL *et al.*, 2016). A range of cholesterol markers, including total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol and LDL-

cholesterol, have been explored in depression (PAREKH *et al.*, 2017). An interesting meta-analysis showed that HDL-cholesterol was significantly lower in depressed patients versus controls, independent of antidepressant treatment effects (LIU *et al.*, 2015).

In this context, some research has pointed to the animal model with high-calorie diets as the main model capable of mimicking the characteristic changes of metabolic syndrome and dyslipidemia in humans (BROWN; PANCHAL, 2011). High fat diet has high concentrations of fat without increasing sugars, by adding food or adding fat in the animals' diet (BUETTNER *et al.*, 2006). Several studies have related high fat diet to depression, but exposure time and diet composition are highly variable (ABILDGAARD *et al.*, 2011; ASLANI *et al.*, 2015; BOLDARINE *et al.*, 2019; KARTH *et al.*, 2019; TSAI *et al.*, 2022). Furthermore, it is not very well understood the effect of high fat diet non-obesogenic, metabolic biomarkers and their impact on mood disorders.

In the present study, we investigated the effect of high fat diet-based animal model of dyslipidemia in adult Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

Ethics statement

All procedures with animal were conducted according guidelines of ethics and experimental care and use of laboratory animals (SBCAL) and were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Paraná (approval ID #1216).

Animals

A total of sixty male Wistar rats weighing 280-320 g at the beginning of the experiments. The rats were allowed 1 week to acclimate to the environment before beginning the experiment. The animals were randomly housed in groups of four in polypropylene cages with wood shavings as bedding and maintained in a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) on a 12:12-h light dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The animals had free access to food and water throughout the experiment.

Experimental design

After a 1-week habituation period, rats were randomly distributed into two main groups according to the diets that they were exposed to: standard diet (SD-group) and high fat diet (HFD-group). In addition, such groups were tested regarding the different weeks of diet exposure, creating a panel of comparisons of 6, 8 and 10 weeks exposure time-points.

High fat diet (HFD) composition, weight and percentage of body fat/body weight follow up

The experimental HFD employed consisted of a hyperlipidic and hypercaloric mixture adapted from the protocol used by ESTADELLA *et al.*, 2004 and ARCEGO *et al.*, 2018. The composition of such a diet was: Nuvilab® crushed commercial feed, lard, roasted peanuts and milk chocolate in a 3:2:2:1 ratio, respectively. The nutritional composition of both diets comparing SD, used as a control, versus the experimental HFD is presented in Table 1. Body weight gain and calorie intake were measured weekly until the end of the diet administration.

Modified Forced Swimming test

A modification of the method proposed by Porsolt *et al.* (1978) was performed (RÉNÉRIC *et al.*, 2002). Rats were individually placed in a cylinder (height 50 cm, diameter 23 cm) filled with water to a depth of 30 cm ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) for a 15-min pretest. Next, rats were removed from the water and dried using towels and then returned to their home cages. The cylinders were emptied and cleaned between tests. Around twenty-four hours after the pretest, the rats were retested under the same conditions for 5 min. The behavior was characterized by swimming (movements throughout the swim cylinder), climbing (upward-directed movements with the forepaws along the cylinder walls) and immobility (floating with minimal movements with head just above the water).

Open-field test

Motor activity was measured using an open-field (OF) apparatus. The OF consisted of a circular arena (1 m of diameter) limited by a 40 cm high wall. The animals were individually placed in the center of the arena and allowed to freely explore the area for 5 min. The number of crossings represents the locomotion activity and rearings represents explorative activity. After each animal was exposed to the OF, the apparatus was cleaned with 10% ethanol before behavioral testing to eliminate possible bias caused by odors left by previous rats.

Tissue and blood collection

At the end of the experiment, the animals were euthanized through decapitation and then blood was collected with heparine tubes. Blood samples were collected and centrifuged at 3000 rpm at 4°C for 15 min, and plasma was stored at –20°C until assessment. Adipose tissues, including mesenteric, perigonadal and retroperitoneal fat from rat were weighed and stored at –80 °C for future analysis. Body Adiposity Index was calculated using the following formula and body fat was obtained by adding the perigonadal, mesenteric fat to the retroperitoneal fat tissue: $\text{Body fat} / \text{Final body weight} \times 100$.

Biochemical analysis

Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and total triglycerides levels were determined using using commercially available enzymatic colorimetric kits (Labtest Diagnóstica, S.A., Brazil) according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as mg per milliliter (mg/mL) of plasma.

Statistical analysis

Normality of the data was accessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Unpaired Mann Whitney test was used to compare the nutritional composition of the diets (SD x HFD). Body weights and behavioral parameters comparisons between time-points were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA - time as a within-subjects

factor and diet as between-subjects factor) followed by Bonferroni's multiple comparison test. Unpaired Student's t tests were used to compare the values between the groups, for each time-point of analyses. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The level of statistical significance was set at $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.04 software (GraphPad Software, USA).

RESULTS

High fat diet (HFD) and standard diet (SD) composition

Table 1 shows a detailed analysis of the main nutritional components (% of 100g) of HFD compared to the SD. We found that HFD presented a significant higher percentage of total fat ($P = 0.01$) and was 57.3% more caloric than SD. Despite that enrichment, HFD demonstrated to be poor in carbohydrates (decrease in 26.5%), proteins ($P < 0.05$), fibers ($P < 0.05$) and minerals ($P < 0.05$).

TABLE 1 – NUTRITIONAL COMPOSITION OF STANDARD DIET (SD) VERSUS HIGH FAT DIET (HFD)

Nutrients % per 100 g		
	SD	HFD
Total fat	4.52 \pm 0.02	34.6 \pm 0.2
Carbohydrates	46.8	34.4
Proteins	23.9 \pm 0.2	10.3 \pm 0.2
Fibers	17.0 \pm 0.8	11.8 \pm 1.3
Minerals	6.1 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2
Kcal	323.4 Kcal	508.7 Kcal

Results are expressed as mean \pm standard deviation.

Weight and percentage of body fat/body weight follow up

As can be seen in figure 1A, the animals from both groups presented similar body weights in the beginning of the treatment, however, in the third week of diet exposure the body weight gain started to be significantly reduced for the HFD group, compared to its control, until the last time-point tested (week 10) as indicated by the diet [F(1.132)=339.7; P<0.0001], time [F(10.132)=400.1; P<0.0001] and interaction [F(10.132)=8.217; P<0.0001]. Although, we observed a significant increment in the relative percentage of body fat/body weight for the HFD group, at the 6 (P=0.03; figure 1B), 8 (P=0.02; figure 1C) and 10 (P=0.002; figure 1D) weeks time-points.

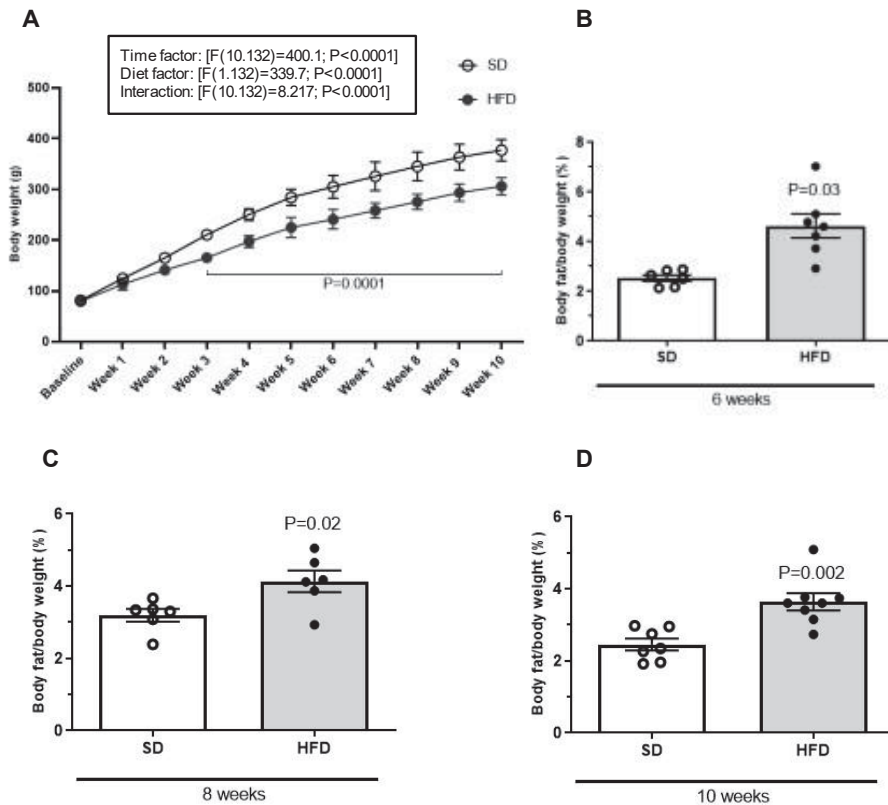


Figure 1. Weight evolution over the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD), in weeks (A). Adiposity index for each time-point is illustrated in (B) (6 weeks), (C) (8 weeks) and (D) (10 weeks). The data are expressed as mean \pm standard error of the mean (n=6-8 per group). For the body weight evolution (A) we used the two-way ANOVA with followed by the Bonferroni's post hoc test. For the adiposity index (B), (C) and (D) it was employed the unpaired t test. P values are respectively indicated.

Forced swimming test

The data presented in figure 2 reveals the analysis of the swimming time parameter. In fact, the comparison of the two groups among the different time-points tested (week 6, 8 and 10 - figure 2A) did not showed statistical differences considering the time effect [$F(2,27)=0.36$; $P=0.7$], however, it was detected a significant results for the diet effect [$F(1,27)=13.9$; $P<0.0009$], but not for the interaction [$F(2,27)=0.18$; $P=0.8$]. Since the time produced a significant difference in the groups, we decided to evaluate the possible differences for each time-point, separately. In this sense, we could only be able to observe a significant decrease in the swimming time, induced by HFD, at 8 ($P=0.02$; figure 2C) and 10 ($P=0.01$; figure 2D) weeks of exposure.

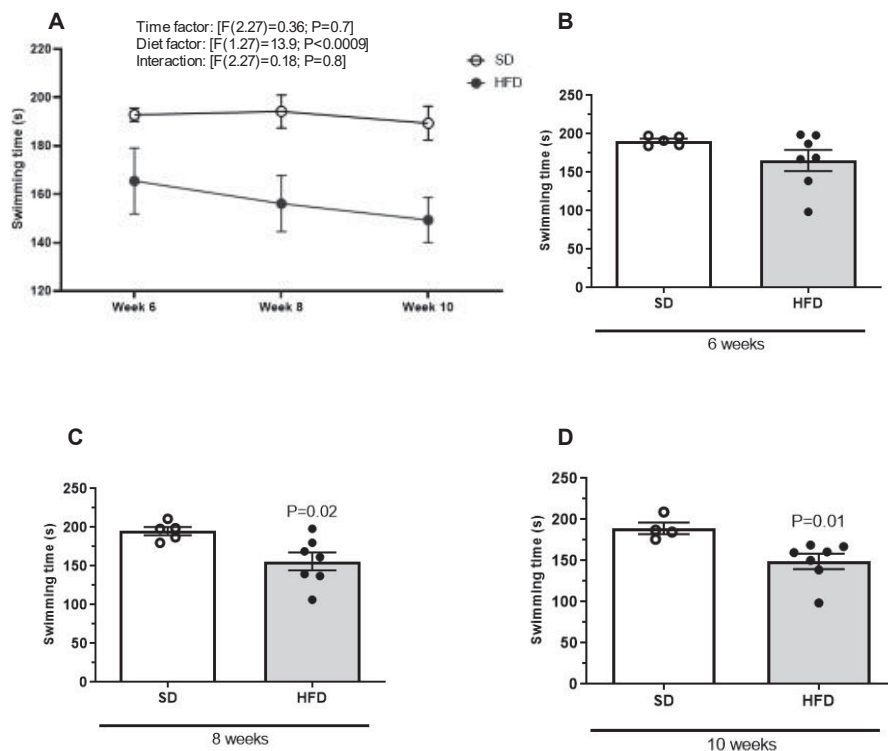


Figure 2. Swimming time over the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD), in weeks (A). Swimming time for each time-point is illustrated in (B) (6 weeks), (C) (8 weeks) and (D) (10 weeks). The data are expressed as mean \pm SEM ($n=6-8$ per group). For the swimming time along the weeks (A) we used the two-way ANOVA with followed by the Bonferroni's post hoc test. For the analysis of each time-point (B), (C) and (D) it was employed the unpaired t test. P values are respectively indicated.

Considering the other parameter obtained for this test, immobility time (figure 3), we performed the same comparison among the time-points. The results demonstrated both significant effects related to time [$F(2,34)=7.15$; $P=0.003$] and diet [$F(1,34)=6.93$; $P<0.013$], but, surprisingly, not for their interaction [$F(2,34)=0.28$; $P=0.7$]. The group comparisons for each time-point demonstrated a significant increase in the immobility time for the HFD group at 6 ($P=0.059$; figure 3B) and 10 ($P=0.04$; figure 3D) weeks.

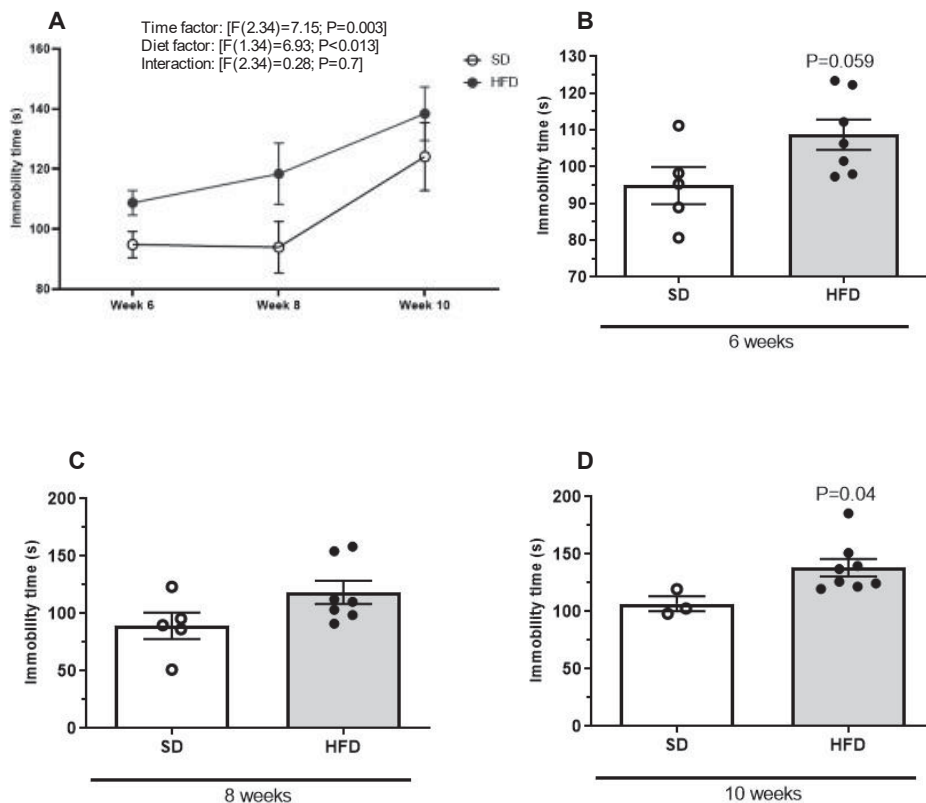


Figure 3. Immobility time over the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD), in weeks (A). Immobility time for each time-point is illustrated in (B) (6 weeks), (C) (8 weeks) and (D) (10 weeks). The data are expressed as mean \pm standard error of the mean ($n=6-8$ per group). For the immobility time along the weeks (A) we used the two-way ANOVA with followed by the Bonferroni's post hoc test. For the analysis of each time-point (B), (C) and (D) it was employed the unpaired t test. P values are respectively indicated.

Open-field test

The data from this test indicated the absence of significant changes in the locomotion (figure 4) distance of the groups along the different time-points tested, as shown by the time [$F(2.33)=3.9$; $P=0.03$], diet [$F(1.33)=0.17$; $P=0.7$] and interaction [$F(2.33)=0.01$; $P=0.9$]. In order to keep the homogeneity of the statistical testing we decided to compare each time-point, even with the absence of significance described for the factors (figures 1B, C and D).

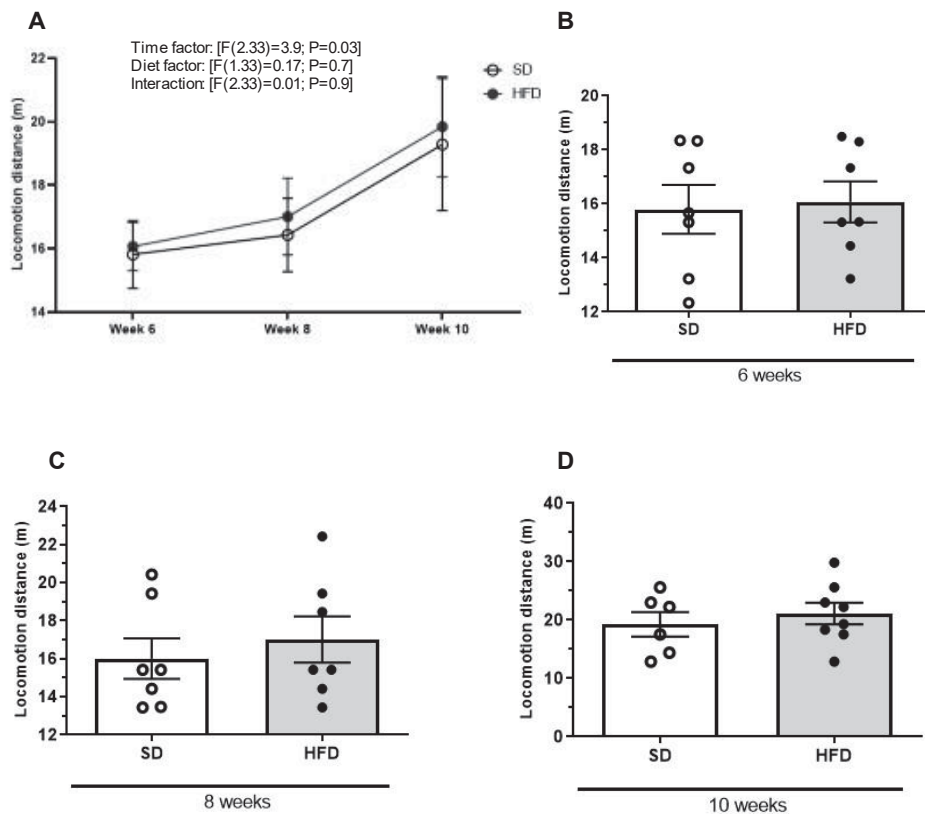


Figure 4. Locomotion distance over the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD), in weeks (A). Immobility time for each time-point is illustrated in (B) (6 weeks), (C) (8 weeks) and (D) (10 weeks). The data are expressed as mean \pm standard error of the mean ($n=6-8$ per group). For the immobility time along the weeks (A) we used the two-way ANOVA with followed by the Bonferroni's post hoc test. For the analysis of each time-point (B), (C) and (D) it was employed the unpaired t test. P values are respectively indicated.

Biochemical analysis

Table 2 shows a detailed panel of metabolic changes inflicted by HFD compared to SD. The first biochemical parameter investigated was cholesterol plasmatic concentration which showed a consistent significant increase in the HFD group for all the time-points: 6 ($P=0.0005$), 8 ($P=0.01$) and 10 ($P=0.002$) weeks, as indicated by the diet [$F(1.32)=15.2$; $P=0.0005$], time [$F(2.32)=2.2$; $P=0.13$] and interaction [$F(2.32)=2.7$; $P=0.08$] factors. Considering the analysis of the triglycerides concentrations we found a similar increase induced by HFD at the 6 weeks ($P=0.003$) time-point. Despite that result, we observed a borderline significance increase in this parameter at 8 weeks ($P=0.06$), which disappeared at the last time-point (10 weeks) as demonstrated by the diet [$F(1.32)=13.73$; $P=0.0008$], time [$F(2.32)=0.9$; $P=0.4$] and interaction [$F(2.32)=2.7$; $P=0.08$] factors.

Complementarily, the analysis of the HDL cholesterol levels revealed significant diet [$F(1.32)=8.1$; $P=0.008$] and time [$F(2.32)=4.7$; $P=0.02$] effects, however, without an interaction [$F(2.32)=0.1$; $P=0.9$] between them. Despite the occurrence of a significant effect attributable to the HFD, the individual comparisons of each time-point showed no apparent changes between the diets among the time-points, with just a borderline significance ($P=0.06$) of a decrease of its levels for the HFD group. Also, the evaluation of the plasmatic LDL cholesterol indicated a similar result for the analysis of the effects, that is, significant results for diet [$F(1.32)=8.4$; $P=0.007$] and time [$F(2.32)=5.1$; $P=0.01$] effects, without an interaction [$F(2.32)=0.4$; $P=0.7$] between factors. The evaluation of each time-point showed a significant increase of LDL levels for the HFD group only at the 6 weeks time-point exposure ($P=0.005$).

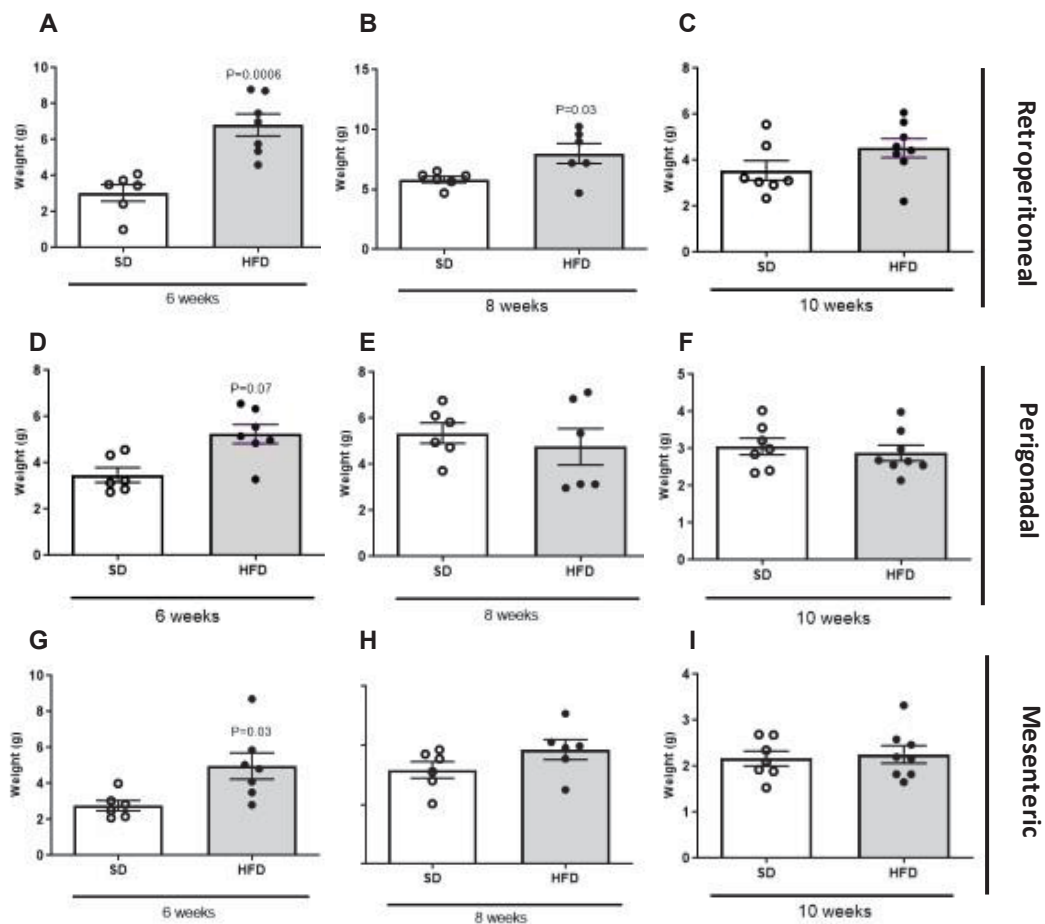
TABLE 2 – METABOLIC CHANGES, IN THE PLASMA, INDUCED BY HFD EXPOSURE COMPARED TO SD OVER THE WEEKS

	Weeks	SD (Mean±SEM)	HFD (Mean±SEM)	P value
Cholesterol (mg/dl)	6	46.4±1.5	60.8±2.4	0.0005*
	8	52.1±4.3	68.3±3.6	0.01*
	10	53.5±8.741	55.3±10.71	0.002*
Triglycerides (mg/dl)	6	53.1±5.6	97.8±9.4	0.003*
	8	62.9±5.2	91±12.1	0.06 [#]
	10	63.5±6.3	69.1±9.7	0.7
HDL (mg/dl)	6	29.6±3.4	21.9±2.7	0.1
	8	36.1±4.8	26.0±1.8	0.06 [#]
	10	23,19±8.3	12,25±3.2	0.22
LDL (mg/dl)	6	2.5±0.3	25.3±5.9	0.005*
	8	4.2±1.5	15.1±5.9	0.1
	10	22.7±8.6	43±14.7	0.3

* Indicates statistical significance and [#] depicts P thresholds of 6%. The data are expressed as mean ± SEM (n=6-8 per group).

Adipose tissue weights

The accumulation of adiposity within the retroperitoneal, perigonadal and mesenteric tissues might be a good marker for the metabolic repercussions of the HFD among different systems (supplementary figure 1). In fact, we observed a significant increment in the weight of retroperitoneal tissue of HFD group at 6 ($P=0.0006$) and 8 ($P=0.03$) weeks, but not at 10 weeks. Regarding the data for the perigonadal tissue, we could be able to identify a significant increase of the adiposity induced by HFD only at 6 weeks ($P=0.07$). Similarly, for the mesenteric tissue, we detected an increase in adiposity induced by HFD only at 6 weeks time-point ($P=0.03$).



Supplementary Figure 1. Changes in the retroperitoneal, perigonadal and mesenteric adipose tissue weights during the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD), in weeks. (A) Retroperitoneal tissue (6 weeks), (B) Retroperitoneal tissue (8 weeks), (C) Retroperitoneal tissue (10 weeks), (D) Perigonadal tissue (6 weeks), (E) Perigonadal tissue (8 weeks), (F) Perigonadal tissue (10 weeks), (G) Mesenteric tissue (6 weeks), (H) Mesenteric tissue (8 weeks), (I) Mesenteric tissue (10 weeks).

weeks), (D) Perigonadal tissue (6 weeks), (E) Perigonadal tissue (8 weeks), (F) Perigonadal tissue (10 weeks), (G) Mesenteric tissue (6 weeks), (H) Mesenteric tissue (8 weeks), (I) Mesenteric tissue (10 weeks). The data are expressed as mean \pm standard error of the mean (n=6-8 per group). Unpaired t test **P \leq 0.01.

DISCUSSION

In the present study, we aimed to characterize systematically the biochemical and behavioral changes that are associated after 6, 8 and 10 weeks of HFD exposure in Wistar rats. Traditionally, this diet consists of increased fat-derived calories when compared to low fat or chow control diets. Fat-enriched diets are well-established models of overweight, obesity, dyslipidemia and insulin tolerance in rodents (BASTÍAS-PÉREZ; SERRA; HERRERO, 2020). In light of the above data, the weight gain of the HFD groups were lower, compared to the SD, starting at the third week and continuing until the end of the HFD exposure (week 10).

Despite that somewhat surprising result, HFD even with a fat content around 60% of fat, while their appropriate controls contained about 10–12% kcal derived from fat did not have an obesogenic effect in the animals as previously reported (HALLEEM; MAHMOOD, 2019; PARK *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2020). According to the analysis of the diets employed, we observed that HFD was dramatically enriched in terms of fat and calories (57.3% increase) however, with reduced percentages of proteins, fibers and minerals. In fact, the poor availability of proteins in the HFD could explain the lower weight gain for this group due to the anabolic role of proteins (DEUTZ; WOLFE, 2013).

Also, the housed animals may be less adapted to HFD, perhaps due to differences in palatability compared to SD. Several diets with very different fatty acid compositions are summarized under the term 'high-fat diet' (BASTÍAS-PÉREZ; SERRA; HERRERO, 2020). However, according previous studies there is a discrepancy between the effects observed that can be explained by factors such as: age, sex (SAQUI-SALCES *et al.*, 2017), different periods of diet consumption, different types of ingredients used in its preparation and different treatments offered to the animals. What is still observed in the studies is a lack of standardization of the percentage of fat as well as of which types of fat are present in each diet (BASTÍAS-PÉREZ; SERRA; HERRERO, 2020; BROWN; PANCHAL, 2011). In addition,

environmental and housing conditions of the animals, such as time in the light-dark cycles, availability of food on the floor of the cage, and higher temperature, could contribute to higher food consumption (BARTH; TSCHÖP; HEIMAN, 2001; ROSINI *et al.*, 2012).

The results from the forced swimming test, a well known method to assess signs of depressive-like behaviors (BOGDANOVA *et al.*, 2013) indicated a strong influence of HFD associated with a decrease in swim time, particularly at 8 and 10 weeks of HFD exposure. Notwithstanding, HFD also produced an increase in the immobility time, in particular at the 6 and 10 weeks of exposure. In fact, these combined results indicated a strong association of the HFD with the appearance of depressive-like behaviors.

Our data are in accordance with several other studies that have shown that highly caloric diets may increase the risk of depression (GANCHEVA; GALUNSKA; ZHELYAZKOVA-SAVOVA, 2017; TSAI *et al.*, 2022; VAGENA *et al.*, 2019). In Flinders Sensitive and Resistant Line (FSL/FRL) rats, a genetic model of depression, HFD exacerbated the depressive-like behavior. Although the pathophysiological mechanisms of depression are not completely understood, this disorder has also been associated with impaired neuroplasticity and hippocampal neurogenesis (ABILDGAARD *et al.*, 2011). Chronic exposure to HFD has an impact on adult synaptic plasticity on BDNF and TrkB levels (ARCEGO *et al.*, 2018). Rat models of diet-induced obesity are characterized by inflammation both in peripheral tissues (DUTHEIL *et al.*, 2016) and in the hypothalamus, a brain region that plays a role in energy homeostasis (CAVALIERE *et al.*, 2018). In addition, HFD exposure for 8 weeks (60% caloric intake from fat) alters gene expression profiles in the hypothalamus and PKA signaling pathway (VAGENA *et al.*, 2019). Besides, diet-induced obesity reduced the efficacy of the antidepressant drug (HERSEY *et al.*, 2021). However, other reports have noted positive or no changes in depression-like behavior following chronic consumption of HFD (ANDRÉ *et al.*, 2014; KARTH *et al.*, 2019; MANIAM; MORRIS, 2010), indicating some agreement with our results from individual time-points of 6 and 10 weeks exposure. Nevertheless, we have to state that we detected, for both depressive-like behaviors tested, a significant effect related to diet, itself, which means that HFD indubitably produced a worsening in these parameters.

Increased midbrain DA levels were found in adult C57BL/6J mice after 4-months of a high fat diet to compensate for the HFD-induced weight gain and

potentially rewarding effects of the HFD (HAN *et al.*, 2021; KOZUKA *et al.*, 2017). It has been shown that chronic low-grade systemic inflammation is a key component of metabolic syndrome. Obesity predisposes to a pro-inflammatory state via increased inflammatory mediators IL-6 and TNF- α , and reduced levels of adiponectin (ELLULU *et al.*, 2017). Current theories suggest that depression is associated with significant increased inflammatory response including increased levels of inflammatory cytokines (DOWLATI *et al.*, 2010; DUTHEIL *et al.*, 2016; ERION *et al.*, 2014; WAGER-SMITH; MARKOU, 2011).

Some studies have shown that cafeteria diets are more obesogenic than standard high-lipid diets with equivalent energy content (HIGA *et al.*, 2014; SAMPEY *et al.*, 2011). Obesity reflects an imbalance between energy gain and energy expenditure, characterized by abnormal accumulation of fat and overweight, increasing the number (hyperplasia) and size (hypertrophy) of adipocytes (DE FERRANTI, 2008; YOO, 2018). It is related to both genetic and environmental factors, with diet being the main environmental factor involved. The type of fat may play a crucial role in the development of metabolic changes (BASTÍAS-PÉREZ; SERRA; HERRERO, 2020). Saturated fatty acids and monounsaturated fatty induce the typical *high-fat-diet phenotype* (BUETTNER *et al.*, 2006), that can raise plasma total cholesterol concentration (GRUNDY; DENCKE, 1990) produce insulin resistance (AL-MUZAFAR *et al.*, 2021) and hepatic steatosis (ISHIMOTO *et al.*, 2013). It is generally believed that high intake of saturated fat is a major cause of the development of the metabolic syndrome (LASKER *et al.*, 2019; MORENO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2018). The profile of fatty acids in the diet, such as n-3 fatty acids, monounsaturated fats based diets is not fully understood. Adherence to a classical Mediterranean diet has recently been associated with beneficial effects in metabolic parameters (ESPOSITO *et al.*, 2004). However, their role in human diet therapy is still unclear.

On the other hand, in our study, body weight was not correlated with the amount of adipose tissues. In agreement with other studies, HFD rats had greater accumulation of visceral fat (RAMALHO *et al.*, 2017). Interestingly, 10-week HFD showed no increase in adipose sites but the adiposity index differed from the control. The body lipid increase in the HFD group is related to an increase in energy efficiency which may be partially due to the cost of lipid deposition, that in this condition is lower than carbohydrates and proteins (CAVALIERE *et al.*, 2018). Interestingly, among the 3 time exposures, 10 weeks exposure showed smaller changes in both lipid content

and fat weight. That is, there was no cumulative effect related to the time of exposure to HFD, as verified in different studies in longer times of administration of the hypercaloric diet, ranging from 10 to 24 weeks (ROBERTSON; BOOMHOWER; RASMUSSEN, 2017). Thus, body weight *per se* may not be a good predictor of metabolic change.

From a biochemical standpoint, HFD led to typical changes in the lipid profile already indicated in other studies (RAPORT *et al.*, 2018; LASKER *et al.*, 2019), such as an increase in total cholesterol and LDL fraction (HIGA *et al.*, 2014). Increases in triglyceride concentrations were seen only in the 6 weeks exposure. These changes can already be visible in a few weeks of feeding, as previously reported (MAGRITOMAZ *et al.*, 2018). Hypercaloric diet fed rats had also high fat intake, and it is well known that excessive fat was related to dyslipidemic profile. Some clinical reports indicate, that depression might be related to higher blood cholesterol levels (LEDOCHOWSKI *et al.*, 2003). Conversely, other studies have found an association between lower total cholesterol and depression (LEHTO *et al.*, 2010; ONG *et al.*, 2016; SEGOVIANO-MENDOZA *et al.*, 2018). These controversial findings indicate a relationship between metabolic imbalances and depression, but the kind of relation still needs to be evaluated.

Regarding the time of induction of hypercholesterolemia, a recent integrative review found that, in more than 30 studies analyzed, the time ranged from 1 week to 90 days. Of these, 5 studies used 8-week exposure, with 7 days being the shortest time of exposure to the diet (CUNHA *et al.*, 2021). A short-term exposure to a high fat diet (2 weeks) led to an increase in hepatic fat content and elevated plasma cholesterol levels, altering the expression of HMGCR, ABCG5 and LRP-1, key markers of cholesterol uptake (MAGRITOMAZ *et al.*, 2018). Recent studies have explored the effects of maternal exposure to HFD that can be felt in the increase in body weight and adiposity of the offspring (WALKER *et al.*, 2008).

All animals in the HFD groups showed a significant increase in the LDL-C fraction. LDL is a lipoprotein that delivers cholesterol that circulates in the blood from the liver to the tissues, lipoprotein is closely related to increased cardiovascular risk, which showed that the increase in dietary fat is one of the well-known factors that increases the risk of atherogenesis (NELSON, 2013). Furthermore, overexposure to dietary fat has a strong association with elevated LDL-C content (WOLSKA; REMALEY, 2020). In contrast, High-Density Lipoproteins (HDL-C) is inversely related

to cardiovascular outcomes (MUSUNURU, 2010). HDL is involved in reverse cholesterol transport, carried from cells to the liver, and has been traditionally considered the “good cholesterol” (VITALI; WELLINGTON; CALABRESI, 2014). Animal studies have shown that hiperlipidic diets remarkably decreased HDL-C (CUSTERS *et al.*, 2022).

In summary, the present data indicated that HFD, as performed by our study, can be considered a possible model for dyslipidemia due to its efficiency in producing the biological characteristics of dyslipidemias such as changes in plasma lipid levels without presenting an obesogenic effect. Complementarily, this HFD was able consistently to produce depressive-like behaviors, particularly at 8 weeks of exposure.

REFERENCES

- AASETH, J. *et al.* Diets and drugs for weight loss and health in obesity – An update. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, n.140, 2021.
- ABILDGAARD, A. *et al.* A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 5, p. 623–633, jun. 2011.
- ALBUQUERQUE, D. *et al.* *The contribution of genetics and environment to obesity.* **British Medical Bulletin**, v.123, p. 159-173, 1 set. 2017.
- ANDRÉ, C. *et al.* Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: Focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 41, n. 1, p. 10–21, 2014.
- ARCEGO, D. M. *et al.* Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 4, p. 2740–2753, 1 abr. 2018.
- ASLANI, S. *et al.* The effect of high-fat diet on rat’s mood, feeding behavior and response to stress. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 11, 24 set. 2015.
- BARTH, J. A.; TSCHÖP, M.; HEIMAN, M. L. Endocrinology & Diabetes Rodent obesity models: An overview. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v.109, n.6, p. 307-319.
- BASTÍAS-PÉREZ, M.; SERRA, D.; HERRERO, L. Dietary options for rodents in the study of obesity. **Nutrients**, v.12, n.11, p. 3234, 2020.
- BERBERICH, A. J.; HEGELE, R. A. A Modern Approach to Dyslipidemia. **Endocrine Reviews**, v. 43, n. 4, p. 611–653, 1 ago. 2022.
- BOLDARINE, V. T. *et al.* High-fat diet intake induces depressive-like behavior in ovariectomized rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

BROWN, L.; PANCHAL, S. K. *Rodent models for metabolic syndrome research*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011.

BUETTNER, R. *et al.* Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, n. 3, p. 485–501, jun. 2006.

CABALLERO, B. Humans against Obesity: Who Will Win? **Adv Nutr**, v.1, n. 10:S4–S9, jan. 2019.

CAVALIERE, G. *et al.* Long feeding high-fat diet induces hypothalamic oxidative stress and inflammation, and prolonged hypothalamic AMPK activation in rat animal model. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 6 jul. 2018.

CHEW, N. W. S. *et al.* The global burden of metabolic disease: Data from 2000 to 2019. **Cell metabolism**, v. 35, n. 3, p. 414–428.e3, 7 mar. 2023. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36889281>>.

CUNHA, L. F. *et al.* Modelling hypercholesterolaemia in rats using high cholesterol diet. **International Journal of Experimental Pathology**, v.102, n.2, p. 74-79.

CUSTERS *et al.* Dietary lipids from body to brain. **Progress in Lipid Research**. v.85, 2022.

DEUTZ, N. E.; WOLFE, R. R. Is there a maximal anabolic response to protein intake with a meal? **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 309–313, abr. 2013.

DOWLATI, Y. *et al.* A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446–457, 1 mar. 2010.

DUTHEIL, S. *et al.* High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 7, p. 1874–1887, 1 jun. 2016.

ELLULU, M. S. *et al.* Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. **Archives of Medical Science**, v. 13, n. 4, p. 851–863, 2017.

ENGEL, D.F. *et al.* Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr^{-/-} mouse experimental model. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p.31-38, 2016.

ERION, J. R. *et al.* Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 7, p. 2618–2631, 2014.

GANCHEVA, S.; GALUNSKA, B.; ZHELYAZKOVA-SAVOVA, M. Diets rich in saturated fat and fructose induce anxiety and depression-like behaviours in the rat: is there a role for lipid peroxidation? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 5, p. 296–306, 1 out. 2017.

GAWLINSKA, K. *et al.* Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation provokes depressive-like behavior and influences the irisin/brain-derived neurotrophic factor axis and inflammatory factors in male and female offspring in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 407–411, 1 jun. 2019.

HAN, A. L. Association between lipid ratio and depression: a cross-sectional study. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

- HAN, J. *et al.* High-Fat Diet-Induced Weight Gain, Behavioral Deficits, and Dopamine Changes in Young C57BL/6J Mice. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, 20 jan. 2021.
- HASSAN, A. M. *et al.* High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated with changes in microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome. **Nutritional Neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 877–893, 2 dez. 2019.
- HERSEY, M. *et al.* High-fat diet induces neuroinflammation and reduces the serotonergic response to escitalopram in the hippocampus of obese rats. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 96, p. 63–72, 1 ago. 2021.
- HIGA, T. S. *et al.* Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 47-54, 2014.
- ISHIMOTO, T. *et al.* High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. **Hepatology**, v. 58, n. 5, p. 1632–1643, nov. 2013.
- KARTH, M. M. *et al.* Brain 5-HT Deficiency Prevents Antidepressant-Like Effects of High-Fat-Diet and Blocks High-Fat-Diet-Induced GSK3 β Phosphorylation in the Hippocampus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, 11 dez. 2019.
- KOZUKA, C. *et al.* Impact of brown rice-specific γ -oryzanol on epigenetic modulation of dopamine D2 receptors in brain striatum in high-fat-diet-induced obesity in mice. **Diabetologia**, v. 60, n. 8, p. 1502–1511, 1 ago. 2017.
- LASKER, S. *et al.* High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- LEDOCHOWSKI, M. *et al.* Association between Increased Serum Cholesterol and Signs of Depressive Mood. **Clin Chem Lab Med**, v. 41, n.6, p. 821–824, 2003.
- LEHTO, S. M. *et al.* Low serum HDL-cholesterol levels are associated with long symptom duration in patients with major depressive disorder. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 64, n. 3, p. 279–283, 2010.
- LI, Y. *et al.* Dietary patterns and depression risk: A meta-analysis. **Psychiatry Research**, v.253, p. 373-382, 1 jul. 2017.
- LIU, T. *et al.* A meta-analysis of oxidative stress markers in depression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 7 out. 2015.
- LUDKA, F. K. *et al.* Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 122, p. 253–260, 2014.
- LUPPINO, F. S.; DE WIT, L. M.; BOUVY, P. F. *et al.* Overweight, Obesity, and Depression: A Systematic Review and Meta-analysis of Longitudinal Studies. **Arch Gen Psychiatry**, v. 67, n.3, p. 220–229, 2010.
- MAGRI-TOMAZ, L. *et al.* Two weeks of high-fat feeding disturb lipid and cholesterol molecular markers. **Cell Biochemistry and Function**, v. 36, n. 7, p. 387–393, 1 out. 2018.

- MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Voluntary exercise and palatable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: Role of hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 10, p. 1553–1564, nov. 2010.
- MORENO-FERNÁNDEZ, S. *et al.* High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. **Nutrients**, v. 10, n. 10, 14 out. 2018.
- MUSUNURU, K. Atherogenic dyslipidemia: Cardiovascular risk and dietary intervention. **Lipids**, v.45, p. 907–914, 2010.
- NELSON, R. H. Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. **Primary Care - Clinics in Office Practice**. v.40, n.1, p. 195–211, mar. 2013.
- O'NEILL, S.; O'DRISCOLL, L. Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. **Obesity Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 2015.
- ONG, K. L. *et al.* Lipids, lipoprotein distribution and depressive symptoms: The multi-ethnic study of atherosclerosis. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 11, 2016.
- PAREKH, A. *et al.* The role of lipid biomarkers in major depression. **Healthcare (Switzerland)**, v.5, n.1, 1 mar. 2017.
- PIRILLO, A. *et al.* Global epidemiology of dyslipidaemias. **Nature Reviews Cardiology**, v.18, n.10, p. 689-700, 2021.
- RAMALHO, L. *et al.* Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulin-resistant animal model. **Nutrition and Diabetes**, v. 7, n. 3, 13 mar. 2017.
- RÉNÉRIC, J.-P.; BOUVARD, M.; STINUS, L. In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. **Behav. Brain Res.** v.136, n.2, p.521-532.
- ROBERTSON, S. H.; BOOMHOWER, S. R.; RASMUSSEN, E. B. High-fat diet alters weight, caloric intake, and haloperidol sensitivity in the context of effort-based responding. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 323–333, 7 fev. 2017.
- ROSINI, T.C. *et al.* Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Rev Assoc Med Bras**, v. 58, n.3, p. 383-387, 2012.
- SAMPEY, B. P. *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. **Obesity**, v. 19, n. 6, p. 1109–1117, jun. 2011.
- SEGOVIANO-MENDOZA, M. *et al.* Hypocholesterolemia is an independent risk factor for depression disorder and suicide attempt in Northern Mexican population. **BMC Psychiatry**, v. 18, n. 1, 15 jan. 2018.
- STANAWAY, J. D. *et al.* Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global

Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1923-1994, nov. 2018.

TSAI, S. F. *et al.* High-fat diet induces depression-like phenotype via astrocyte-mediated hyperactivation of ventral hippocampal glutamatergic afferents to the nucleus accumbens. **Molecular Psychiatry**, v. 27, n. 11, p. 4372–4384, 2022.

VAGENA, E. *et al.* A high-fat diet promotes depression-like behavior in mice by suppressing hypothalamic PKA signaling. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

VITALI, C.; WELLINGTON, C. L.; CALABRESI, L. HDL and cholesterol handling in the brain. **Cardiovascular Research**, v.103, n.3, p. 405-413, 1 ago. 2014.

WAGER-SMITH, K.; MARKOU, A. Depression: A repair response to stress-induced neuronal microdamage that can grade into a chronic neuroinflammatory condition? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.35, n.3, p. 742-64,2011.

WALKER, C. D. *et al.* Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: A potential role for leptin. **Ann N Y Acad Sci.**, p. 189–202, 2008.

WOLSKA, A.; REMALEY, A. T. Measuring LDL-cholesterol: what is the best way to do it? **Current opinion in cardiology**, v.35, n.4, p. 405-411, 2020.

ZEMDEGS, J. *et al.* Themed Section: Updating Neuropathology and Neuropharmacology of Monoaminergic Systems High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n.13, p. 2095-2110, 2016.

CAPÍTULO 3

High-fat diet induces dyslipidemia and exacerbates depressive-like behavior in the rotenone model of parkinson's disease

Ana Paula Chuproski¹, Evellyn Mayla Azevedo¹, Jéssica Ilkiw¹, Jéssica Miloch¹,
Maria Eugênia Balbi³ and Marcelo M. S. Lima^{1,2}

¹Neurophysiology Laboratory, Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

²Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

³Bromatology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

ABSTRACT

The identification of metabolic risk factors is highly relevant to the development of preventive strategies for neurodegenerative disorders including Parkinson's disease (PD). Present study aimed to evaluate the behavioural, biochemical and histological effects of High fat diet (HFD) in rotenone-induced rat model PD. Male Wistar rats fed either a standard diet (containing around 10% calories from fat) or a HFD (containing 45% of calories from fat) for 6 weeks. Nutritional and physiological measures such as food consumption, body weight and caloric intake were evaluated. At the end of the treatment, behavioral activities were monitored for motor activity and depressive-like behavior. Rats were decapitated after behavioral tests and the blood and brain samples were collected for biochemical and immunohistochemical analysis, respectively. Results showed that body weight was significantly lower in the HFD-exposed group compared to the control-group and higher caloric intake. High fat diet

reproduced dyslipidemic phenotype. HFD group exhibited a significant increase in motor activity in the open field test after 12th lesion. In addition, intranigral injury promoted depressive-like behavior both time points evaluated. The hippocampal BDNF levels were reduced in lesioned rats and ApoE was increased in the substantia nigra in TP1 in response to injury. These findings show that and ApoE can be a potential biomarker to assess the risk and progression of PD, specifically in early stages of PD.

Key words: Parkinson's disease; Rotenone; High-fat diet (HFD); depression, ApoE.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) was first described by James Parkinson in 1817 and currently it is the second most common neurodegenerative disease affecting about 1% of the population over 65 years old and 4-5% of people over 85 years (PRINGSHEIM *et al.*, 2014). The main neuropathological hallmark of PD is the progressive dopaminergic degeneration in the substantia nigra pars compacta (SNpc) disrupting nigrostriatal pathway (HUSTAD; AASLY, 2020). In addition, intraneuronal protein aggregates of alpha-synuclein called Lewy Bodies which are found in surviving neurons of the SN and other brain regions (BRAAK *et al.*, 2003; JAN *et al.*, 2021; POEWE *et al.*, 2017).

Besides, PD patients usually display non-motor features of the disease, like olfactory and gastrointestinal dysfunction, sleep disorders, cognitive impairment and affective disorders, as anxiety, depression and apathy can occur at any stage but mostly they precede the diagnosis of PD, sometimes by several years (DOTY, 2012; SCHAPIRA, 2017). In this sense, neuropsychiatric symptoms, like depression and anxiety, severely affect the quality of patient's life, perhaps even more than motor symptoms. Depression, particularly, is reported in 20-90% (depending on the study) of patients and it is seen in all stages of severity of PD (AARSLAND, 2011; REICHMANN; SCHNEIDER; LÖHLE, 2009; REIJNDERS *et al.*, 2008).

PD pathogenesis is a complex and multifactorial process, both genetic and environmental factors may converge and synergically modify the risk for PD development. Among these, modifiable nutritional risk factors, like diet, nutrients and metabolic molecules, have been highlighted in developing preventive strategies. The brain is one of the richest in lipid content among all the body tissues (FARROOCHI *et al.*, 2000). Cholesterol is essential for neuronal physiology, making structural component for cellular membranes, synapses and myelin sheath, which fundamental for normal brain functions, like neuroplasticity, neuronal growth and synaptogenesis (MAHLEY, 2016; ZHANG; LIU, 2015). In fact, cholesterol dysfunction in the Central Nervous System could be associated with aging and the development of certain neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease and Multiple Sclerosis (PFRIEGER, 2021).

The relationship between high cholesterol levels and PD is, however, controversial as elevated serum levels of cholesterol were related to either an increase (HU *et al.*, 2008; HU, 2010) or a decrease of the risk of PD (POWERS *et al.*, 2008) or not to be associated with PD. Cholesterol and/or its oxidized metabolites (oxysterols) have been suggested to be putative endogenous contributors towards the appearance of Parkinsonian pathologies (PAUL; CHOUDHURY, BORAH, 2015). Population studies have shown a link between metabolic parameters and incidence of PD. Some studies reported that statins, drugs able in lowering blood lipid levels can reduce PD risk or even their progression (ROY; PAHAN, 2011; WOLOZIN *et al.*, 2007). However, other studies raised some questions regarding such effects, alleging that they were much more modest (GAO *et al.*, 2012) or even no beneficial effects were observed (HUANG; MAHLEY, 2014; ROZANI *et al.*, 2017) .

Cholesterol is secreted from astrocytes in lipoproteins, the main component of which is apolipoprotein E (ApoE) (GIAU *et al.*, 2015; TAKEDA *et al.*, 2010). The ApoE genotype is the strongest genetic risk factor for late-onset Alzheimer's disease (DIBATTISTA; HEINSINGER; REBECK, 2016). Clinical studies suggest that APOE ϵ 4 allele is related to the worsening cognitive outcomes in PD (SCHRAG *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2021; TROPEA *et al.*, 2018). In A53T mice, APOE ϵ 4 genotype exhibited higher amounts of insoluble phosphorylated α Syn whilst APOE ϵ 2 may protect against α Syn aggregation (DAVIS *et al.*, 2020).

High fat diet (HFD) has been used to induce obesity and metabolic disorders in rodents, like metabolic syndrome and diabetes type 2 (BUETTNER *et al.*, 2006).

Remarkably, neurodegeneration in a rat model of PD is exacerbated by HFD exposure (BOUSQUET *et al.*, 2012). Furthermore, HFD has been shown to impair dopaminergic pathways, regulating the food eating reward circuit, motor activity, and emotion (CONDE-ROJAS *et al.*, 2020). Besides, mice fed with a HFD show motor deficits and anxiety-like behaviors exhibiting increased midbrain dopamine and D2 receptor protein levels (HAN *et al.*, 2021).

Recently, there is a growing interest in exploring novel lipid biomarkers for PD, like targets for investigating the presence or progression of PD and if they are involved in pathological mechanisms, clinical course of the disease or worsening clinical outcomes (HUANG *et al.*, 2019).

Furthermore, the link between lipoproteins and early-stage non-motor symptoms still is unclear. Here, we evaluated the possible deleterious effects inflicted by a dyslipidemia induced-model (through a HFD), on depressive like behaviors and in the metabolic profile in the intranigral rotenone model of PD.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male Wistar rats were around 30 days old weighing 200 g at the beginning of the experiments. The animals were randomly housed in groups of four in polypropylene cages with wood shavings as bedding and they were housed under standard laboratory conditions when maintained in a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) on a 12:12-h light-dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). All procedures with animals were conducted according to guidelines of ethics and experimental care and use of laboratory animals (SBCAL) and were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Paraná (approval ID #1216).

Experimental design

The animals were distributed randomly in four groups according to their diets (standard diet - SD, or HFD) and SNpc lesion induced by rotenone, as follows: SHAM/SD (n= 15); SHAM/HFD (n= 15); Rotenone/SD (n= 15) and Rotenone/HFD (n= 15). All the SD groups were fed with standard chow (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes

S/A, Colombo, Paraná, Brazil). The HFD groups were fed high fat diet for 6 weeks. The HFD was prepared in our laboratory by mixing from hiperlipidic and hypercaloric mixture adapted from the protocol used by ESTADELLA et al., 2004 and ARCEGO et al., 2018. The diet is composed of Nuvilab® crushed commercial feed, lard, roasted peanuts and milk chocolate in a 3:2:2:1 ratio, respectively. The comparison of nutritional components of the diets is presented in Table 3:

TABLE 3 – NUTRITIONAL COMPOSITION OF STANDARD DIET (SD) VERSUS HIGH FAT DIET (HFD)

Nutrients % per 100 g		
	SD	HFD
Total fat	4.52± 0.02	34.6±0.2
Carbohydrates	46.8	34.4
Proteins	23.9± 0.2	10.3±0.2
Fibers	17.0±0.8	11.8±1.3
Minerals	6.1±0.2	3.0±0.2
Kcal	323.4 Kcal	508.7 Kcal

Table 1. Nutritional composition of Standard diet (SD) versus High fat diet (HFD). Results are expressed as mean±standard deviation.

All the rats fed their respective diets *ad libitum* and they were weighed weekly. The food intake of the animals was measured three times a week over the course of the experiment. The behavioral tests for motor activity and depressive-like behavior, were measured at the time points shown in Figure 1.

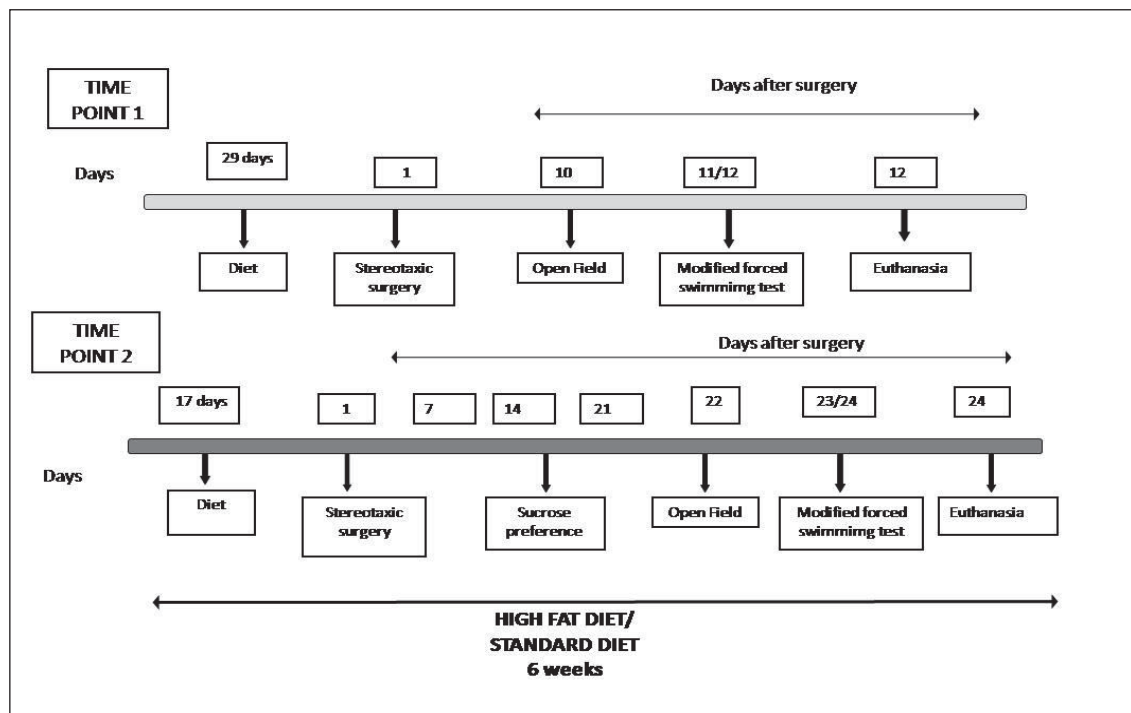


Figure 1. Experimental design. Rats were distributed into four groups with different diets, immediately after weaning until 6 weeks. Behavioral tests were performed, in the order shown, immediately after the HFD protocol (6 weeks). All the tests were performed in the light phase. Blood and tissues were collected after the last behavioral test performed.

Stereotaxic surgery

The animals were initially sedated with intraperitoneal xylazine (10 mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Brazil) and anesthetized with ketamine (90 mg/kg, i.p.; Syntec do Brasil Ltda, Brazil). Animals were infused with 3 U μ g rotenone (3 U μ g/UL) into the substantia nigra pars compacta (stereotaxic coordinates with respect to bregma: M/L 2.1, A/P 5.0, and D/V 8.0). The infusion rate was 0,33 UL/min over a period of 3 min. The cannula was withdrawn 1 min after infusion was completed.

Open Field test (OFT)

The open field test apparatus consisted of a circular arena (1 m diameter) limited by a 40 cm high wall. The animals were gently placed in the center of the arena and were allowed to freely explore the area for 5 min. The open-field was cleaned with

a 10% water-ethanol solution before behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by the previous rat. The number of crosses was manually counted.

Modified forced swimming test (MFST)

Depression-like behavior was determined by assessing the animal's learned helplessness behavior by the MFST (PORSOLT *et al.*, 1977). Two swimming sessions were carried out; one exposure for 15 min on the first day (day 1), followed 24 h later by a 5-min exposure (day 2). The animals were placed individually in Plexiglas cylinders (height of 40 cm, diameter of 18 cm) filled with water at 25 ± 1 °C. After each swimming session, the rats were towel dried and returned to their home cages. during which time spent on three behaviors were recorded: immobility, swimming and climbing. Immobility time (defined as the time to keep the rat's head above the water. Swimming was measured only when the rat showed active swimming movements, e.g., moving around in the cylinder. Specifically, increased immobility (floating) during forced swimming has been suggested as an index of depressive-like behavior in rodents. The water was changed between each trial to avoid influence on the next test.

Sucrose preference test

This test aims to measure anhedonia in rodents (WANG, 2009). The animals were transferred to single-housing cages with free access to food. Each rat had access to two bottles of water during the 24 h habituation phase in order to adapt to the ingestion of the liquids from the two bottles. On the second day, the water in one of the bottles was replaced by a 1% sucrose solution as described previously. 24 h later the bottles were inverted from their initial position in order to avoid the effect of a possible side perseverance of the animal. The consumption of water and sucrose solution was estimated by the difference of the initial and final weights of each bottle in relation to the total consumption of liquids. Sucrose preference was calculated by the following formula: % sucrose preference = sucrose intake/ total intake x 100.

Biochemical blood analysis

At the end of the behavioral tests, the rats were quickly decapitated followed by total blood sample collection from the carcasses. About 7 ml of blood was collected, for each animal, in tubes containing sodium heparin to prevent clotting. The separation of plasma was achieved by centrifugation at 3000 x g 4° for 15 min. Afterwards, 2 ml of plasma was pipetted and transferred to identified plastic tubes and stored at -80° C until analysis. Quantification of lipid profile and glucose from the plasma was obtained with the use of commercial kits (Labtest®, Brazil) using spectrophotometric methods. Results were expressed as mg per milliliter (mg/mL) of plasma.

Adipose tissues

After blood collection, retroperitoneal, perigonadal and mesenteric fats were collected and weighed. Adiposity index is widely used in obesity studies to determine body fat in rodents. It is calculated as the sum of white adipose tissues the mesenteric, perigonadal and retroperitoneal fat depots' weights divided by the total body weight (g) 100 and it is expressed as a percentage of adiposity (JEYAKUMAR *et al.*, 2009).

Immunohistochemistry

For the immunohistochemical study of the SNpc TH containing neurons, rats were deeply sedated with intraperitoneal xylazine (10 mg/kg) and anesthetized with intraperitoneal ketamine (90 mg/kg). Then, each animal was transcardially perfused with saline first, then with 4% of the fixative solution formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were removed from the skulls and were immersed for 48 h in that fixative solution at 4° C. Subsequently, the brains were placed in 30% sucrose solution for 3 days at -80 freezer before sectioning. Six 40 mm sections per animal were taken from the SNpc (- 4.92 to - 5.28 mm) (PAXINOS; WATSON, 2005) were collected from 5 animals of each group. Initially, the sections were incubated (30 min) in 0.1 M phosphate saline buffer (pH 7.4) and subsequently were submitted to endogenous peroxidase inhibition by incubation with 0.3% H₂O₂ in 0.1 M phosphate saline buffer (pH 7.4) for 10 min. After that, the sections were blocked in 10% 0.1 M normal goat serum in phosphate saline buffer (pH 7.4) Tissue sections were incubated

with primary mouse anti-TH antibody (1:500; Chemicon, Rolling Meadows, IL, USA) diluted in 0.1 M phosphate-buffered saline containing 0.3% Triton X-100 overnight at 4°C. Biotin-conjugated secondary antibody (1:200 anti-mouse; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), was localized using the ABC system (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), followed by 3,30-diaminobenzidine reaction with nickel enhancement. The sections were then mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped after dehydration in ascending concentrations of ethanol-xylene solutions. Neuronal density determination was conducted using the software Image J (National Institutes of Health, Rockville, MD, USA). For each group, a mean value was calculated and converted to a percentage relative to the sham control group and compared with the other groups. The images were obtained using a motorized Axio Imager Z2 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), equipped with an automated scanning VSlide (Metasystems, Altlußheim, Germany).

Western Blot Analysis

Tissue brains were lysed in a buffer supplemented with cocktail inhibitors protease (Sigma, St. Louis, MO). Homogenates were centrifuged at 12000 x g at 4°C for 30 min. The supernatant was taken and aliquoted in microtubes and stored at -80°C for further protein analysis. Protein concentrations for each sample were determined using the Bradford assay. Samples (20 mg of total protein/track) were separated by 10-12-15% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes in an ice cold buffer containing 25 mM Tris-Base, 192 mM glycine and 20% methanol. Membranes were blocked with 5% fat free milk in TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5), followed by three times washing with TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) for 1 h at room temperature (RT) and kept with primary antibodies overnight at 4 °C. The following primary antibodies were used: rabbit anti-GFAP (1:3000), rabbit anti-ApoE (1:1500, Invitrogen), rabbit anti-BDNF (1:2000), rabbit anti-alpha synuclein (1:1000, ThermoFisher Scientific) and mouse anti-actin (1:20000) (*house keeper*). On the next day, blots were washed three times in TBST and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:10000) 1 h, at RT. After final three washes with TBST, immunoreactive bands were visualized by ECL prime (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), and band intensities were measured using

Chemiluminescence system (AI600 GE Healthcare Bioscience) and immunoreactive bands were quantified. Densities of the protein bands were measured by ImageJ software, and the statistical analysis was done by Graphpad prism 8.

Statistical Analysis

Normality of the data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between the groups in adiposity index were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Neuman-Keuls post hoc test. Body weight, caloric intake and sucrose preference test were analyzed by two way ANOVA with repeated measures followed by the Bonferroni post hoc test. Differences between the groups in open field test, forced swimming test, biochemical analysis, Western Blot and immunohistochemistry were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post hoc test. Values are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). The level of significance was set at $P \leq 0.05$. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism version 8.0 software.

RESULTS

High fat diet induces lower body weight and greater fat accumulation

As can be seen in Figure 2, during the experiment, HFD groups had reduced body weight, compared to SD groups more significantly in TP2, beginning earlier than TP1 at 4th week of dietary exposure. In both sham-HFD and ROT-HFD the body weight gain was reduced when compared with that of the SD groups. High-fat diet-fed rats showed a decreased body weight gain compared to the control rats (fig.2-A).

On the other hand, adiposity index of the HFD groups were found to be significantly higher than the SD groups (figure 2-B). Caloric intake was not significantly in the HFD groups, however all the groups had significantly less body gain compared SD groups during the experiment (figure 2-C).

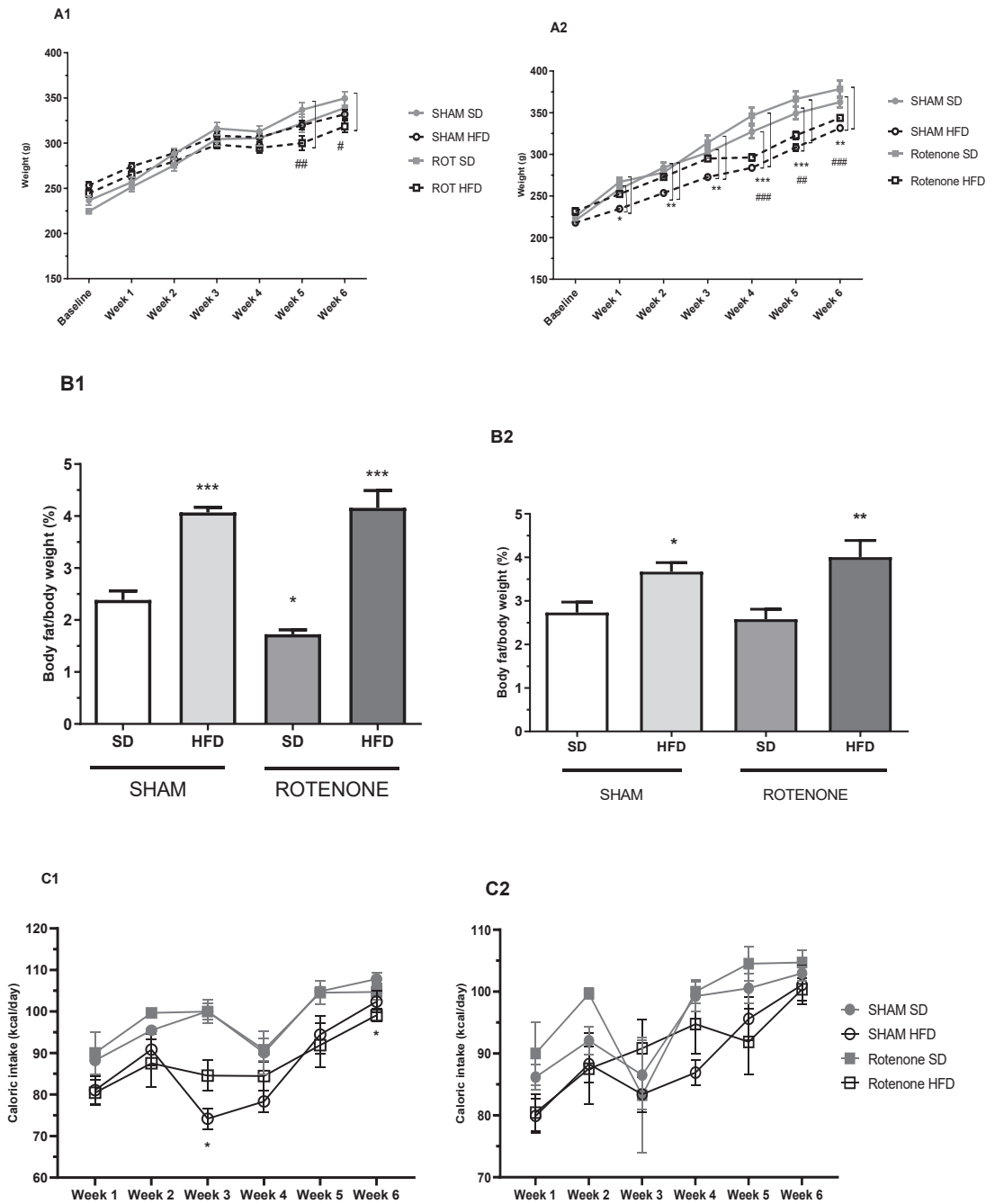


Fig. 2. Weight evolution, adiposity tissues and caloric intake over the exposure to high fat diet (HFD) versus standard diet (SD) between the groups . A. Body weight in TP1 (A1) and TP2 (A2). B Adiposity index in TP1 (B1) and TP2 (B2). C Caloric intake in TP1 (C1) and TP2 (C2). The bars represent the mean \pm standard error of the mean (n = 12-15 per group), * Differences between Sham/SD and Sham/HFD. *P \leq 0.05; **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001. # Differences between Sham/SD and Rot/HFD. One-way ANOVA followed by the Newman Keuls post hoc test (B) and ANOVA repeated measures (A,C).

Intranigral lesion induces early and chronic biochemical blood alterations

Following motor behavioral tests, we then assessed blood biochemistry using colorimetric essays. As expected HFD groups showed a significant increase in the levels of total cholesterol, triglycerides and LDL-C (figure 3). The animals' metabolic status demonstrates that HFD strongly induced hypercholesterolemia in both rat strains. Apart from the diet, only intranigral lesion led to an increased triglycerides in TP2 [$F(1,36) = 13,16$; $p=0,0009$] and LDL-C in TP1[$F(1,36) =5,323$; $p= 0,0269$]. Both TP1 and TP2 exhibited decreased HDL-C levels for lesion factor [$F (1,36)= 6,545$; $p=0,0149$ and $F (1,36)=4,941$; $p=0,0326$, respectively). Two-way ANOVA showed interactions between diet and lesion factors for total cholesterol [$F (1,36)= 7,278$; $p=0,0106$], HDL-C [$F (1,36)= 3,838$; $p=0,0579$], and CSF glucose [$F (1,24)= 4,777$ $p=0,0388$] in TP1.

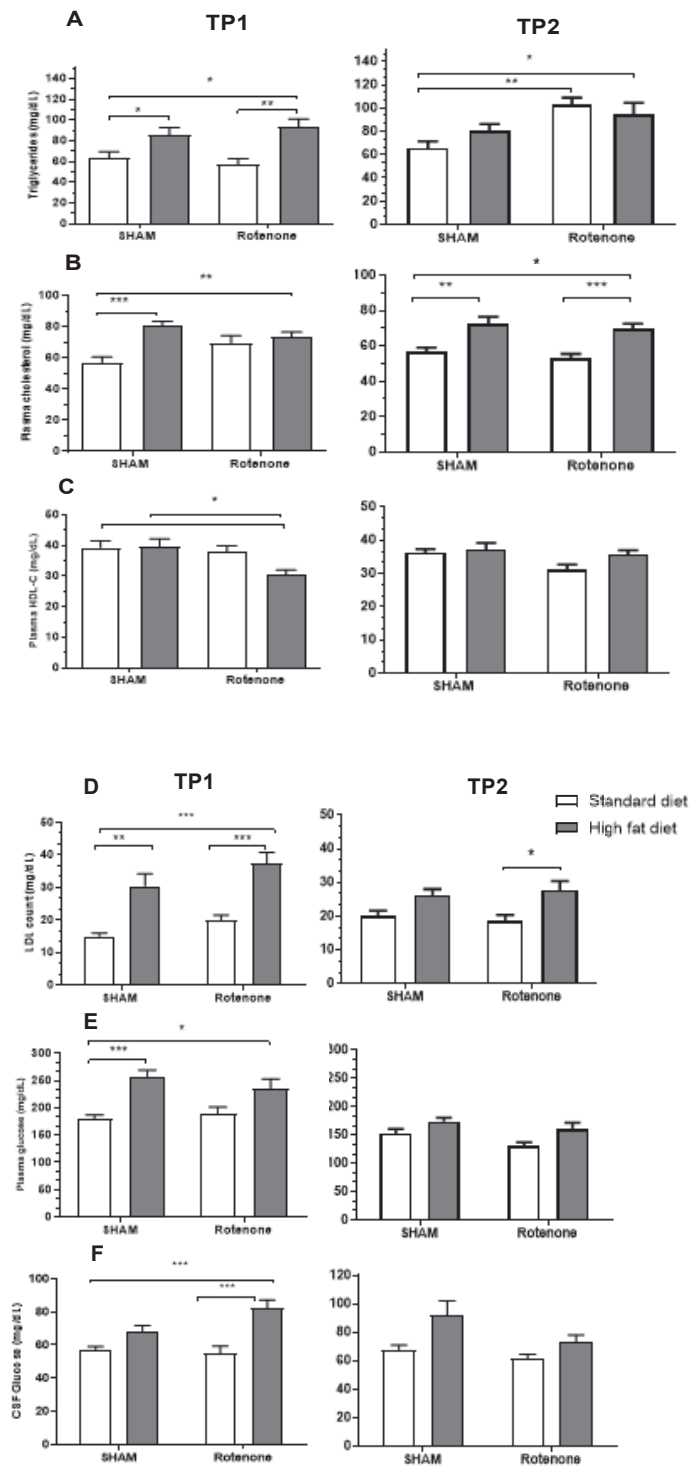


Figure 3. Biochemical analysis. **A.** Triglycerides; **B.** Total cholesterol; **C.** HDL-C; **D.** LDL-C; **E.** Plasma glucose; **F.** CSF glucose. The bars represent the mean \pm standard error of the mean (N=10 per group). * Differences for Sham/SD *P \leq 0.05; **P \leq 0.01; ***P \leq 0.001. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test.

Behavioral tests

As shown in Fig. 12, we evaluated the effects of both diet exposure and lesion on locomotor and depressive-like behavior. Open field test OFT, one of the most frequently used methods to measure the locomotor and explorative activity in rodents (BUDNI *et al.*, 2007), showed that HFD exposure causes motor hyperactivity in sham HFD group in TP1 [$F(1,56) = 5,265$; $p = 0,0255$]. Compared to control sham there was no change for TP2 groups regarding the factors.

Immobility time was increased for lesion factor in TP1 ($p < 0,0001$) and both lesion ($p < 0,0001$) and diet factors ($p = 0,0047$) on TP2. Again, swimming time showed an increase for lesion factor in TP1 and TP2 ($p < 0,0001$). HFD only tended to increase immobility [$F(1,56) = 8,654$; $p = 0,0047$] and reduced swimming time [$F(1,56) = 9,621$; $p = 0,0030$] in the TP2, resulting in a significant difference between the two HFD groups. Complementarily, the climbing time of the groups, at time-point 12 days, showed to be increased in the HFD groups when compared SD groups [$F(1, 56) = 5.848$; $p = 0.0189$] (Figure 3-C).

The analysis of sucrose preference (Fig. 5) revealed that rotenone groups exhibited a significant reduction of sucrose consumption compared to sham groups from the time-point 7 days at 14 days. At 21 days, the anhedonic behavior was still detected in the rotenone/HFD group compared to sham according to the lesion [$F(4, 25) = 6.639$; $P = 0.0009$], time point [$F(2, 50) = 6.537$; $P = 0.0030$], and interaction [$F(8, 50) = 2.413$; $P = 0.0275$] factors.

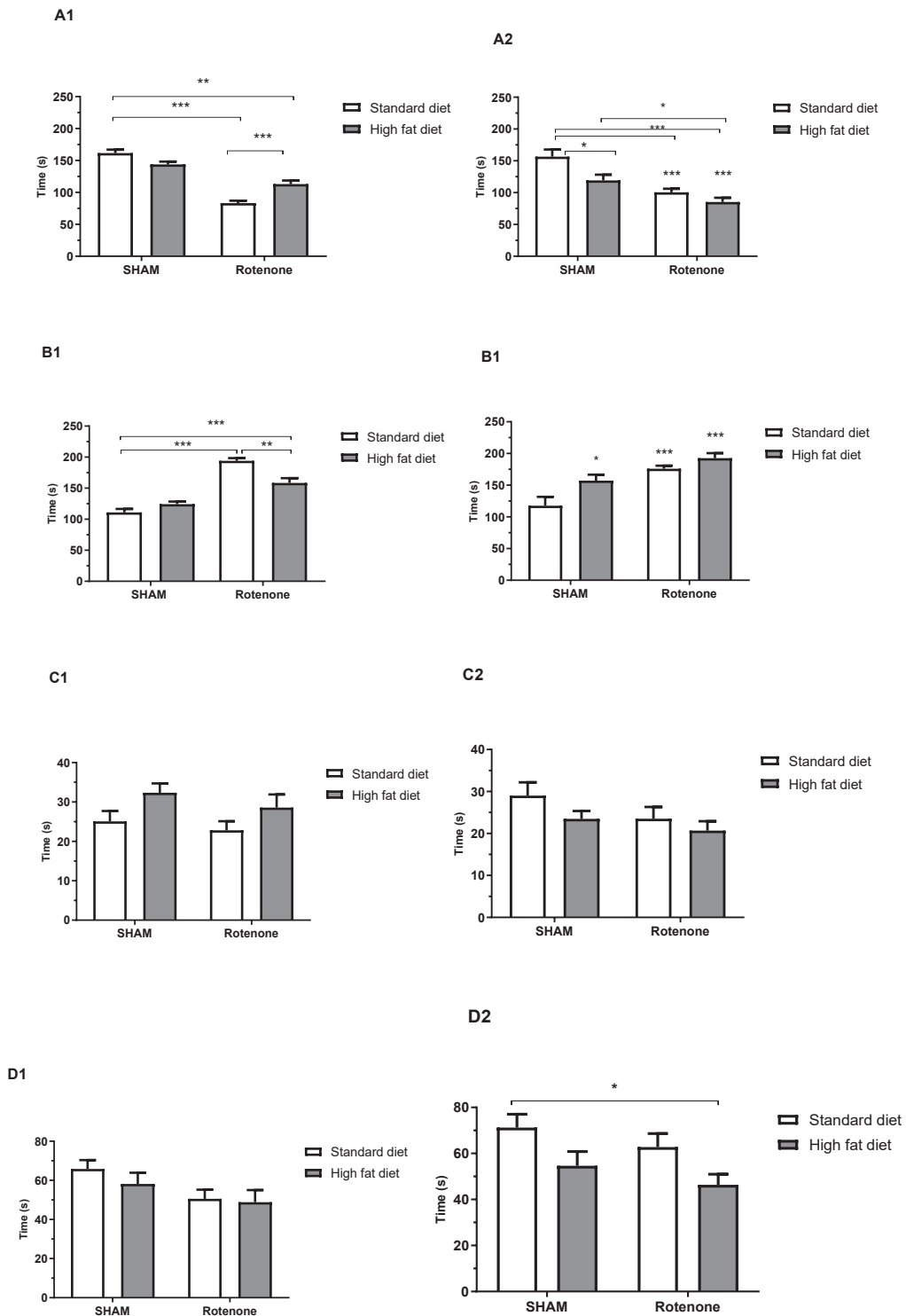


Fig. 4. Depressive-like behaviors during the modified forced swimming test. **A1**. Swimming time 12 days after intranigral rotenone. **A2**. Swimming time 24 days after intranigral rotenone. **B1**. Immobility time 12 days after intranigral rotenone. **B2**. Immobility time 24 days after intranigral rotenone. **C1**. Climbing time 12 days after intranigral rotenone. **C2**. Climbing time 24 days after intranigral rotenone. The bars represent the mean \pm standard error of the mean ($n = 15$ per group), * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test.

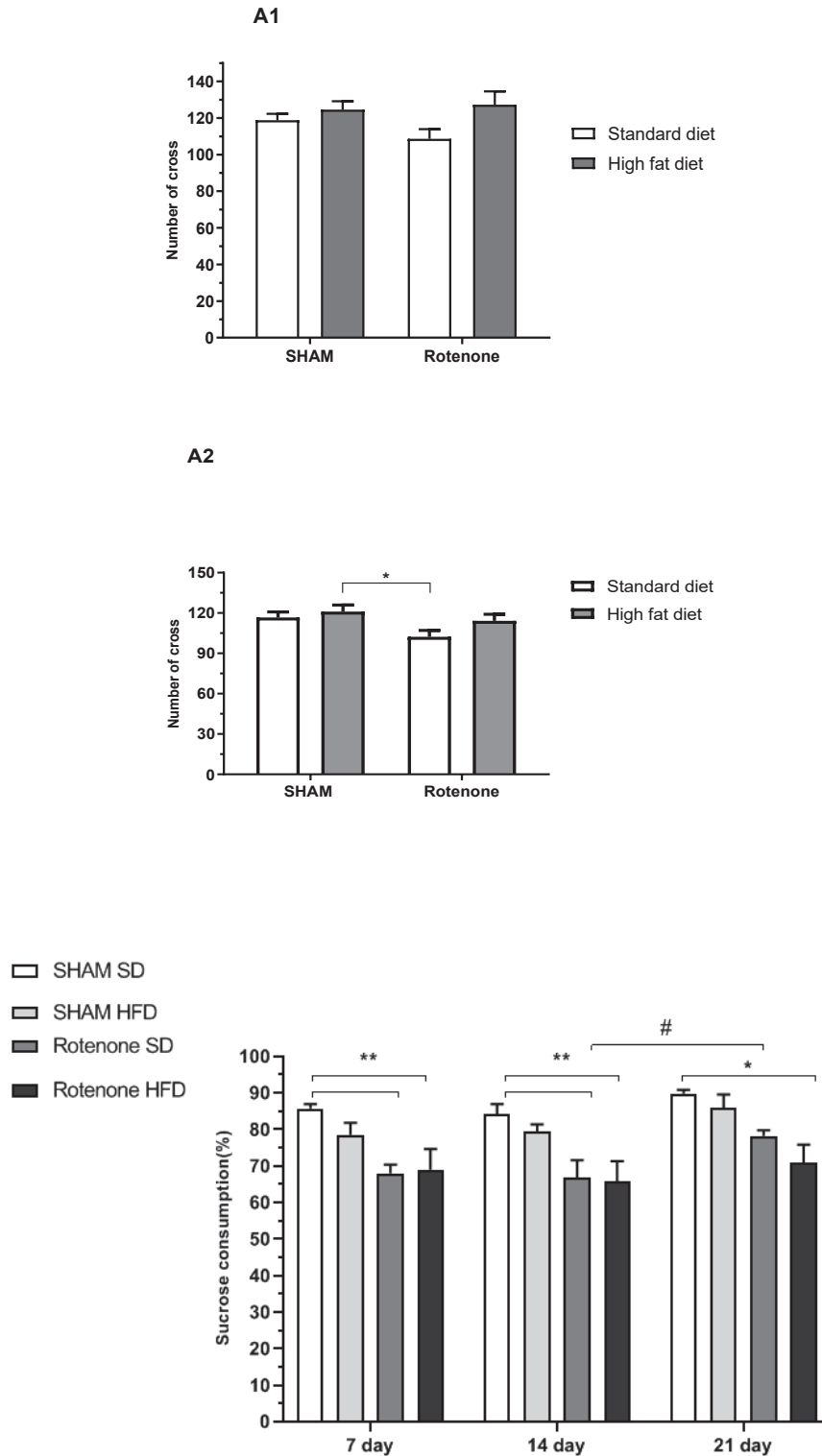


Fig 5. Anhedonic behavior and motor assessments. A Open field test TP1 (A1) and TP2 (A2). B Percentage of the sucrose consumption in the sucrose preference test. The bars represent the mean (n=12-15 per group) *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001. Two-way ANOVA with repeated measures followed by the Bonferroni post hoc test.

Intranigral lesion caused dopaminergic degeneration in SNpc

The analysis of the dopaminergic neurons in the SNpc revealed that rotenone caused a pronounced neuronal loss at both time-points. Figure 7 shows the quantification of TH-ir neuron density at time-point 12 days revealing that ROT/SD and ROT/HFD exhibited significant reductions ($P \leq 0.001$ and $P \leq 0.05$, respectively) compared to the control Sham. Likewise, at the 24 days time-point (Fig. 5j), the groups with rotenone lesion: also exhibited significant reductions in this parameter compared to the control group.

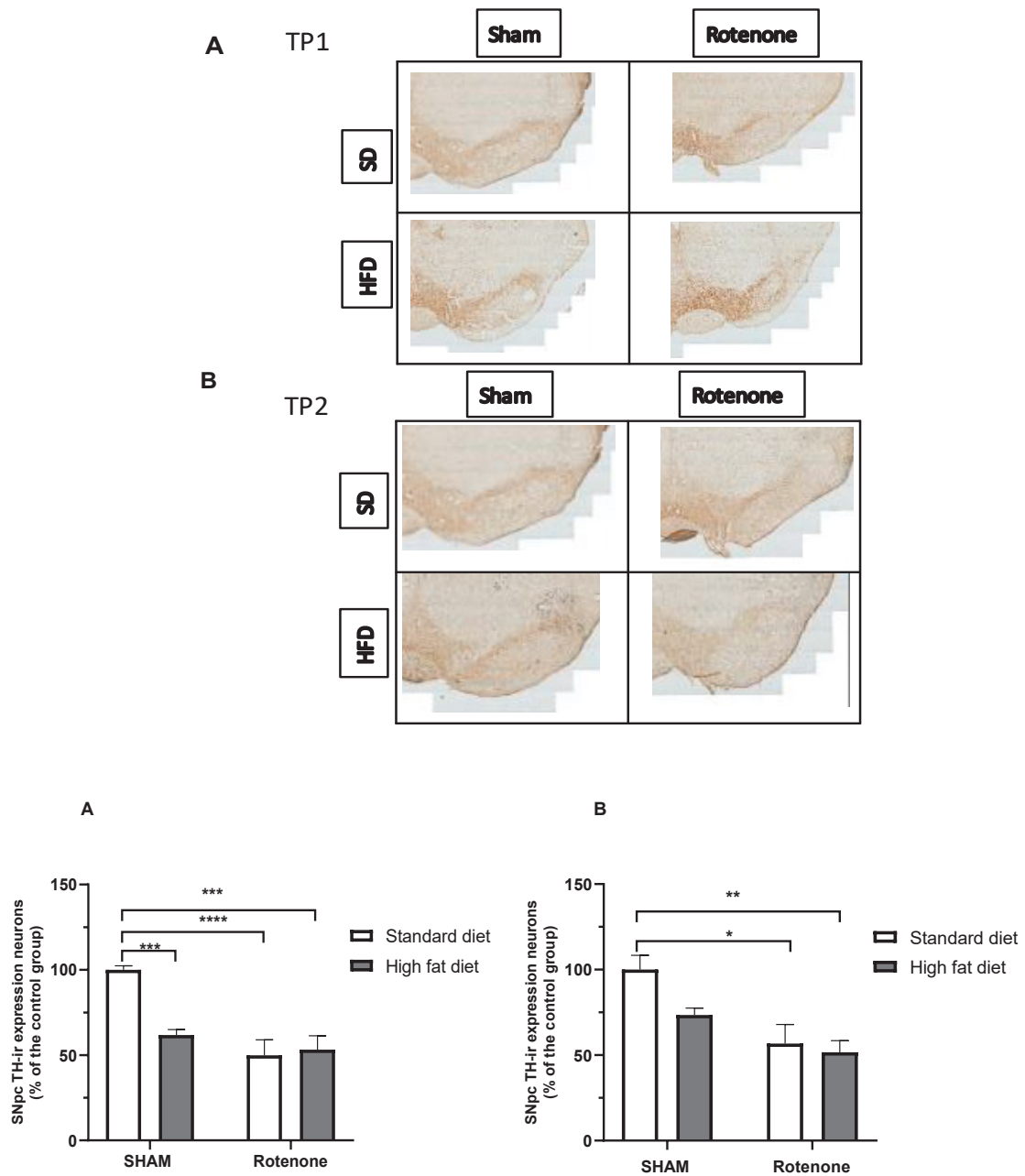


Figure 7. Immunohistochemistry of TH-ir neurons in the SNpc. **A.** Representative photomicrographies obtained after 12th day intranigral rotenone microinfusion (TP1) and quantification of SNpc TH-ir neurons. **B.** Representative photomicrographies obtained after 24th day intranigral rotenone microinfusion (TP2) and quantification of SNpc TH-ir neurons. Columns and bars denote the mean \pm SEM of eight rats in each experimental group. ($n = 4-5$ per group). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test.

High fat diet alters protein expression key proteins in PD induced rotenone

The anti- GFAP antibody recognizes a protein band with a relative mw of about 50 kDa. Interestingly, we observed that HFD rats exhibited decreased GFAP levels in the substantia nigra compared to SD rats [F (1, 12) = 25,54; P = 0.0003]. GFAP nigral expression in the ROT/HFD group was strongly reduced. Conversely, in the striatum, there was increased of GFAP expression for lesion factor [F (1, 12) = 4.764; P = 0.0497].

Then, we evaluated intranigral and striatal ApoE expression. There was increased for their expression in SN for lesion factor [F (1, 12) = 6.607; P = 0.0245] and interaction [F (1, 12) = 5.458; P = 0.0376].

The anti- BDNF antibody recognizes a protein band with a relative mw of about 13 kDa. There was expression reduced of BDNF in the hippocampus for lesion factor at both time points [F (1, 12) = 4.763; P = 0.0497; [F (1, 12) = 10.87; P = 0.064].

Last, we assess alpha-synuclein (α -Syn) expression on SN. Two-way ANOVA showed that it had increased their expression after 24 days rotenone exposure [F (1, 12) = 5.844; P = 0.0325]. The same did not happen after 12 days, since there was no statistically significant difference.

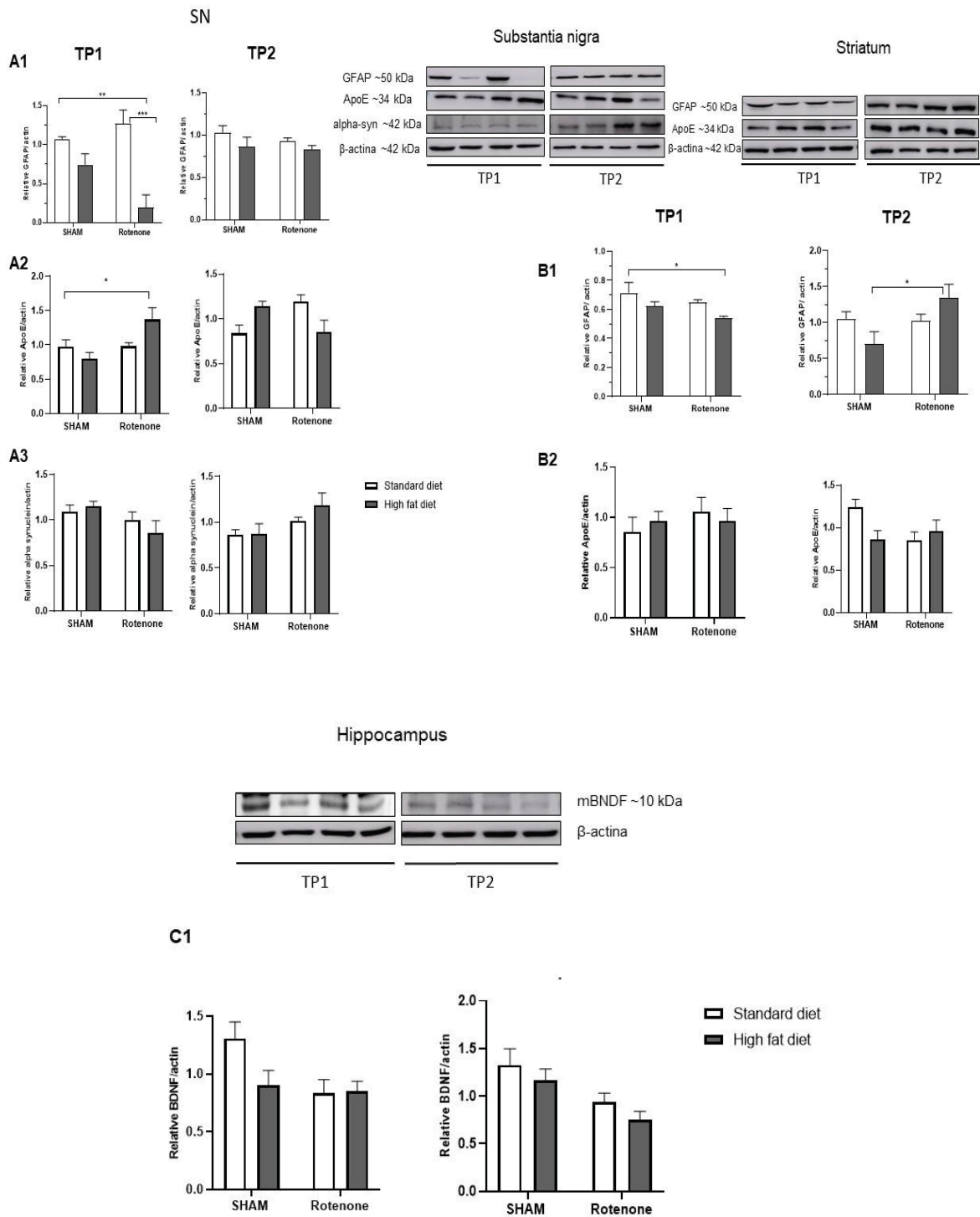


Figure 8. Western Blot analysis. A Measurements of protein expressions on SN. **A1.** GFAP; **A2.** ApoE; **A3.** alpha-synuclein. B Measurements of protein expressions on striatum. **B1.** GFAP; **B2.** ApoE. **C.** Measurements of BDNF expression on hippocampus. Columns and bars denote the mean \pm SEM of eight rats in each experimental group. (n = 4-6 per group). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test.

DISCUSSION

In the current study, we investigated the effects of HFD induced dyslipidemia in the rotenone model of PD according two time-points of toxin exposure and its effects in depressive-like behavior. Our results showed that HFD significantly affected body weight gain, as described in previous studies (CHO; HAN; LEE, 2013; GARMAN; SETLOW; ORSINI, 2021). However, we observed an effect more prone towards a reduction in body weight, prominently on TP2.

As expected, we also found that 6 week-HFD exposure was strongly associated with increased adiposity tissues at both time points. Since central or abdominal obesity is an independent marker of cardiovascular morbidity and mortality, it is recommended as a surrogate marker better than body mass index (CARMLENKE *et al.*, 2013). Excessive visceral adiposity is well established to result in metabolic disorders like dyslipidemia and insulin resistance (BOUSQUET *et al.*, 2012).

Biochemically, the body fat accumulation in the HFD group may be related to a decrease in energy expenditure and an increase in energy efficiency (ROMIEU *et al.*, 2017). The increase in energy efficiency may be partially due to the cost of lipid deposition once lipids have higher energy density (CAVALIERE *et al.*, 2018). The level of dietary fat has been related directly to an increase in body weight and body fat content. Animal models are useful for studying obesity such as HFDs ranging from 30% to 78% of total energy intake from fat. HFD can be associated with several comorbidities, decreased insulin sensitivity, and onset of type 2 diabetes mellitus (BASTÍAS-PÉREZ; SERRA; HERRERO, 2020).

Here, our diet model had around plus 60% calories compared to the standard diet. Moreover, caloric intake was not significantly higher in the HFD groups, with SD rats gaining more body weight during the experiment. In addition, we observed that HFD groups reduced their food intake compared to controls. This may be related to the higher energy efficiency of the high fat diet (SÖ RHEDE WINZELL; AHRÉ, 2004).

Dyslipidemia is characterized by elevated levels of plasma triglycerides (TGs), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), and apoprotein B (ApoB), and the decreased plasma level of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (ANAYA, 2012; BAGCHI *et al.*, 2018). The HFD alone only tended to increase blood lipids, cholesterol, triglycerides and LDL-C. In TP1, even without the significant effect

of injury there were no differences between the rotenone groups in cholesterol levels. Moreover, the combination of intranigral lesion and high-fat diet increased total cholesterol in rotenone group TP1, differences were not found for TP2. Some evidence from populational studies suggest that lipid metabolism is reportedly involved in PD. In a statin-free prospective study, higher levels of total and low-density lipoprotein cholesterol among middle-aged men over 7 years indicated a decreased PD risk (ROZANI *et al.*, 2018). A retrospective study indicated that lower triglycerides sporadic PD and lower cholesterol and LDL- C in GBA-associated PD. In a large prospective cohort study using GWAS (Genome Wide Association Study), higher level of cholesterol was associated with a lower risk of PD (FANG *et al.*, 2020). One of the hypotheses is that cholesterol would have a protective effect against neurodegeneration (PFRIEGER, 2003). In MPTP mice, lanosterol levels were decreased in the striatum and ventral midbrain and co-treatment of the cultures MPP+ lanosterol increased survival of dopaminergic neurons to 76% (LIM *et al.*, 2012). Lipidomic analysis in neuroblastoma cell line SH-SY5Y treated with the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) showed many lipid changes, the cholesterol-lowering drug statins did not have a protective effect, while low doses of cholesterol supplementation partially protected SH-SY5Y cells from 6-OHDA toxicity (XICOY *et al.*, 2020). Another plausible explanation is that circulating cholesterol levels decrease during PD pathogenesis even in early stages suggesting reverse causality (ROZANI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2021). Here, this protective role of cholesterol would be more prominent in early stages of PD or the most acute period. Besides, higher brain hydroxylated cholesterol metabolites (oxysterols) may be the result of higher cholesterol turnover in the compensatory repair of injured neuronal pathways in PD pathogenesis, robustly differentiates PD from controls (HUANG *et al.*, 2019). Cholesterol and oxysterols, including 27-OHC and 24S-OHC, have also been found in one study to be increased in the cortex of PD patients (CHENG *et al.*, 2011). The level of the oxysterol 24S-OHC in blood may be used as a sensitive marker of pathological processes and changes in the cholesterol homeostasis in the brain (BOGDANOVIC *et al.*, 2001; DORIA *et al.*, 2016).

We observed a significant reduction in HDL-C levels in both temporal analyses. The activity of Paraoxonase-1 (PON1), a high-density lipoprotein (HDL)-bound enzyme was significantly decreased in patients (IKEDA *et al.*, 2011). Lower plasma HDL and ApoA1, the major component of HDL, have been associated with

higher PD risk (QIANG *et al.*, 2013; SWANSON; LI *et al.*, 2015) and earlier PD onset (MAYURASAKORN *et al.*, 2016; SWANSON; BERLYAND; *et al.*, 2015). Metabolomics analyses have already been performed in depressed patients with PD showed that most significant and important pathway was “alpha linolenic acid and linoleic acid metabolism,” participating in the metabolism of essential polyunsaturated fatty acids (DONG *et al.*, 2018).

Behavioral assessments showed that rotenone administration induced depressive-like behaviors. As described previously, intranigral rotenone causes an increase in the immobility time and consequent decreases in swimming time in the forcing swimming test (NOSEDA *et al.*, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2010) and reduction in sucrose consumption (MADIHA; HAIDER, 2019; SANTIAGO *et al.*, 2010). In the Flinders Sensitive Line, a genetic rat model of depression, HFD exacerbated the depressive-like behavior, increasing immobility time on forced swim test (ABILDGAARD *et al.*, 2011).

Interestingly, we could observe in the MFST that HFD showed a dual effect, with reduction of immobility time in TP1 apparently attenuating depressive effects of injury. However, an opposite effect was seen in TP2. Chronic exposure to HFD has also been shown to result in depression-like behavior (WU *et al.*, 2018). Antidepressant-like effects can be a consequence of the neuroprotective role of cholesterol both in the mechanisms of neuronal repair and in the synthesis of serotonin (DEVEAU *et al.*, 2021). Some evidence described that low cholesterol was correlated with a higher risk of depression but the conclusions are contradictory (ZHANG *et al.*, 2022).

Intranigral rotenone causes impairments in swimming and immobility assessed in the MFST and a similar pattern of anhedonia reflected by a reduction of sucrose preference, as described in other studies (MADIHA; HAIDER, 2019). Additionally, a reduction of the neuronal population in the SNpc was consistently observed at all time points investigated in agreement with our previous findings in a rotenone model of PD (ZHANG, *et al.*, 2022)

The HFD alone also induces depressive-like behaviors in the MFST, a result apparently consistent with other findings linking depression, metabolic syndrome and obesity. These findings agree with epidemiological studies linking visceral fat and depressive symptoms in patients (HERSEY *et al.*, 2021).

The pathophysiological events leading to PD-associated depression, however, remain largely unknown. Several studies that have explored the mechanisms that underlie depression in PD patients have focused on deficiencies in monoaminergic systems such in mood regulation. Dopamine is known to play a role in mood, motivation and behavior. HFD is capable of activating and modulating the mesolimbic dopamine system independent of weight gain (DAVIS *et al.*, 2008). Besides, depression is related to the increased inflammatory response and is one of the features of obesity. Dutheil (2016) found elevation of inflammatory cytokines (ie, IL-6, IL-1 β , TNF α) in the hippocampus following 16 weeks-HFD.

The saturated fats present in the HFD are responsible for the increase in the glucose and lipid profiles (TIMMERS *et al.*, 2011). Glycemia, insulin regulates glucose uptake, neuronal and glial functions, such as growth, survival, metabolism, gene expression, synapse formation and plasticity (DE LA MONTE, 2005). Positive association between PD and type 2 diabetes mellitus has been obtained from prospective cohort studies (DRIVER *et al.*, 2008; SÁNCHEZ-GÓMEZ *et al.*, 2021). The relationship between diabetes and the development of PD found an overall of 41% increased risk (odds ratio) among individuals who have suffered from diabetes for 10 years or more (XU *et al.*, 2011). Also, abnormal glucose utilization has been specifically shown in the brains of patients with PD undergoing either magnetic resonance demonstrating glucose hypometabolism (MELES *et al.*, 2020).

The relative protein levels of BDNF, measured by WB, were significantly lower in the hippocampus of rotenone groups rats compared to Sham groups. BDNF is a member of the neurotrophins family (NTs) which is essential for the development of the CNS and for neuronal plasticity, an essential role for hippocampal formation on the memory and mood disorders. The decrease in neurotrophic factors (mainly BDNF) is a well-known pathogenesis hypothesis of depression (AUTRY; MONTEJA, 2012; KRISCHNAN, 2008). A decrease in the BDNF mature protein has been reported in the hippocampus and frontal cortex of rats exhibiting depressive-like behavior (LIU *et al.*, 2020; YU; CHEN, 2011). Reduced expression of BDNF in the hippocampus as a consequence of HFD have been shown in rodents (MOLTENI *et al.*, 2009). Study using chronic HFD (42% fat) no significant differences were found for the hippocampal immunocontents of pro and mature forms of BDNF, however HFD intake group presented alterations in several synaptic markers in the hippocampus, as β III-tubulin,

SNP-25 and PSD-95, showing that HFD may be implicated on alterations in synaptic activity (ARCEGO *et al.*, 2018).

In agreement, an increase in GFAP reactivity is the hallmark of reactive gliosis. Interestingly, co-exposed HFD + rotenone lesion strongly reduced GFAP levels expression in SN. Neuroinflammation is increasingly recognized as an important feature in the pathogenesis of PD and GFAP is a neuroinflammation biomarker. Previous studies report that HFD exposure elevated GFAP brain levels (BONDAN *et al.*, 2019; NUZZO *et al.*, 2018). However, another study shows GFAP and Iba1 immunoreactive area fraction in the hippocampi of HFCD-fed rats were decreased (GZIELO *et al.*, 2017). Excessive adiposity is characterized by a peripheral chronic low inflammation state due inflammatory cytokines production and release, which can be able drive neuroinflammation (DAS, 2001). Evidence from postmortem human brain tissues has shown changes in glial cell morphology, density and astrocyte-related biomarkers (HERCHER; TURECKI; MECHAWAR, 2009) An insufficient ATP release in astrocytes leads to depression-like behaviors (CAO *et al.*, 2013).

As seen in our experiments, intranigral lesions increased ApoE expression in SN on rotenone groups. ApoE is expressed in the brain predominantly in astrocytes and its synthesis increases after injury. Also, it is known for its anti-inflammatory role (ZHANG; WU; WU, 2011). Another study shows that an increase in GFAP was followed by a progressive increase in ApoE mRNA and protein levels and a subsequent increase of low density lipoprotein receptor (LDL-R) binding in neurons (DOMENGER *et al.* 2012). Injection of rotenone (1.5 mg/kg/day, s.c.) for 8 days significantly raised striatal apolipoprotein E (ApoE) levels (HAIDER; MADIHA; BATOOL, 2020).

Furthermore, the reduced functioning of mitochondrial complex I, the pivotal feature of rotenone's toxicity, is reported to be associated with increased expression of ApoE (CHEN *et al.*, 2011). A robust body of evidence has pointed to the crucial role of ApoE in neurodegenerative diseases. Genetically, three major alleles are reported for ApoE that express three different ApoE isoforms. APOE ϵ 4 is a well-established risk factor for sporadic Alzheimer's disease which to be associated with brain atrophy, neuronal loss and amyloid plaques formation (DAVIS *et al.*, 2020; DIBATTISTA; HEINSINGER; REBECK, 2016; MAHLEY, 2016).

It has been reported that a high-fat diet increases plasma levels of ApoE (HANNE-DONOVAN; HERZ, 2016), but the effect of diet on nigral and striatal levels of ApoE is not well understood. ApoE has also been linked to Parkinson's disease,

however, the mechanisms by which ApoE may impact PD pathogenesis have still not been unclear. In PD CSF, ApoE was increased in early stages. In brain autopsies, ApoE expression and LRP1 (the receptor of ApoE) appeared in melanized neurons of the SN in both PD and incidental LB disease cases (WILHELMUS *et al.*, 2011). Several clinical and preclinical studies have investigated how apoe genotype influences PD outcomes as motor and cognitive symptoms. Overall, ApoE ϵ 4 allele was associated with worst cognitive performance (SCHRAG *et al.*, 2017).

Here, there was a significant increase of α -synuclein expression only on 24 days after lesion. In PD, misfolded α -synuclein (α -Syn) is aggregated primarily in the cytoplasm of dopaminergic neurons to form LB or Lewy neurites, which can cause progressive death of neurons. α -Syn, the main constituent of LBs, could interact with either the lipid components or the apolipoprotein components of lipoproteins. Moreover, apolipoproteins have 11 aa repeats that mediate lipid interactions in a similar way to the N-terminal α -helices of α -syn (MAHLEY, 2016). Interestingly, it is possible that ApoE interacts with extracellular α -synuclein, modulating its release, uptake, and clearance (SARCHIONE *et al.*, 2021; TWOHIG, 2021).

REFERENCES

AARSLAND, A.B *et al.* Depression in Parkinson disease-epidemiology, mechanisms and management. **Nature Reviews Neurology**, v.8, n.1, p. 35-47, 2011.

ABILDGAARD, A.; SOLSKOV, L.; VOLKE, V.; *et al.* A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. *Psychoneuroendocrinology*, v. 36, n. 5, p. 623–633, 2011.

ARCEGO, D. M.; TONIAZZO, A. P.; KROLOW, R.; *et al.* Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 4, p. 2740–2753, 2018.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacol Rev**, v. 64, p. 238-258, 2012. Disponível em: doi: 10.1124/pr.111.005108.

BAGCHI, S.; HE, Y.; Zhang, H.; CAO, L.; VAN RHIJN, I.; MOODY, D. B.; GUDJONSSON, J. E.; WANG, C. R. CD1b-autoreactive T cells contribute to hyperlipidemia-induced skin inflammation in mice. **J Clin Invest**, v. 127, n.6, p. 2339-2352, 2017.

BASTÍAS-PÉREZ, Marianela; SERRA, Dolores; HERRERO, Laura. **Dietary options for rodents in the study of obesity. *Nutrients***. [S.l.]: MDPI AG. 1 nov. 2020.

BOGDANOVIC, N.; BRETILLON, L.; LUND, E. G. *et al.* On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. ***Neurosci Lett***. 314:45-48, 2001.

BONDAN, E. F.; CARDOSO, C. V.; MARTINS, M. D. F. M.; OTTON, R. Memory impairments and increased GFAP expression in hippocampal astrocytes following hypercaloric diet in rats. ***Arquivos de Neuro-Psiquiatria***, v. 77, n. 9, p. 601–608, 2019.

BOUSQUET, M.; ST-AMOUR, I.; VANDAL, M.; *et al.* High-fat diet exacerbates MPTP-induced dopaminergic degeneration in mice. ***Neurobiology of Disease***, v. 45, n. 1, p. 529–538, 2012.

BRAAK, H. *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. ***Neurobiology of Aging***. v.24, p.197-211, 2003.

BUETTNER, R.; PARHOFER, K. G.; WOENCKHAUS, M.; *et al.* Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. ***Journal of Molecular Endocrinology***, v. 36, n. 3, p. 485–501, 2006.

CAO, X.; LI, L. P.; WANG, Q.; *et al.* Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. ***Nature Medicine***, v. 19, n. 6, p. 773–777, 2013.

CARLEZON, Júnior, W. A. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. ***J. Neurosci.***, v. 21, p. 7397-7403, 2001.

CARMLENKE, S.; FREITAG, M. H.; PISCHON, T.; SCHLATTMANN, P.; FANKHAENEL, T.; GOEBEL, H.; GENSICHEN, J. General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: A systematic review and meta-regression analysis. ***Eur. J. Clin. Nutr.***, v. 67, p. 573-585. 2013.

CAVALIERE, G.; VIGGIANO, E.; TRINCHESE, G.; *et al.* Long feeding high-fat diet induces hypothalamic oxidative stress and inflammation, and prolonged hypothalamic AMPK activation in rat animal model. ***Frontiers in Physiology***, v. 9, n. JUL, 2018.

CHEN, H. K.; JI, Z. S.; DODSON, S. E.; *et al.* Apolipoprotein E4 domain interaction mediates detrimental effects on mitochondria and is a potential therapeutic target for alzheimer disease. ***Journal of Biological Chemistry***, v. 286, n. 7, p. 5215–5221, 2011.

CHENG, D.; JENNER, A. M.; SHUI, G.; *et al.* Lipid pathway alterations in parkinson's disease primary visual cortex. ***PLoS ONE***, v. 6, n. 2, 2011.

CHO, K. D.; HAN, C. K.; LEE, B. H. Loss of body weight and fat and improved lipid profiles in obese rats fed apple pomace or apple juice concentrate. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 9, p. 823–830, 2013.

CONDE ROJAS, I.; ACOSTA-GARCÍA, J.; CABALLERO-FLORÁN, R. N.; JIJÓN-LORENZO, R.; RECILLAS-MORALES, S.; AVALOS-FUENTES, J. A. *et al.* Dopamine D4 receptor modulates inhibitory transmission in pallido-pallidal terminals and regulates motor behavior. **Eur J Neurosci**. 52:4563-85, 2020.

CRYAN JF, MARKOU A, LUCKI I. 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245.

DAS, U. Is obesity an inflammatory condition? **Nutrition**, v. 17, p. 953-66. doi: 10.1016/s0899-9007(01)00672-4.2001.

DAVIS, A. A.; INMAN, C. E.; WARGEL, Z. M.; *et al.* APOE genotype regulates pathology and disease progression in synucleinopathy. *Science Translational Medicine*, v. 12, n. 529, 2020.

DAVIS, J.F.; TRACY, A.L.; SCHURDAK, J. D.; TSCHOP, M. H.; LIPTON, J. W.; CLEGG, D. J.; BENOIT, S. C. Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. **Behav. Neurosci**, v.122, p. 1257-1263, 2008.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: Relevance to Alzheimer's disease. **J. Alzheimers Dis**. 7, 45-61. 2005.

DE LAU, L. M.; BORNEBROEK, M.; WITTEMAN, J. C.; HOFMAN, A.; KOUDSTAAL, P. J.; BRETELER, M. M. Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: The Rotterdam study. **Neurology**. 64, 2040-2045, 2005.

DEVEAU, C. M.; RODRIGUEZ, E.; SCHROERING, A.; YAMAMOTO, B. K. Serotonin transporter regulation by cholesterol-independent lipid signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 183, 2021.

DIBATTISTA, A. M.; HEINSINGER, N. M.; REBECK, G. W. Alzheimer's Disease Genetic Risk Factor APOE-ε4 Also Affects Normal Brain Function. **Curr Alzheimer Res**, v. 13, n.11, p. 1200–1207, 2016.

DONG, Mei Xue *et al.* Integrated Analysis Reveals Altered Lipid and Glucose Metabolism and Identifies NOTCH2 as a Biomarker for Parkinson's Disease Related Depression. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 31 ago. 2018.

DONG, M.X. *et al.* Lipid metabolic dysregulation is involved in Parkinson's disease dementia. **Metabolism Brain Disease**, v.36, n.3, p. 463-470, 2021.

DORIA, M.; MAUGEST, L.; MOREAU, T.; LIZARD, G.; VEJUX, A. Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, , v.101, p. 393-400, 1 dez. 2016.

DRIVER, J. A.; SMITH, A.; BURING, J. E.; et al. Prospective cohort study of type 2 Diabetes and the risk of Parkinson's disease. **Diabetes Care**, v. 31, n. 10, p. 2003–2005, 2008.

GAO, X.; SIMON, K. C.; SCHWARZSCHILD, M. A.; ASCHERIO, A. Prospective study of statin use and risk of Parkinson disease. **Archives of Neurology**, v. 69, n. 3, p. 380–384, 2012.

GARMAN, T. S.; SETLOW, B.; ORSINI, C. A. Effects of a high-fat diet on impulsive choice in rats. **Physiology and Behavior**, v. 229, 2021.

GIAU, V. VAN; BAGYINSZKY, E.; AN, S. S. A.; KIM, S. Y. Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.16, n.11, p. 1723-1737, 2015.

GZIELO, K.; KIELBINSKI, M.; PLOSZAJ, J.; et al. Long-Term Consumption of High-Fat Diet in Rats: Effects on Microglial and Astrocytic Morphology and Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 37, n. 5, p. 783–789, 2017.

HAIDER, S.; MADIHA, S.; BATOOL, Z. Amelioration of motor and non-motor deficits and increased striatal APoE levels highlight the beneficial role of pistachio supplementation in rotenone-induced rat model of PD. *Metabolic Brain Disease*, v.35, p. 1189–1200, 2020.

HAN, J.; NEPAL, P.; ODELADE, A.; et al. High-Fat Diet-Induced Weight Gain, Behavioral Deficits, and Dopamine Changes in Young C57BL/6J Mice. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, 2021.

HERSEY, M.; WOODRUFF, J. L.; MAXWELL, N.; et al. High-fat diet induces neuroinflammation and reduces the serotonergic response to escitalopram in the hippocampus of obese rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 96, p. 63–72, 2021.

HUANG, X.; STERLING, N. W.; DU, G.; et al. Brain cholesterol metabolism and Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 34, n. 3, p. 386–395, 2019.

HUANG, Y.; MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 72, A:3-12, 2014.

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

IKEDA, K.; NAKAMURA, Y.; KIYOZUKA, T.; et al. Serological profiles of urate, paraoxonase-1, ferritin and lipid in Parkinson's disease: Changes linked to disease progression. **Neurodegenerative Diseases**, v. 8, n. 4, p. 252–258, 2011.

JAN, A.; GONÇALVES, N. P.; VAEGTER, C. B.; JENSEN, P. H.; FERREIRA, N. The prion-like spreading of alpha-synuclein in Parkinson's disease: Update on models and hypotheses. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.15, p. 8338, 2021.

LIU, J.; MENG, F.; DAI, J.; et al. The BDNF-FoxO1 Axis in the medial prefrontal cortex modulates depressive-like behaviors induced by chronic unpredictable stress in postpartum female mice. **Molecular Brain**, v. 13, n. 1, 2020.

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, n. 1, p. 297–308, 2019.

MAHLEY, R. W. Central nervous system lipoproteins: ApoE and regulation of cholesterol metabolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 7, p. 1305–1315, 2016.

MAYURASAKORN, Korapat *et al.* DHA but not EPA emulsions preserve neurological and mitochondrial function after brain hypoxia-ischemia in neonatal mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2016.

MELES, S. K.; RENKEN, R. J.; PAGANI, M.; et al. Abnormal pattern of brain glucose metabolism in Parkinson's disease: replication in three European cohorts. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 47, n. 2, p. 437–450, 2020.

MOLTENI, R.; BARNARD, R. J.; YING, Z.; ROBERTS, C. K.; GOMEZ-PINILLA, F. **A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning.** xxxx, 2002.

NOSEDA, A. C. D.; RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D. S.; et al. Putative role of monoamines in the antidepressant-like mechanism induced by striatal MT2 blockade. **Behavioural Brain Research**, v. 275, p. 136–145, 2014.

NUZZO, D.; AMATO, A.; PICONE, P.; et al. A natural dietary supplement with a combination of nutrients prevents neurodegeneration induced by a high fat diet in mice. **Nutrients**, v. 10, n. 9, 2018.

PAUL, R.; CHOUDHURY, A.; BORAH, A. Cholesterol: A putative endogenous contributor towards Parkinson's disease. **Neurochem Int.**, v.90, n. 11, p. 125-133, 2015.

PFRIEGER, F. W. Neurodegenerative Diseases and Cholesterol: Seeing the Field Through the Players. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v.13, 2021.

POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C. M.; et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

PLIAKAS, A. M.; CARLSON, R. R.; NEVE, R. L.; KONRADI, C.; NESTLER, E.J.; POEWE, Werner *et al.* Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1-21, 23 mar. 2017.

PORSOLT, R. D.; LE, P. M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**. 266, 730-732, 1977.

POWERS, K. M.; SMITH-WELLER, T.; FRANKLIN, G. M.; LONGSTRETH, W. T. Júnior; SWANSON, P. D.; CHECKOWAY, H. Dietary fats, cholesterol and iron as risk factors for Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**. 15, 47-52, 2009.

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, n.13, p. 1583-1590, 2014.

QIANG, J. K.; WONG, Y. C.; SIDEROWF, A.; et al. Plasma apolipoprotein A1 as a biomarker for Parkinson disease. **Annals of Neurology**, v. 74, n. 1, p. 119–127, 2013.

REICHMANN, H.; SCHNEIDER, C.; LÖHLE, M. Non-motor features of Parkinson's disease: depression and dementia. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15, n. SUPPL. 3, 2009.

REIJNDERS, J. S. A. M.; EHRT, U.; WEBER, W. E. J.; AARSLAND, D.; LEENTJENS, A. F. G. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v.23, n.2, p. 183-189, 2008.

ROMIEU, I.; DOSSUS, L.; BARQUERA, S.; et al. Energy balance and obesity: what are the main drivers? **Cancer Causes and Control**, v. 28, n. 3, p. 247–258, 2017.

ROY, A.; PAHAN, K. Prospects of statins in Parkinson disease. **Neuroscientist**, v. 17, n. 3, p. 244–255, 2011.

ROZANI, V. *et al.* Statin adherence and the risk of Parkinson's disease: A population-based cohort study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2017.

ROZANI V.; GUREVICH, T.; GILADI, N.; EL-AD, B.; TSAMIR, J.; HEMO, B.; PERETZ, C. Higher serum cholesterol and decreased Parkinson's disease risk: A statin-free cohort study. **Mov Disord**. 33, 1298-1305, 2018.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, A.; DÍAZ, Y.; DUARTE-SALLES, T.; COMPTA, Y.; MARTÍ, M. J. Prediabetes, type 2 diabetes mellitus and risk of Parkinson's disease: A population-based cohort study. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 89, p. 22–27, 2021.

SANTIAGO, R. M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M. M. S.; et al. 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 and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1104–1114, 2010.

SARCHIONE, A.; MARCHAND, A.; TAYMANS, J. M.; CHARTIER-HARLIN, M. C. Alpha-synuclein and lipids: The elephant in the room? **Cells**, v. 10, n.9, 2021.

SCHRAG, A.; SIDDIQUI, U. F.; ANASTASIOU, Z.; WEINTRAUB, D.; SCHOTT, J. M. Clinical variables and biomarkers in prediction of cognitive impairment in patients with newly diagnosed Parkinson's disease: a cohort study. **The Lancet Neurology**, v. 16, n. 1, p. 66, 2017.

SÖRHEDE WINZELL, M.; AHRÉ, B. The High-Fat Diet-Fed Mouse A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2. **Diabetes**, Suppl 3:S215-9, 2004.

SWANSON, C. R.; BERLYAND, Y.; XIE, S. X.; et al. Plasma apolipoprotein A1 associates with age at onset and motor severity in early Parkinson's disease patients. **Movement Disorders**, v. 30, n. 12, p. 1648–1656, 2015.

SWANSON, C. R.; LI, K.; UNGER, T. L.; et al. Lower plasma apolipoprotein A1 levels are found in Parkinson's disease and associate with apolipoprotein A1 genotype. **Movement Disorders**, v. 30, n. 6, p. 805–812, 2015.

TAKEDA, M.; MARTÍNEZ, R.; KUDO, T.; et al. Apolipoprotein e and central nervous system disorders: Reviews of clinical findings. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, 2010

TAN, M. M. X.; LAWTON, M. A.; JABBARI, E.; et al. Genome-Wide Association Studies of Cognitive and Motor Progression in Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 36, n. 2, p. 424–433, 2021.

TIMMERS, S. *et al.* Differential effects of saturated versus unsaturated dietary fatty acids on weight gain and myocellular lipid profiles in mice. **Nutr. Diabetes**. 1, e11, 2011.

TROPEA, Thomas F. *et al.* APOE, thought disorder, and SPARE-AD predict cognitive decline in established Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 33, n. 2, p. 289-297, 1 fev. 2018.

WANG, S.H. *et al.* Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 3, p. 295-304, mai. 2009.

WILHELMUS, M. M. M.; BOL, J. G. J. M.; VAN HAASTERT, E. S.; et al. Apolipoprotein e and LRP1 increase early in Parkinson's disease pathogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 5, p. 2152–2156, 2011.

WOLOZIN, B.; WANG, S. W.; LI, N. C.; et al. Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. **BMC Medicine**, v. 5, 2007.

XICOY, H.; BROUWERS, J. F.; KALNYTSKA, O.; WIERINGA, B.; MARTENS, G. J. M. Lipid Analysis of the 6-Hydroxydopamine-Treated SH-SY5Y Cell Model for Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 2, p. 848–859, 2020.

YU, H.; CHEN, Z. Y. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. **Acta Pharmacologica Sinica**, jan. 2011.

YULUG, B.; OZAN, E.; GONUL, A. S.; KILIC, E. Brain-derived neurotrophic factor, stress and depression: a minireview. **Brain Res. Bull.** 78, 267-269, 2009.

ZHANG, H.; WU, L. M.; WU, J. Cross-talk between apolipoprotein e and cytokines. **Mediators of Inflammation**, 2011.

ZHANG, J.; LIU, Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. **Protein and Cell**, v. 6, n. 4, p. 254–264, 2015.

ZHANG, J.; SUN, B.; YANG, J.; et al. Comparison of the effect of rotenone and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on inducing chronic Parkinson's disease in mouse models. **Molecular Medicine Reports**, v. 25, n. 3, 2022.

ZHANG, Q.; LIU, Z.; WANG, Q.; LI, X. Low cholesterol is not associated with depression: data from the 2005-2018 National Health and Nutrition Examination Survey. **Lipids in Health and Disease**, v. 21, n. 1, 2022.

7 DISCUSSÃO

Na presente tese, nós investigamos amplamente o papel dos biomarcadores lipídicos no contexto de um modelo animal da doença de Parkinson. Para atingir tal objetivo, dividimos a tese em três conjuntos de experimentos (apresentados na forma de capítulos).

Inicialmente, realizamos um estudo-piloto a fim de padronizarmos a dieta a ser empregada, mimetizando as características fisiológicas de uma dislipidemia induzida dieteticamente. Para tanto, a dieta deveria ter as seguintes características: ser capaz de induzir a um fenótipo dislipidêmico, ou seja, alterar de forma significativa os níveis de lipídios; ter um baixo custo e produzir essas alterações metabólicas em um menor tempo possível de exposição, de forma a ser viável experimentalmente. Com base na literatura, selecionamos três períodos diferentes de exposição à dieta (6, 8 e 10 semanas). A dieta foi formulada “*in house*” com um acréscimo de cerca de 60% de gorduras e valor calórico, comparada à dieta controle habitualmente oferecida aos animais no biotério. A partir da análise centesimal da dieta, observamos um aumento no valor calórico total (502,72 x 323,44 kcal) e gordura total (34,64 x 4,52), conforme tabela mostrada no capítulo 2.

No capítulo 2, com base nos resultados obtidos em todos os experimentos realizados, o acréscimo de gorduras e alto valor calórico da dieta não resultou em um aumento significativo no peso corporal nos grupos HFD. Dessa forma, levando-se em consideração apenas esta variável – peso corporal – concluímos que a HFD não resultou em um **efeito obesogênico** nos animais, como previamente foi observado em outros trabalhos com modelo similar. Sabemos que a obesidade reflete um desequilíbrio entre o ganho e o gasto energético, resultando em um balanço energético positivo. A etiologia da obesidade está relacionada tanto a fatores genéticos quanto a ambientais, sendo a dieta o principal fator ambiental envolvido (CABALLERO, 2019; WILLIAMS *et al.*, 2015). Contudo, há uma grande variabilidade de resposta metabólica devido a diferentes períodos de consumo da dieta, diferentes tipos de ingredientes utilizados em sua confecção e tratamentos diferentes oferecidos aos animais (ROSINI *et al.*, 2012). Devido ao conteúdo lipídico, a HFD tem uma alta densidade energética e, conseqüentemente, maior eficiência alimentar, o que não se refletiu em aumento do peso corporal (BASTÍAS-PÉREZ; SERRA; HERRERO, 2020).

Cabe ressaltar que nosso objetivo não foi, especificamente, obter um efeito obesogênico nos animais, mas sim, um fenótipo dislipidêmico. Isso se deve a dois fatores: primeiro, o objetivo do estudo era obter um modelo de desequilíbrio metabólico, em que há um aumento do conteúdo lipídico tanto no plasma como um acúmulo de gordura corporal em sítios adiposos, sem necessariamente refletir em aumento do peso corporal, típico da obesidade (CSIGE *et al.*, 2018; ROMIEU *et al.*, 2017). Esse efeito obesogênico não era desejável, pois uma alteração drástica no peso corporal poderia conduzir a um efeito negativo no modelo já padronizado de doença de Parkinson induzido pela infusão da neurotoxina rotenona na SNpc, o qual é padronizado para animais eutróficos (280g-320g), devido à localização precisa das estruturas encefálicas no aparelho estereotáxico.

Conforme já explicitado ao longo deste trabalho, a dislipidemia exerce diversas consequências deletérias ao Sistema Nervoso, levando a um estado de inflamação de baixo grau, neuroinflamação e alterando a microbiota intestinal à qual tem sido associada uma variedade de comorbidades, como doença cardiovascular, diabetes mellitus tipo 2 e aterosclerose. Recentemente, a importância da dieta tem sido mostrada em estudos de quadros neuropsiquiátricos, como depressão e outras doenças neurológicas.

Porém, quanto à ingestão calórica da dieta, não houve diferença significativa na quantidade de calorias ingeridas pelos animais HFD e SD. Embora as dietas fossem oferecidas “*ad libitum*”, não houve um maior consumo de calorias por parte dos grupos experimentais mesmo ingerindo uma dieta hipercalórica. Dessa forma, observa-se que, embora o consumo alimentar seja menor nos grupos HFD, ele é mais eficiente do ponto de vista energético, já que possui um maior aporte calórico.

Em um segundo momento, como apresentado no capítulo 1, investigamos o efeito agudo nos animais expostos unicamente à neurotoxina rotenona, reconhecidamente um dos modelos animais de DP e já empregado em nosso laboratório como modelo que mimetiza a fase prodrômica da doença (FAGOTTI *et al.*, 2019; KMITA *et al.*, 2019). Um de nossos achados foi o efeito agudo da lesão intranigral produzindo alterações bioquímicas precoces com redução de colesterol total e sua fração HDL, assim como a hiperglicemia verificada nos animais no dia subsequente à exposição a neurotoxina. Juntos, esses achados sustentam a hipótese de que pode haver um efeito precoce da degeneração nigroestriatal com provável resistência à insulina, fato também já observado em pacientes com DP estabelecida.

Como explicitado, evidências consistentes trazem a relação entre DP e diabetes tipo II e o efeito da lesão na bioenergética mitocondrial. Contudo, também se observa que o efeito sistêmico da neurotoxina em relação a marcadores metabólicos ainda é pouco explorado. A lesão intranigral também reduziu a atividade locomotora dos animais, como visto no teste de campo aberto. Contudo não houve correlação dos marcadores lipídicos e glicemia com esse comportamento.

No capítulo 3, investigamos se a HFD poderia ter um efeito sinérgico à lesão em relação aos comportamentos tipo-depressivos quantificados nos animais e quais seriam os possíveis impactos dessa dieta na expressão de proteínas-chave na fisiopatologia da DP.

Como esperávamos, de acordo, com o observado no capítulo 2, a HFD *per se* levou a uma proeminente alteração em diversos marcadores lipídicos, tais como: colesterol total, triglicerídeos, HDL-C, LDL-C e glicemia em todos os experimentos. Dessa forma, consistentemente, a dieta que empregamos foi capaz de induzir plenamente alterações metabólicas compatíveis com um fenótipo de dislipidemia e de hiperglicemia. No entanto, ao confrontarmos a literatura, observamos que a exposição à HFD exibe grande heterogeneidade, fato que poderia explicar, somado a outros fatores, por exemplo, a variabilidade observada nos testes comportamentais nos grupos SHAM/HFD em relação ao comportamento tipo-depressivo.

Ainda, neste capítulo 3, mostramos que a lesão intranigral induzida por rotenona levou a um aumento significativo dos níveis de colesterol total e LDL-C em TP1, redução do HDL-C, alterado significativamente para o fator Lesão mostrado no ANOVA de 2 vias em ambos os *time points*, sendo observada interação entre os fatores **lesão** e **dieta**, mostrando que a HFD foi capaz de potencializar o efeito da lesão de maneira sinérgica. Dessa forma, a lesão *per se* foi capaz de causar alteração metabólica em um período de exposição mais breve, já que a coleta das amostras ocorreu 12 dias após a infusão da neurotoxina. Em TP2, ou seja, após 24 dias de exposição à neurotoxina, observa-se que o HDL-C permaneceu reduzido, assim como os níveis glicêmicos reduzidos, caracterizando hipoglicemia.

À luz da literatura, conforme discutido no capítulo 3, observamos que o colesterol pode ter um papel neuroprotetor diante da lesão induzida por rotenona, devido à sua importância fundamental na fisiologia neuronal, na homeostase do Sistema Nervoso e por participar dos mecanismos de reparo neuronal. Conforme apontado, alguns estudos mostram que o aumento do colesterol total pode reduzir o

risco de desenvolvimento da DP. Contudo, como a síntese de colesterol encefálico é endógena, discute-se qual seria a relação entre os níveis sistêmicos e os níveis locais do colesterol.

Conjuntamente, esses dados confirmam e corroboram trabalho anterior de nosso laboratório (ainda que com metodologias de análise diferentes) e mostram que o metabolismo lipídico é afetado de forma significativa no modelo animal de rotenona. A infusão intranigral bilateral de rotenona na mesma concentração utilizada aqui (12 µg/µl) também induziu a um aumento na concentração plasmática de triglicerídeos e lipoproteínas LDL e VLDL (FAGOTTI *et al.*, 2019). Outro estudo conduzido por nosso grupo detalhado no capítulo 1 mostrou que a lesão provocou alterações de forma aguda (intervalo de 24 horas aproximadamente) nos marcadores lipídicos, causando hipocolesterolemia e redução do HDL-C (CHUPROSKI *et al.*, 2023).

Em relação à glicemia, mais uma vez, observamos o efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica, elevando os níveis glicêmicos. Por outro lado, quanto ao fator lesão, ao contrário do que foi observado no capítulo 1, no capítulo 3 houve uma diferença significativa em TP2 mostrada no teste estatístico, mas, dessa vez, reduzindo a glicemia dos animais dos grupos rotenona se comparada aos animais Sham. A depressão maior resulta de alterações na atividade mediada por 5-HT em várias regiões do cérebro, como o hipocampo e o córtex frontal (HAMON; BLIER, 2013). Prejuízos na sinalização cerebral da insulina têm sido associados a modificações do sistema serotoninérgico (ZEMDEGS *et al.*, 2016).

Quanto aos testes comportamentais, foi observado no teste de campo aberto que a lesão intranigral não produziu redução significativa da atividade locomotora, o que pode indicar, por um lado, que a degeneração dopaminérgica resultante da lesão foi insuficiente para produzir os sintomas motores da DP, mimetizando a fase prodrômica da doença (SANTIAGO *et al.*, 2010) ou, ainda, sendo uma resposta compensatória à lesão revertida posteriormente.

Já na avaliação do comportamento tipo depressivo, foram utilizados dois testes comportamentais: preferência à sacarose e natação forçada. Comparando-se os resultados obtidos em ambos os testes, pode-se dizer que a lesão bilateral com rotenona na SNpc causou comportamento tipo depressivo. O comportamento tipo depressivo mostrado nos testes foi consistente com a perda neuronal dopaminérgica na substância negra nos grupos rotenona, a qual mostrou a mesma diferença estatística para o fator lesão no teste de ANOVA de 2 vias. Em média, os grupos

rotenona/SD e rotenona/HFD tiveram uma perda dopaminérgica ao redor de 50% comparado aos controles para ambos os tempos de exposição (12 e 24 dias).

É interessante destacar o resultado do teste de natação forçada em TP1, em que o grupo Rotenone/HFD mostrou uma diferença significativa com o grupo Rotenone/SD, com aumento do tempo de natação e redução do tempo de imobilidade, apontando um possível efeito antidepressivo parcialmente. Conforme supramencionado, esse efeito poderia ser explicado por um mecanismo compensatório diante da injúria tecidual. Contudo, na análise imunohistoquímica, não houve diferença entre os grupos rotenona, mostrando que esse efeito antidepressivo não se deve precisamente a uma maior sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, podendo ser considerado um outro mecanismo para explicá-lo.

Como já descrito anteriormente no capítulo 3, o colesterol, devido às suas propriedades estruturais, poderia ter um efeito protetor quanto à neurodegeneração, o que poderia explicar algum efeito de redução do comportamento tipo depressivo nos animais lesados e também alimentados pela HFD (Rotenona/HFD). Além disso, o colesterol influencia na regulação do transportador de serotonina (SERT) neurotransmissor envolvido na regulação do humor, especialmente em córtex pré-frontal e hipocampo (DEVEAU *et al.*, 2021). É possível que o incremento calórico e lipídico possa influenciar nesses mecanismos, reduzindo, portanto, o comportamento tipo-depressivo.

Em relação ao painel de expressão de proteínas, houve aumento na expressão de alfa-sinucleína na SN dos animais lesados pela rotenona 24 dias após a lesão (TP2). Dessa forma, a neurotoxina levou a um aumento da expressão da forma monomérica da alfa-sinucleína (banda de 14 kDa). Isso mostra a ativação de um mecanismo de caráter mais crônico da exposição à neurotoxina, já que o mesmo não foi observado nos animais TP1, ou seja, 12 dias após a lesão intranigral.

Da mesma forma, a expressão de GFAP mostrou-se alterada no grupo ROT/HFD com uma redução bastante significativa de sua expressão. Questiona-se se os dois fatores somados (lesão intranigral + dislipidemia) poderiam ter culminado, por exemplo, na expressão de outra isoforma de GFAP, como visto em casos de lesão traumática do encéfalo (MCMAHON *et al.*, 2015), ou ainda, se a combinação dos fatores poderia resultar fatalmente em redução da expressão da proteína devido a atrofia astrocitária. Os astrócitos são células da glia relacionadas ao suporte e nutrição dos neurônios, contribuindo para sua homeostase. A disfunção dos astrócitos

conduz a prejuízos na sinalização sináptica e influencia o comportamento (ZHOU *et al.*, 2019). Estudos têm mostrado a redução da densidade celular glial e de marcadores astrocitários em indivíduos com transtornos de humor (ZHOU *et al.*, 2019).

Como já demonstrado amplamente neste trabalho, a proteína ApoE tem papel fundamental na fisiologia e homeostase neuronal. Como já explicitado anteriormente, um de seus alelos é reconhecido como o maior fator de risco genético para a doença de Alzheimer. Nessa mesma linha, diversas evidências têm sustentado o papel relevante dessa proteína na fisiopatologia da DP, revelando a importância do metabolismo lipídico na doença.

Ressalta-se aqui os resultados da expressão de ApoE na substância negra no grupo rotenona, indicando aumento na sua expressão, o que corrobora evidências que a expressão dessa proteína aumenta diante da lesão tecidual (MAHLEY, 2016b; PASLAWSKI *et al.*, 2019). Tais evidências apontam que a ApoE junto aos demais marcadores lipídicos possui um grande potencial como biomarcador diagnóstico e prognóstico da doença. Além da ApoE, outros marcadores relacionados ao metabolismo lipídico, como o receptor de LDL, têm sido relacionados como importantes no entendimento da fisiopatologia da doença. O efeito sinérgico da dislipidemia em aumentar a expressão de ApoE poderia ter efeito neuroprotetor, observado no aparente “efeito antidepressivo” no teste de natação forçada como observado em TP1 no grupo Rotenona/HFD, dado pelo ANOVA de 2 vias.

A expressão reduzida de BDNF foi observada em ambos os *time points* analisados, o que também corrobora com os resultados dos testes comportamentais de natação forçada e preferência à sacarose. Outros estudos também obtiveram essa mesma relação do comportamento tipo-depressivo e redução de neurotrofinas cerebrais. Pacientes com quadro depressivo exibem menores níveis de BDNF hipocámpais, o que também foi observado em pacientes com DP e depressão (JIN, 2020). Em suma, como demonstramos por meio do modelo animal aqui empregado, ApoE como principal lipoproteína do encéfalo, parece ter um papel importante após a lesão intranigral, sobretudo nos estágios mais precoces, com possíveis aplicações práticas para o diagnóstico e prognóstico na DP.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a lesão intranigral aguda induzida pela neurotoxina rotenona (12 µg/µL) levou a repercussões sistêmicas nos níveis de lipídios e glicemia dos animais, com hipocolesterolemia, redução do HDL-C e hiperglicemia. Ainda, a *High fat diet* foi eficaz em reproduzir as características fisiológicas de uma dislipidemia induzida dieteticamente, assim como induziu comportamento tipo depressivo, particularmente no período de 8 semanas de exposição à dieta.

A lesão intranigral levou ao comportamento tipo-depressivo, confirmado pela degeneração dopaminérgica na SN e redução da expressão de BDNF no hipocampo dos animais. Os efeitos metabólicos da lesão e o sinergismo lesão intranigral + dislipidemia parecem ser tempo-dependentes. Da mesma forma, mostramos que os lipídios exercem importância, à medida que estão implicados nos mecanismos de reparo neuronal, com papel neuroprotetor, a exemplo do Colesterol. Destaca-se que o modelo de dislipidemia combinado à lesão intranigral produziu efeitos diferentes do ponto de vista bioquímico, molecular e comportamental em ambos os *time points* avaliados. A expressão aumentada de ApoE em TP1 nos animais lesados, mostra que este pode ser um marcador chave para a DP, especialmente em estágios mais precoces.

A fim de se investigar de forma mais detalhada esses achados, podem ser conduzidas análise lipídômica e neuroquímica para se avaliar de forma mais contundente os mecanismos subjacentes à dislipidemia combinada ao modelo animal de DP.

REFERÊNCIAS

AASETH, J. *et al.* Diets and drugs for weight loss and health in obesity – An update. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, n.140, 2021.

ABILDGAARD, A. *et al.* A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 5, p. 623–633, jun. 2011.

ALBUQUERQUE, D. *et al.* The contribution of genetics and environment to obesity. **British Medical Bulletin**, v.123, p. 159-173, 1 sep. 2017.

ALFONSETTI, M.; CASTELLI, V.; D'ANGELO, M. Are We What We Eat? Impact of Diet on the Gut–Brain Axis in Parkinson's Disease. **Nutrients**. v.14, n.2, 2022.

ALONSO, A. *et al.* Use of antidepressants and the risk of Parkinson's disease: A prospective study. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 80, n. 6, p. 671-675, jun. 2009.

ANDRÉ, C. *et al.* Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: Focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 41, n. 1, p. 10–21, 2014.

ARMSTRONG, Melissa J.; OKUN, Michael S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 32, n.6, p. 548-560, 2020.

ARCEGO, D. M. *et al.* Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 4, p. 2740–2753, 1 abr. 2018.

ASLANI, S. *et al.* The effect of high-fat diet on rat's mood, feeding behavior and response to stress. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 11, 24 sep. 2015.

ASSOGNA, F. *et al.* Drug Choices and Advancements for Managing Depression in Parkinson's Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 18, n. 4, p. 277-287, oct. 2019.

ATKINSON, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**. v. 69, n.3, p.89-95. 2001.

BALES, K. R. Brain lipid metabolism, apolipoprotein E and the pathophysiology of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 59, p. 295-302, 2010.

BAIGENT, C.; KEECH, A.; KEARNEY, P. M. *et al.* Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. **Lancet**. v.366, p. 1267-78, sep. 2005.

BAIZABAL-CARVALLO, J. F.; ALONSO-JUAREZ, M.; FEKETE, R. Intestinal Decontamination Therapy for Dyskinesia and Motor Fluctuations in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neurology**, v. 12, n.10, sep. 2021.

BALESTRINO, R.; MARTINEZ-MARTIN, P. Neuropsychiatric symptoms, behavioural disorders, and quality of life in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 15, n. 373, p.173-178, feb. 2017.

BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D. P.; CUNNINGHAM, M. C. **et al.** Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). **Mov Disord**, 21, n. 6, p. 800-808, jun. 2006.

BAR-ON, P. *et al.* Statins reduce neuronal α -synuclein aggregation in in vitro models of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 5, p. 1656-1667, jun. 2008.

BARONE, P. *et al.* Pramipexole for the treatment of depressive symptoms in patients with Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 9, p. 573-580, 2010.

BARONE, P. *et al.* The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 24, n. 11, p. 1641-1649, 15 aug. 2009.

BARTH, J. A.; TSCHÖP, M.; HEIMAN, M. L. Endocrinology & Diabetes Rodent obesity models: An overview. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v.109, n.6, p. 307-319.

BASSANI, T.B. *et al.* Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain Research**, v.17, p. 95-105, 2014.

BASSIL, F.; FERNAGUT, P. O.; BEZARD, E.; MEISSNER, W. G. Insulin, IGF-1 and GLP-1 signaling in neurodegenerative disorders: Targets for disease modification? **Progress in Neurobiology**, v.118, p.1-18, 2014.

BASTÍAS-PÉREZ, M.; SERRA, D.; HERRERO, L. Dietary options for rodents in the study of obesity. **Nutrients**., v.12, n.11, 22 Oct. 2020.

BASTIDE, M. F. *et al.* Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**. v.132, n. 36, sep. 2015.

BEKRIS, L. *et al.* Review article: Genetics of Alzheimer disease. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 2, n. 4, p. 213–227, dec. 2010.

BERBERICH, A. J.; HEGELE, R. A. A Modern Approach to Dyslipidemia. **Endocrine Reviews**, v. 43, n. 4, p. 611–653, 1 ago. 2022.

BERG, D. *et al.* MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v.30, n.12, p. 1600-1609, 2015.

BERG, J. M. The complex regulation of cholesterol biosynthesis takes place at several levels. **Biochemistry**, 5th ed, W.H.Freeman, New York, 2002.

BLOCK, R. C.; DORSEY, E. R.; BECK, C. A.; BRENNAN, J. T.; SHOULSON, I. Altered cholesterol and fatty acid metabolism in Huntington disease. **J Clin Lipidol.** v. 4, p.17–23, 2010.

BJÖRKHEM, I.; HEVERIN, M.; LEONI, V.; MEANEY, S.; DICZ-FALUSY, U. Oxysterols and Alzheimer's disease. **Acta Neurol Scand.** v.185, p.43-49, 2006.

BOLDARINE, V. T. *et al.* High-fat diet intake induces depressive-like behavior in ovariectomized rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

BONATO, J. M.; BASSANI, T. B.; MILANI, H.; VITAL, M. A. B. F.; DE OLIVEIRA, R. M. W. Pioglitazone reduces mortality, prevents depressive-like behavior, and impacts hippocampal neurogenesis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in rats. **Experimental Neurology**, v. 300, p. 188–200, 2018.

BONDAN, E. F.; CARDOSO, C. V.; MARTINS, M. D. F. M.; OTTON, R. Memory impairments and increased GFAP expression in hippocampal astrocytes following hypercaloric diet in rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 77, n. 9, p. 601–608, 2019.

BRAAK, H. *et al.* Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research.** v.308, p.121-134, 2004.

BRAAK, H. *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging.** v.24, p.197-211, 2003.

BROWN, L.; PANCHAL, S. K. *Rodent models for metabolic syndrome research.* **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011.

BUETTNER, R. *et al.* Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, n. 3, p. 485-501, jun. 2006.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity.** v.15, p. 798-808, 2007.

BYKOV, K. *et al.* Confounding of the association between statins and Parkinson disease: systematic review and meta-analysis. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 26, n. 3, p. 294-300, 1 mar. 2017.

CABALLERO, B. Humans against Obesity: Who Will Win? **Adv Nutr**, v.1, n. 10:S4–S9, jan. 2019.

CABREIRA, V.; MASSANO, J. Parkinson's disease: Clinical review and update. **Acta Medica Portuguesa**, v. 32, n. 10, p. 661-670, 2019.

CALABRESI, P. *et al.* Direct and indirect pathways of basal ganglia: A critical reappraisal. *Nature Neuroscience*. **Nature Neuroscience**. V. 17, n.8, p.1022-1030, 2014.

CAO, X.; LI, L. P.; WANG, Q.; *et al.* Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. **Nature Medicine**, v. 19, n. 6, p. 773–777, 2013.

CARMLENKE, S.; FREITAG, M. H.; PISCHON, T.; SCHLATTMANN, P.; FANKHAENEL, T.; GOEBEL, H.; GENSICHEN, J. General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: A systematic review and meta-regression analysis. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 67, p. 573-585. 2013.

CARTELLI, D.; RONCHI, C.; MAGGIONI, M. G.; *et al.* Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP⁺-induced neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 1, p. 247–258, 2010.

CASTELLI, V. *et al.* Diet and Brain Health: Which Role for Polyphenols? **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 2, p. 227-238, 14 dec. 2017.

CAVALIERE, G. *et al.* Long feeding high-fat diet induces hypothalamic oxidative stress and inflammation, and prolonged hypothalamic AMPK activation in rat animal model. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 6 jul. 2018.

CHEN, A. D. *et al.* Rotenone aggravates PD-like pathology in A53T mutant human α -synuclein transgenic mice in an age-dependent manner. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, 8 ago. 2022.

CHEN, A. D. *et al.* Rotenone aggravates PD-like pathology in A53T mutant human α -synuclein transgenic mice in an age-dependent manner. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, 8 ago. 2022.

CHENG, E. M. *et al.* Quality improvement in neurology: AAN Parkinson disease quality measures Report of the Quality Measurement and Reporting Subcommittee of the American Academy of Neurology, **Neurology**, v. 75, n.30, 2010.

CHENG, D.; JENNER, A. M.; SHUI, G.; *et al.* Lipid pathway alterations in parkinson's disease primary visual cortex. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

CHESSLET, M. F. *et al.* A Progressive Mouse Model of Parkinson's Disease: The Thy1-aSyn ("Line 61") Mice. **Neurotherapeutics**. v. 9, p. 297–314, 2012.

CHEW, N. W. S. *et al.* The global burden of metabolic disease: Data from 2000 to 2019. **Cell metabolism**, v. 35, n. 3, p. 414- 428.e3, 7 mar. 2023. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36889281>>.

CHIA, S. J.; TAN, E. K.; CHAO, Y. X. Historical perspective: Models of Parkinson's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, 1. abr. 2020.

CHIKATIMALLA, R. *et al.* Depression in Parkinson's Disease: A Narrative Review. **Cureus**, v. 14, n. 8, 7 ago. 2022.

CHO, K. D.; HAN, C. K.; LEE, B. H. Loss of body weight and fat and improved lipid profiles in obese rats fed apple pomace or apple juice concentrate. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 9, p. 823–830, 2013.

CHOHAN, H.; SENKEVICH, K.; PATEL, R. K.; et al. Type 2 Diabetes as a Determinant of Parkinson's Disease Risk and Progression. **Movement Disorders**, v. 36, n. 6, p. 1420–1429, 2021.

CHUPROSKI, A. P. *et al.* Metabolic dysfunctions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. **Experimental Brain Research**, v. 241, n.5, 1289-198, may 2023.

COLARDO, M.; PETRAROIA, M.; LERZA, L.; et al. NGF Modulates Cholesterol Metabolism and Stimulates ApoE Secretion in Glial Cells Conferring Neuroprotection against Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, 2022.

CONNOLLY, B.; FOX, S. H. Treatment of Cognitive, Psychiatric, and Affective Disorders Associated with Parkinson's Disease. **Neurotherapeutics**. v. 11, p. 78–91, jan. 2014.

COVA, I.; PRIORI, A. Diagnostic biomarkers for Parkinson's disease at a glance: where are we? **Journal of Neural Transmission**. v. 125, p.1417–1432, 1 out. 2018.

CSIGE, I. *et al.* The Impact of Obesity on the Cardiovascular System. **Journal of Diabetes Research**. v.18, 2018.

CUNHA, L. F. Modelling hypercholesterolaemia in rats using high cholesterol Diet. **Int J Exp Pathol**. v. 102, n. 2, p.74-79, 2021.

CUSTERS, E.M. *et al.* Dietary lipids from body to brain. **Progress in Lipid Research**. v.85, 2022.

DA SILVA, T. M. *et al.* Depression in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **Journal of Affective Disorders**, v. 111, n. 2-3, p. 351-359, 2008.

DAI, L.*et al.* **Cholesterol Metabolism in Neurodegenerative Diseases**: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. v.58.p. 183–2201, 2021.

DARWEESH, S.K. L. *et al.* Incidence of Parkinson Disease in the General Population: The Rotterdam Study. **Am. J. Epidemiol**. v.183, 1018–1026, 2016.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**. V.39, n.6, p. 889-909, 2003.

DAVIS, A. A. *et al.* APOE genotype regulates pathology and disease progression in synucleinopathy. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 529, 5 fev. 2020.

DEVEAU, C. M. *et al.* Serotonin transporter regulation by cholesterol-independent lipid signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 183, jan. 2021.

DEUTZ, N. E.; WOLFE, R. R. Is there a maximal anabolic response to protein intake with a meal? **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 309–313, abr. 2013.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **J Parkinsons Dis**, v. 3, n.4, p.461- 491, 2013.

DIBATTISTA, A. M.; HEINSINGER, N. M.; REBECK, G. W. Alzheimer's Disease Genetic Risk Factor APOE- ϵ 4 Also Affects Normal Brain Function. **Curr Alzheimer Res**, v. 13, n.11, p. 1200–1207, 2016.

DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S.D. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. **Journal of Lipid Research**. v.45, 2004.

DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Cholesterol metabolism in the brain. **Curr Opin Lipidol**. v.12, n.2, p. 105-12, 2001.

DOBKIN, R.D. *et al.* Cognitive Behavior Therapy for Depression in Parkinson's Disease: A Randomized Controlled Trial. **Am J Psychiatry**, v.168, n.10, p. 1066–1074, oct 2011.

DONG, M. X. *et al.* Integrated Analysis Reveals Altered Lipid and Glucose Metabolism and Identifies NOTCH2 as a Biomarker for Parkinson's Disease Related Depression. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 31 ago. 2018.

DONG, M. X. *et al.* Metabolomics profiling reveals altered lipid metabolism and identifies a panel of lipid metabolites as biomarkers for Parkinson's disease related anxiety disorder. **Neuroscience Letters**, v. 745, 6 fev. 2021.

DONG, M. X.; WEI, Y. D.; HU, L. The disturbance of lipid metabolism is correlated with neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 239, 1 set. 2021.

DONG, M.X. *et al.* Lipid metabolic dysregulation is involved in Parkinson's disease dementia. **Metabolism Brain Disease**, v.36, n.3, p. 463-470, 2021.

DORIA, M. *et al.* Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.101, p. 393-400, 1 dez. 2016.

DORSEY, E. R.; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, J. P. *et al.* Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**. V.68, p. 384-386, 2007.

DOWLATI, Y. *et al.* A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446–457, 1 mar. 2010.

DRANKA, B. P.; ZIELONKA, J.; KANTHASAMY, A. G.; KALYANARAMAN, B. Alterations in bioenergetic function induced by Parkinson's disease mimetic compounds: Lack of correlation with superoxide generation. **Journal of Neurochemistry**, v. 122, n. 5, p. 941–951, 2012.

DRIVER, J. A.; SMITH, A.; BURING, J. E.; et al. Prospective cohort study of type 2 Diabetes and the risk of Parkinson's disease. **Diabetes Care**, v. 31, n. 10, p. 2003–2005, 2008.

DUNNING, C. J. R.; GEORGE, S.; BRUNDIN, P. What's to like about the prion-like hypothesis for the spreading of aggregated α -synuclein in Parkinson disease? **Prion** v. 7, n. 1, p. 92–97, 2013.

DUTHEIL, S. *et al.* High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 7, p. 1874–1887, 1 jun. 2016.

ELLIOTT, D. A.; WEICKERT, C. S.; GARNER, B. Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders. **Clin Lipidol.** v.51, p.555-573, 2010.

ELLULU, M. S. *et al.* Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. **Archives of Medical Science**, v. 13, n. 4, p. 851–863, 2017.

EMAMZADEH, F.N. Role of Apolipoproteins and α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. **J Mol Neurosci**. V.62, p. 344-355, 2017.

ENGEL, D.F. *et al.* Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr^{-/-} mouse experimental model. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p.31-38, 2016.

ERION, J. R. *et al.* Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 7, p. 2618–2631, 2014.

ESTADELLA, D. *et al.* Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Basic nutri invest**, v. 20, p. 218-24, 2004.

FAGOTTI, J. *et al.* Chronic sleep restriction in the rotenone Parkinson's disease model in rats reveals peripheral early-phase biomarkers. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

FALUDI, A. A. *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 109, n. 2 suppl 1, p. 1-76, jul. 2017.

FANG, F. *et al.* Lipids, Apolipoproteins, and the Risk of Parkinson Disease: A Prospective Cohort Study and a Mendelian Randomization Analysis. **Circulation Research**, p. 643-652, 2020.

FATHALLA, A. M.; SOLIMAN, A. M.; ALI, M. H.; MOUSTAFA, A. A. Adenosine A2A receptor blockade prevents rotenone-induced motor impairment in a rat model of parkinsonism. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, n. 35, 2016.

FUJIWARA, S. *et al.* Anhedonia in Japanese patients with Parkinson's disease. **Geriatrics and Gerontology International**, v. 11, n. 3, p. 275-281, jul. 2011.

GANCHEVA, S.; GALUNSKA, B.; ZHELYAZKOVA-SAVOVA, M. Diets rich in saturated fat and fructose induce anxiety and depression-like behaviours in the rat: is there a role for lipid peroxidation? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 5, p. 296–306, 1 out. 2017.

GAO, X.; SIMON, K. C.; SCHWARZSCHILD, M. A.; ASCHERIO, A. Prospective study of statin use and risk of Parkinson disease. **Archives of Neurology**, v. 69, n. 3, p. 380–384, 2012.

GARCEZ, M.R. *et al.* Prevalence of dyslipidemia according to the nutritional status in a representative sample of São Paulo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 103, n. 6, p. 476-484, 2014.

GARCÍA-SANZ, P.; M.F.G. AERTS, J.; MORATALLA, R. The Role of Cholesterol in α -Synuclein and Lewy Body Pathology in GBA1 Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v.36, n.5, p. 1070-1085, 2021.

GARMAN, T. S.; SETLOW, B.; ORSINI, C. A. Effects of a high-fat diet on impulsive choice in rats. **Physiology and Behavior**, v. 229, 2021.

GAWLINSKA, K. *et al.* Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation provokes depressive-like behavior and influences the irisin/brain-derived neurotrophic factor axis and inflammatory factors in male and female offspring in rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 407–411, 1 jun. 2019.

GELDERS, G.; BAEKELANDT, V.; VAN DER PERREN, A. Linking neuroinflammation and neurodegeneration in parkinson's disease. **Journal of Immunology Research.**, 2018.

GERHARD, A. *et al.* In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 21, n. 2, p. 404-412, 2006.

GIASSON, B. *et al.* Neuronal-Synucleinopathy with Severe Movement Disorder in Mice Expressing A53T Human-Synuclein. **Neuron**. v. 34, p. 521–533, 2002.

GIAU, V. V. *et al.* Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**. v.11, p. 1723–1737, 2015.

GIBSON, G. E.; KINGSBURY, A. E.; XU, H.; *et al.* Deficits in a tricarboxylic acid cycle enzyme in brains from patients with Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 43, n. 2, p. 129–135, 2003.

GORITZ, C.; MAUCH, D. H.; PFRIEGER, F.W. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 190-201, jun. 2005.

GOSSELET, F. *et al.* Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: Use of an in vitro model. **Brain Research**, v. 1249, p. 34-42, 16 jan. 2009.

GRIFFITHS, W. J. *et al.* The Cerebrospinal Fluid Profile of Cholesterol Metabolites in Parkinson's Disease and Their Association With Disease State and Clinical Features. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 13, 30 ago. 2021.

GULUNAY, A. *et al.* Frequency of non-motor symptoms and their impact on the quality of life in patients with Parkinson's disease: a prospective descriptive case series. **Psychogeriatrics**, v. 20, n. 2, p. 206-211, 1 mar. 2020.

GUS, I. *et al.* Variations in the prevalence of risk factors for coronary artery disease in Rio Grande do Sul-Brazil: A comparative analysis between 2002 and 2014. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 105, n. 6, p. 573-579, 1 dez. 2015.

GUZMAN, J. N.; SANCHEZ-PADILLA, J.; WOKOSIN, D.; *et al.* Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 696–700, 2010.

GZIELO, K.; KIELBINSKI, M.; PLOSZAJ, J.; *et al.* Long-Term Consumption of High-Fat Diet in Rats: Effects on Microglial and Astrocytic Morphology and Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 37, n. 5, p. 783–789, 2017.

HAIDER, S.; MADIHA, S.; BATOOL, Z. Amelioration of motor and non-motor deficits and increased striatal APoE levels highlight the beneficial role of pistachio supplementation in rotenone-induced rat model of PD. **Metabolic Brain Disease**, v.35, p. 1189–1200, 2020.

HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. 1 ago. 2013.

HAN, A. L. Association between lipid ratio and depression: a cross-sectional study. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

HAN, J. *et al.* High-Fat Diet-Induced Weight Gain, Behavioral Deficits, and Dopamine Changes in Young C57BL/6J Mice. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, 20 jan. 2021.

HASEGAWA, S. *et al.* Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 5 nov. 2015.

HASSAN, A. M. *et al.* High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated with changes in microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome. **Nutritional Neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 877-893, 2 dez. 2019.

HATTORI, N.; MIZUNO, Y. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Nippon rinsho. Japanese journal of clinical medicine**. v.60, Suppl 4:406-11. 2002.

HERSEY, M. *et al.* High-fat diet induces neuroinflammation and reduces the serotonergic response to escitalopram in the hippocampus of obese rats. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 96, p. 63–72, 1 ago. 2021.

HOGG, E.; ATHREYA, K.; BASILE, C.; *et al.* High prevalence of undiagnosed insulin resistance in non-diabetic subjects with Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 8, n. 2, p. 259–265, 2018. IOS Press.

HIGA, T. S. *et al.* Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 47-54, 2014.

HU, G. *et al.* Total cholesterol and the risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 70, p. 1972-1979, 2008.

HU, G. Total cholesterol and the risk of Parkinson's disease: A review for some new findings. **Parkinsons Disease**, v.10, 2010.

HUANG, X.; STERLING, N. W.; DU, G.; *et al.* Brain cholesterol metabolism and Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 34, n. 3, p. 386–395, 2019.

HUANG, Y.; MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 72, A:3-12, 2014.

HUGHES, T. M.; KULLER, L. H.; LOPEZ, O. L. *et al.* Markers of cholesterol metabolism in the brain show stronger associations with cerebrovascular disease than Alzheimer's disease. **J Alzheimers Disease**. v.30, n.1, p. 53-61, 2012.

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

IKEDA, K.; NAKAMURA, Y.; KIYOZUKA, T.; *et al.* Serological profiles of urate, paraoxonase-1, ferritin and lipid in Parkinson's disease: Changes linked to disease progression. **Neurodegenerative Diseases**, v. 8, n. 4, p. 252–258, 2011.

ISHIMOTO, T. *et al.* High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. **Hepatology**, v. 58, n. 5, p. 1632–1643, nov. 2013.

JAGMAG, S. A. *et al.* Evaluation of models of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**. v.9, 2016.

JAN, A. *et al.* The prion-like spreading of alpha-synuclein in parkinson's disease: Update on models and hypotheses. **International Journal of Molecular Sciences**. v.22, p.1-23, 1 ago. 2021.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. v.79, p.368-76, 2008.

JIANG, Z. *et al.* Effects of higher serum lipid levels on the risk of parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Neurology**. v.11, 2020.

JIN, U.; PARK, S.; Jin; PARK, S. M. Cholesterol metabolism in the brain and its association with Parkinson's disease. **Experimental Neurobiology**. v.28, n.5, p. 554-567. 2019.

JIN, W. Regulation of BDNF-TrkB signaling and potential therapeutic strategies for parkinson's disease. **Journal of Clinical Medicine**. v.9, n.257, 1 jan. 2020.

KAREINEN, I. **Mast Cells and HDL – Studies on Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport**. Doctoral Programme In Clinical Veterinary Medicine, University Of Helsinki, 2016.

KABUTO, H. *et al.* Effects of squalene/squalane on dopamine levels, antioxidant enzyme activity, and fatty acid composition in the striatum of Parkinson's disease mouse model. **J. Oleo Sci.**, v. 28, n.5, p. 554-567. 2013.

KARIMI-MOGHADAM, A. *et al.* Parkinson Disease from Mendelian Forms to Genetic Susceptibility: New Molecular Insights into the Neurodegeneration Process. **Cellular and Molecular Neurobiology**. v.38, p.1153–1178, 2018.

KARRI, M.; RAMASAMY, B.; KALIDOSS, R. Prevalence of non-motor symptoms in Parkinson's disease and its impact on quality of life in tertiary care center in India. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 23, n. 3, p. 270–274, 1 maio 2020.

KARTH, M. M. *et al.* Brain 5-HT Deficiency Prevents Antidepressant-Like Effects of High-Fat-Diet and Blocks High-Fat-Diet-Induced GSK3 β Phosphorylation in the Hippocampus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, 11 dez. 2019.

KAZMI, H. *et al.* Late onset depression: Dopaminergic deficit and clinical features of prodromal Parkinson's disease: A cross-sectional study. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 92, n. 2, p. 158-164, 1 fev. 2021.

KEENEY, P.M. *et al.* Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 19, p. 5256-5264, 2006.

KHOO, T.K. *et al.* The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. **Nat Rev Neurosci**, v.18, n. 7, p. 435-450, 2013.

KLANN, E. M. *et al.* The Gut–Brain Axis and Its Relation to Parkinson's Disease: A Review. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 13, 7 jan. 2022.

KMITA, L. C. *et al.* Absence of a synergic nigral proapoptotic effect triggered by REM sleep deprivation in the rotenone model of Parkinson's disease. **Brazilian Association of Sleep and Latin American Federation of Sleep Societies**. p. 196-202, 2019.

KORDOWER, J. H. *et al.* Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. **Nature Medicine**, v. 14, n. 5, p. 504-506, May 2008.

KOLDAMOVA, R.; FITZ, N. F.; LEFTEROV, I. ATP-binding cassette transporter A1: from metabolism to neurodegeneration. **Neurobiol. Dis.** v.72, Pt A, p.13-21. 2014.

KOZUKA, C. *et al.* Impact of brown rice-specific γ -oryzanol on epigenetic modulation of dopamine D2 receptors in brain striatum in high-fat-diet-induced obesity in mice. **Diabetologia**, v. 60, n. 8, p. 1502–1511, 1 ago. 2017.

KUTKIENE, S. *et al.* Cardiovascular risk assessment of dyslipidemic middle-aged adults without overt cardiovascular disease over the period of 2009-2016 in Lithuania. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, 11 out. 2018.

KWAN, B.C.W. *et al.* Lipoprotein Metabolism and Lipid Management in Chronic Kidney Disease. **J Am Soc Nephrol.**, v 18, p.1246 –1261, 2007.

LASKER, S. *et al.* High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

LE, W.; SAYANA, P.; JANKOVIC, J. Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics? **Neurotherapeutics**, n. 11, p. 92-110, 2014.

LEDOCHOWSKI, M. *et al.* Association between Increased Serum Cholesterol and Signs of Depressive Mood. **Clin Chem Lab Med**, v. 41, n.6, p. 821–824, 2003.

LEHTO, S. M. *et al.* Low serum HDL-cholesterol levels are associated with long symptom duration in patients with major depressive disorder. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 64, n. 3, p. 279–283, 2010.

LEI, S.; ZAVALA-FLORES, L.; GARCIA-GARCIA, A.; *et al.* Alterations in energy/redox metabolism induced by mitochondrial and environmental toxins: A specific role for glucose-6-phosphate-dehydrogenase and the pentose phosphate pathway in paraquat toxicity. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 9, p. 2032–2048, 2014.

LEWIS, A. R.; SINGH, S.; YOUSSEF, F. F. Cafeteria-diet induced obesity results in impaired cognitive functioning in a rodent model. **Heliyon**, v. 5, n. 3, p. 01-23, 2019.

LI, Y. *et al.* Dietary patterns and depression risk: A meta-analysis. **Psychiatry Research**, v.253, p. 373-382, 1 jul. 2017.

LIN, C. H.; CHANG, C. H.; TAI, C. H.; *et al.* A Double-Blind, Randomized, Controlled Trial of Lovastatin in Early-Stage Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 36, n. 5, p. 1229–1237, 2021.

LINETTI, A.; FRATANGELI, A.; TAVERNA, E.; VALNEGRI, P.; FRANCOLINI, M.; CAPPELLO, V. *et al.* Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. **J Cell Sci.** v. 123, p. 595-605, 2010.

LIU, T. *et al.* A meta-analysis of oxidative stress markers in depression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 7 out. 2015.

LIU, J. *et al.* Coenzyme Q10 for Parkinson's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v.12. 2011.

LIU, J.; MENG, F.; DAI, J.; et al. The BDNF-FoxO1 Axis in the medial prefrontal cortex modulates depressive-like behaviors induced by chronic unpredictable stress in postpartum female mice. **Molecular Brain**, v. 13, n. 1, 2020.

LUDKA, F. K. *et al.* Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 122, p. 253–260, 2014.

LUPPINO, F. S.; DE WIT, L. M.; BOUVY, P. F. *et al.* Overweight, Obesity, and Depression: A Systematic Review and Meta-analysis of Longitudinal Studies. **Arch Gen Psychiatry**, v. 67, n.3, p. 220–229, 2010.

MAGRI-TOMAZ, L. *et al.* Two weeks of high-fat feeding disturb lipid and cholesterol molecular markers. **Cell Biochemistry and Function**, v. 36, n. 7, p. 387–393, 1 out. 2018.

MAHLEY, R.W. Central nervous system lipoproteins: ApoE and regulation of cholesterol metabolism. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 7, p. 1305-1315, 1 jul. 2016a.

MANDEL, S. A. *et al.* Biomarkers for prediction and targeted prevention of Alzheimer's and Parkinson's diseases: Evaluation of drug clinical efficacy. **EPMA Journal**, n. 1, p. 273-292, jun. 2010.

MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Voluntary exercise and palatable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: Role of hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 10, p. 1553–1564, nov. 2010.

MARQUES, A.; DUTHEIL, F.; DURAND, E.; et al. Glucose dysregulation in Parkinson's disease: Too much glucose or not enough insulin? **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 55, p. 122–127, 2018

MARSH, L. Depression and Parkinson's disease: Current knowledge topical collection on movement disorders. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, n. 12, dez. 2013.

MARTINEZ-MARTIN, P. The importance of non-motor disturbances to quality of life in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**. v.316, p. 12–16, 2011.

MARWARHA, G.; RHEN, T.; SCHOMMER, T.; GHRIBI, O. The oxysterol 27-hydroxycholesterol regulates alpha-synuclein and tyrosine hydroxylase expression levels in human neuroblastoma cells through modulation of liver X receptors and estrogen receptors—relevance to Parkinson's disease. **J. Neurochem**. v.119, n.5, p. 1119-1136, 2011.

MASSANO, J.; BHATIA, K. Clinical approach to Parkinson's disease: Features, diagnosis, and principles of management. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 6, 2012.

MARTIN, M. G.; PFRIEGER, F.; AND DOTTI, C. G. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. **EMBO Rep**. v.15, 1036-1052, 2014.

MAYURASAKORN, K.; NIATSETSKAYA, Z. V.; SOSUNOV, S. A.; et al. DHA but not EPA emulsions preserve neurological and mitochondrial function after brain hypoxia-ischemia in neonatal mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.

MCMAHON, P. J. *et al.* Measurement of the glial fibrillary acidic protein and its breakdown products GFAP-BDP biomarker for the detection of traumatic brain injury compared to computed tomography and magnetic resonance imaging. **Journal of Neurotrauma**, v. 32, n. 8, p. 527-533, 15 abr. 2015.

MELES, S. K.; RENKEN, R. J.; PAGANI, M.; et al. Abnormal pattern of brain glucose metabolism in Parkinson's disease: replication in three European cohorts. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 47, n. 2, p. 437-450, 2020.

MENSENKAMP, A. R. *et al.* Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 50, p. 35711-35718, 10 dec. 1999.

MILANESCHI, Y. *et al.* Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. **Molecular Psychiatry**. v.24, p. 18-33, 2019.

MIRELMAN, A. *et al.* Gait impairments in Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 19, S1474-4422, 2019.

MOLSBERRY, S. *et al.* Diet pattern and prodromal features of Parkinson disease. **Neurology**, v. 95, n. 15, p. e2095-e2108, 2020.

MORENO-FERNÁNDEZ, S. *et al.* High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. **Nutrients**, v. 10, n. 10, 14 out. 2018.

MULAK, A.; BONAIZ, B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 37, p. 10609-10620, 7 out. 2015.

MUSUNURU, K. Atherogenic dyslipidemia: Cardiovascular risk and dietary intervention. **Lipids**. v.45, p. 907-914, 2010.

MUTEZ, E. *et al.* Lipid-lowering drugs are associated with delayed onset and slower course of Parkinson's disease. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 1, p. 41-45, 2009.

NALLS, M. A. *et al.* Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. **Articles Lancet Neurol**. v.18, 2019.

NELSON, R. H. Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. **Primary Care - Clinics in Office Practice**. v.40, n.1, p. 195-211, mar. 2013.

NILSSON, C.; RAUN, K.; YAN, F.; LARSEN, M. O.; TANG-CHRISTENSEN, M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. **Acta Pharmacol Sin.** V. 33, p. 173–181, 2012.

OBESO, J. A; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M. et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 10, Suppl, p. S8–S19, 2000.

O'NEILL, S.; O'DRISCOLL, L. Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. **Obesity Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 2015.

ONG, K. L. *et al.* Lipids, lipoprotein distribution and depressive symptoms: The multi-ethnic study of atherosclerosis. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 11, 2016.

PAGANO, G.; POLYCHRONIS, S.; WILSON, H.; et al. Diabetes mellitus and Parkinson disease. *Neurology*, v. 90, n. 19, p. E1654–E1662, 2018.

PAJARES, M. *et al.* Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. **Cells**, v. 9, n. 7, 14 jul. 2020.

PAN-MONTOJO, F. *et al.* Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 19 jan. 2010.

PANOV, A.; DIKALOV, S.; SHALBUYEVA, N.; et al. Rotenone model of Parkinson disease: Multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 51, p. 42026–42035, 2005.

PAPAIOANNOU, I.; SIMONS, J. P.; OWEN, J. S. Targeted In Situ Gene Correction of Dysfunctional APOE Alleles to Produce Atheroprotective Plasma ApoE3 Protein. **Cardiol Res Pract.** p. 148796, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356902/>. Acesso em 14/02/2022.

PAREKH, A. *et al.* The role of lipid biomarkers in major depression. **Healthcare (Switzerland)**, v.5, n.1, 1 mar. 2017.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 223-236, 1817.

PASLAWSKI, W. *et al.* α -synuclein–lipoprotein interactions and elevated ApoE level in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 30, p. 15226–15235, 23 jul. 2019.

PAUL, R.; CHOUDHURY, A.; BORAH, A. Cholesterol - A putative endogenous contributor towards Parkinson's disease. **Neurochem. Int.**, v.90, p.125-133, 2015.

PAUMIER, K.L. *et al.* Tricyclic antidepressants delay the need for dopaminergic therapy in early Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 27, n. 7, p. 880-887, 2012.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 3 ed. Orlando: Academic Press, 1997.

PEGG, C. C. *et al.* Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 187, n. 1, p. 8-12, mar. 2010.

PELLICANO, D.; BENINCASA, V.; PISANI, F.; BUTTARELLI, M.; GIOVANNELLI, F.; PONTIERI, C.R. *et al.* Prodromal non-motor symptoms of Parkinson's disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.3, n.1, p. 145-152, feb 2007.

PÉREZ-TABOADA, I.; ALBERQUILLA, S.; MARTÍN, E. D.; *et al.* Diabetes Causes Dysfunctional Dopamine Neurotransmission Favoring Nigrostriatal Degeneration in Mice. **Movement Disorders**, v. 35, n. 9, p. 1636–1648, 2020.

PERIER, C.; VILA, M. Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 2, 2012.

PFRIEGER, F. W. Neurodegenerative Diseases and Cholesterol: Seeing the Field Through the Players. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v.13, 2021.

PIATKOWSKA-CHMIEL, I.; HERBET, M.; GAWROŃSKA-GRZYWACZ, M.; DUDKA, J. Regulation of Neuroinflammatory Signaling by PPAR γ Agonist in Mouse Model of Diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, 2022.

PICCA, A. *et al.* Mitochondrial dysfunction, protein misfolding and neuroinflammation in parkinson's disease: Roads to biomarker discovery. **Biomolecules**. MDPI, v.11, 1 out. 2021.

PINTO, M.; NISSANKA, N.; PERALTA, S.; *et al.* Pioglitazone ameliorates the phenotype of a novel Parkinson's disease mouse model by reducing neuroinflammation. **Molecular Neurodegeneration**, v. 11, n. 1, 2016.

PIRILLO, A. *et al.* Global epidemiology of dyslipidaemias. **Nature Reviews Cardiology**, v.18, n.10, p. 689-700, 2021.

PLIAKAS, A. M.; CARLSON, R. R.; NEVE, R. L.; KONRADI, C.; NESTLER, E.J.; POEWE, Werner *et al.* Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1-21, 23 mar. 2017.

POEWE, W. *et al.* Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1-21, 23 mar. 2017.

PORSOLT, R. D.; LE, P. M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**. 266, 730-732, 1977.

PORSOLT, R. D. *et al.* Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 371-379, 1978.

POSTUMA, R.B. *et al.* Identifying prodromal Parkinson's disease: Pre-Motor disorders in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 27, n. 5, p. 617-626, 15 apr. 2012.

POSTUMA, R. B.; BERG, D.; STERN, M. *et al.* MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Mov Disord**. v.30, p.1591-60, 2015.

POSTUMA, R. B. *et al.* MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Movement Disorders**. v.30, n.12, p.1591-1599, 1 oct. 2015.

POSTUMA, Ronald B.; BERG, Daniela. Advances in markers of prodromal Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology**. v.12, 1 nov. 2016.

POWERS, K.M. *et al.* Dietary fats, cholesterol and iron as risk factors for Parkinson's disease. **Parkinsonism Related Disorders**, v.15, p.47-52, 2009.

PRINGSHEIM, T. *et al.* The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**. v.29, n.13, 2014.

QUAN, G.; XIE, C.; DIETSCHY, J. M.; TURLEY, S. D. Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. **Brain Res Dev Brain Res**. n.146, p. 87-98, 2003.

QUELHAS, R. Psychiatric care in Parkinson's disease. **Journal of Psychiatric Practice**. v.19, n.2, mar. 2013.

RAJU, A.; JAISANKAR, P.; BORAH, A.; MOHANAKUMAR, K. P. 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Death of Differentiated SH-SY5Y Neurons Is Potentiated by Cholesterol. **Annals of Neurosciences**, v. 24, n. 4, p. 243–251, 2018.

RAMALHO, L. *et al.* Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulin-resistant animal model. **Nutrition and Diabetes**, v. 7, n. 3, 13 mar. 2017.

REICHMANN, H.; SCHNEIDER, C.; LÖHLE, M. Non-motor features of Parkinson's disease: depression and dementia. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15, n. suppl. 3, dez. 2009.

REKTOROVÁ, I. *et al.* Pramipexole and pergolide in the treatment of depression in Parkinson's disease: a national multicentre prospective randomized study. **European Journal of Neurology**, v.10, p. 399-406, 2003.

RÉNÉRIC, J.-P.; BOUVARD, M.; STINUS, L. In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. **Behav. Brain Res**. v.136, n.2, p.521-532.

ROBERTSON, S. H.; BOOMHOWER, S. R.; RASMUSSEN, E. B. High-fat diet alters weight, caloric intake, and haloperidol sensitivity in the context of effort-based responding. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 323–333, 7 fev. 2017.

RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D. S.; NOSEDA, A. C. D.; *et al.* Olfactory impairment in the rotenone model of parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, 2014.

ROMIEU, I. *et al.* Energy balance and obesity: what are the main drivers? **Cancer Causes and Control**, v. 28, n. 3, p. 247-258, 1 mar. 2017.

ROSINI, T.C. *et al.* Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Rev Assoc Med Bras**, v. 58, n.3, p.383-38, 2012.

ROY, A. *et al.* Sodium phenylbutyrate controls neuroinflammatory and antioxidant activities and protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 18 jun. 2012.

ROY, A.; PAHAN, K. Prospects of statins in Parkinson disease. **Neuroscientist**, v. 17, n. 3, p. 244-255, jun. 2011.

SAHER, G.; BRÜGGER, B.; LAPPE-SIEFKE, C. *et al.* High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. **Nat Neurosci**. 8:468-475, 2005.

SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J.M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.3, n.1, p.1-4, 3 jan. 2017.

SAMPEY, B. P. *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. **Obesity**, v. 19, n. 6, p. 1109–1117, jun. 2011.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, A.; DÍAZ, Y.; DUARTE-SALLES, T.; COMPTA, Y.; MARTÍ, M. J. Prediabetes, type 2 diabetes mellitus and risk of Parkinson's disease: A population-based cohort study. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 89, p. 22–27, 2021.

SAMPSON, T. R. *et al.* Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1469-1480.e12, 1 dec. 2016.

SANDERS, L.H.; GREENAMYRE, J.T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson's disease and the rotenone model. **Free Radic Biol Med**. v.62, p. 111–120, 2013.

SARAVANAN, K. S.; SINDHU, K. M.; MOHANAKUMAR, K. P. Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1049, n. 2, p. 147–155, 2005.

SARCHIONE, A.; MARCHAND, A.; TAYMANS, J. M.; CHARTIER-HARLIN, M. C. Alpha-synuclein and lipids: The elephant in the room? **Cells**, v. 10, n.9, 2021.

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**. V.18, p. 435-450, 2017.

SCHERNHAMMER, E.; HANSEN, J.; RUGBJERG, K.; WERMUTH, L.; RITZ, B. Diabetes and the risk of developing Parkinson's disease in Denmark. **Diabetes Care**, v. 34, n. 5, p. 1102–1108, 2011.

SCHMIDT, F. M. *et al.* Cytokine levels in depressed and non-depressed subjects, and masking effects of obesity. **Journal of Psychiatric Research**, v. 55, n. 1, p. 29-34, 2014.

SCHUURMAN, A. G *et al.* Increased risk of Parkinson's disease after depression: A retrospective cohort study. **Neurology**. v. 58, p. 1501-1504, 2002.

SEGOVIANO-MENDOZA, M. *et al.* Hypocholesterolemia is an independent risk factor for depression disorder and suicide attempt in Northern Mexican population. **BMC Psychiatry**, v. 18, n. 1, 15 jan. 2018.

SEPPI, K. *et al.* Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease—an evidence-based medicine review. **Movement Disorders**, v.34, n.2, p. 180-198, 2019.

SHI, Y. *et al.* ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. **Nature**, v. 549, n. 7673, p. 523-527, 28 set. 2017.

SIMON, D.K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. **Clinics in Geriatric Medicine**. v.36, n.1, p.1–12, 1 fev. 2020.

SLATTERY, D. S.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nat Protoc**, v. 7, p. 1009-1014, 2012.

SMEYNE, M.; SMEYNE, R.J. Glutathione metabolism and Parkinson disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 62, p. 13-25, 2013.

STEINER, J. A.; QUANSAH, E.; BRUNDIN, P. The concept of alpha-synuclein as a prion-like protein: ten years after. **Cell and Tissue Research**. v. 373, n.1, p. 161–173, 2018.

STANAWAY, J. D. *et al.* Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1923-1994, nov. 2018.

STONE, N. J. Diet, lipids and heart coronary disease. **Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.** v. 19, n. 2, p. 321-344, 1990.

STRIKWERDA, A. J. *et al.* Diet quality and risk of parkinson's disease: The Rotterdam Study. **Nutrients**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2021.

SULLIVAN, G. M.; FEINN, R. Using Effect Size—or Why the P Value Is Not Enough . **Journal of Graduate Medical Education**, v. 4, n. 3, p. 279–282, 2012.

SY, M. A.C.; FERNANDEZ, H.H. Pharmacological Treatment of Early Motor Manifestations of Parkinson Disease (PD). **Neurotherapeutics**. v.17, n.4, p.1331-1338, 2020.

SWANSON, C. R.; BERLYAND, Y.; XIE, S. X.; et al. Plasma apolipoprotein A1 associates with age at onset and motor severity in early Parkinson's disease patients. **Movement Disorders**, v. 30, n. 12, p. 1648–1656, 2015.

SWANSON, C. R.; LI, K.; UNGER, T. L.; et al. Lower plasma apolipoprotein A1 levels are found in Parkinson's disease and associate with apolipoprotein A1 genotype. **Movement Disorders**, v. 30, n. 6, p. 805–812, 2015.

SWARNKAR, S.; SINGH, S.; MATHUR, R.; PATRO, I. K.; NATH, C. A study to correlate rotenone induced biochemical changes and cerebral damage in brain areas with neuromuscular coordination in rats. **Toxicology**, v. 272, n. 1–3, p. 17–22, 2010.

TABAS, I.; GARCIA-CARDEÑA, G.; OWENS, G.K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. **The Cell Biology Of Disease**, v. 209, n.1, p. 13-22, apr 2015.

TAKEDA, M. *et al.* Apolipoprotein e and central nervous system disorders: Reviews of clinical findings. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**. v. 64, n.6, p. 592-607, 2010.

TANNER, C.M. *et al.* Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 6, p. 866-872, jun. 2011.

TEIVE, H.A.G *et al.* As contribuições de Charcot e de Marsden para o desenvolvimento dos distúrbios do movimento nos séculos XIX e XX. **Arq Neuropsiquiatr**. v. 59, n.3A 2001.

TESSITORE, A.; CIRILLO, M.; DE MICCO, R. Functional Connectivity Signatures of Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**. v.9, n. 4, p. 637-652, 2019.

TESTA, C. M.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. **Molecular Brain Research**, v. 134, n. 1, p. 109–118, 2005.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, set. 2011.

TIZABI, Y.; GETACHEW, B.; ASCHNER, M. Novel Pharmacotherapies in Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research**, v. 39, n.4, p. 1381-1390, 2021.

TOLOSA, E. *et al.* Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 20, n.5, p. 385–397, 2021.

TROPEA, T. F.; XIE, S. X.; RICK, J.; et al. APOE, thought disorder, and SPARE-AD predict cognitive decline in established Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 33, n. 2, p. 289–297, 2018.

TSAL, S.F. *et al.* High-fat diet induces depression-like phenotype via astrocyte-mediated hyperactivation of ventral hippocampal glutamatergic afferents to the nucleus accumbens. **Molecular Psychiatry**, v. 27, n. 11, p. 4372-4384, 1 nov. 2022.

TZIORAS, M. *et al.* Invited Review: APOE at the interface of inflammation, neurodegeneration and pathological protein spread in Alzheimer's disease. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. v.45, p. 327–346, 2019.

TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, 1. ago. 2017.

VAGENA, E. *et al.* A high-fat diet promotes depression-like behavior in mice by suppressing hypothalamic PKA signaling. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, 1 dec. 2019.

VANCE, J. E. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: Contribution to neurodegenerative diseases. **DMM Disease Models and Mechanisms**. v.5, p.746-755, 2012.

VANCE, J.E. Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells. **Traffic**. v.16, p.1-18, 2015.

VITALI, C.; WELLINGTON, C. L.; CALABRESI, L. HDL and cholesterol handling in the brain. **Cardiovascular Research**, v.103, n.3, p. 405-413, 1 ago. 2014.

VOLTA, M.; MILNERWOOD, A. J.; FARRER, M. J. Insights from late-onset familial parkinsonism on the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v.14, n. 10, p. 1054-1064, 2015.

WAGER-SMITH, K.; MARKOU, A. Depression: A repair response to stress-induced neuronal microdamage that can grade into a chronic neuroinflammatory condition? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.35, n.3, p. 742-64,2011.

WALKER, C. D. *et al.* Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: A potential role for leptin. **Ann N Y Acad Sci.**, p. 189–202, 2008.

WANG, J. *et al.* Biomarkers of Parkinson's disease: Current status and future perspectives. **Drug Discovery Today**, v.18, n.3-4, p. 155–162, 2013.

WANG, K. *et al.* Blood Cholesterol Decreases as Parkinson's Disease Develops and Progresses. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 11, n. 3, p. 1177-1186, 2021.

WILHELMUS, M. M. M.; BOL, J. G. J. M.; VAN HAASTERT, E. S.; *et al.* Apolipoprotein e and LRP1 increase early in Parkinson's disease pathogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 5, p. 2152–2156, 2011.

WILLIAMS, E. P. *et al.* Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. **Current obesity reports**, v. 4, n.3, p. 363-70, 2015.

WOLOZIN, B.; WANG, S. W.; LI, N. C.; *et al.* Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. **BMC Medicine**, v. 5, 2007.

WOLSKA, A.; REMALEY, A. T. Measuring LDL-cholesterol: what is the best way to do it? **Current opinion in cardiology**, v.35, n.4, p. 405-411, 2020.

WU, P. L.; LEE, M.; HUANG, T. T. Effectiveness of physical activity on patients with depression and Parkinson's disease: A systematic review. **PLoS ONE**, v.12, n.7,2017.

WU, H. Normal diet Vs High fat diet - A comparative study: Behavioral and neuroimmunological changes in adolescent male mice. **Metabolism Brain Disease**, v.33, p. 177–190, 2018.

XIA, Q. *et al.* Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies. **Front Biosci.**, v. 13, p. 3850–3856, 2009.

XIONG, N. *et al.* Stereotaxical infusion of rotenone: A reliable rodent model for Parkinson's disease. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, 18 nov. 2009.

ZANELLATI, M. C.; MONTI, V.; BARZAGHI, C.; *et al.* Mitochondrial dysfunction in Parkinson disease: Evidence in mutant PARK2 fibroblasts. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 78, 2015.

ZEMDEGS, J. *et al.* Themed Section: Updating Neuropathology and Neuropharmacology of Monoaminergic Systems High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, p. 2095, 2016. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.v173.13/www.brijpharmacol.org>.

ZENG, X. S.; GENG, W. S.; JIA, J. J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN Neuro.** v. 10: 1759091418777438, 2018.

ZHANG, J.; LIU, Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. **Protein and Cell**, v. 6, n. 4, p. 254-264, 1 abr. 2015.

ZHANG, R. *et al.* Factors Influencing Alzheimer's Disease Risk: Whether and How They are Related to the APOE Genotype. **Neuroscience Bulletin**. v. 38, n.7, p. 809–819, 2022.

ZHAO, N. *et al.* APOE4 exacerbates α -synuclein pathology and related toxicity independent of amyloid. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 529, 5 fev. 2020.

ZHOU, X. *et al.* Astrocyte, a promising target for mood disorder interventions. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v.12, n.136, 2019.

ZY'SK, B. *et al.* Molecular Sciences Salivary Adipokine and Cytokine Levels as Potential Markers for the Development of Obesity and Metabolic Disorders. **Int. J. Mol. Sci**, v. 22, n.21, p. 11703, 2021.

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO PROJETO NO CEUA-UFPR



Ministério da Educação
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
 PARANÁ**
 Setor de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética no Uso de
 Animais(CEUA)



Nº 1216

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.055512/2018-72

APROVADO/APPROVAL: 30/10/2018 – R.O. 09/2018

TÍTULO: Importância das lipoproteínas plasmáticas como biomarcadores precoces da doença de Parkinson.

TITLE: Importance of plasma lipoproteins as early biomarkers of Parkinson`s disease.

AUTORES/AUTHORS: Marcelo de Meira Santos Lima, Ana Paula Chuproski.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA