



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JESSICA ILKIW LOPES

INFLUÊNCIA DA NEUROINFLAMAÇÃO SOBRE A OLFAÇÃO EM MODELO  
ANIMAL DE PARKINSON

CURITIBA  
2023

JESSICA ILKIW LOPES

INFLUÊNCIA DA NEUROINFLAMAÇÃO SOBRE A OLFAÇÃO EM MODELO  
ANIMAL DE PARKINSON

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Fisiologia, no Programa de Pós graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima  
Co-orientadora: Dra Lais Soares Rodrigues

CURITIBA  
2023

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

Lopes, Jessica Ilkiw.

Influência da neuroinflamação sobre a olfação em modelo animal de Parkinson.  
/ Jessica Ilkiw Lopes. – 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. Transtornos do Olfato. 3. Dopaminérgicos. 4. Doenças Neuroinflamatórias. 5. Proteína Glial Fibrilar Ácida. I. Lima, Marcelo de Meira Santos, 1978-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA -  
40001016072P4

## 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 **JESSICA ILKIW LOPES** intitulada: **INFLUÊNCIA DA NEUROINFLAMAÇÃO SOBRE A OLFAÇÃO EM MODELO ANIMAL 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, 30 de Maio de 2023.

Assinatura Eletrônica  
30/05/2023 15:37:46.0  
MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
02/06/2023 11:39:08.0  
GUSTAVO ZAMPIER DOS SANTOS LIMA  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE)

Assinatura Eletrônica  
31/05/2023 10:15:41.0  
KATYA NALIWAIKO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
31/05/2023 09:58:23.0  
FABIOLA IAGHER  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*“Não quero sonhos com hora marcada pra acabar  
Prefiro essas histórias imperfeitas pra contar”*

Lucas Silveira - O Resto É Nada Mais (o Sonho de Um Visconde).

## AGRADECIMENTOS

À pessoa mais importante da minha vida, minha avó Juvelina. Pelo amor incondicional, pelo incentivo, pela ótima criação, pelo senso de certo e errado, pelos mais valiosos ensinamentos, por todos os momentos da minha vida, eu sempre lhe serei eternamente grata pois você representou o maior amor. “Não vou esquecer, vou te celebrar”. Te vejo em todos os seus filhos, netos e bisnetos, te vejo em mim. Te amo eternamente e sinto a sua falta todos os dias.

Aos meus pais, Kelly e Elio, pela vida, pelo amor, pelo apoio, por estarem aqui, por serem meus exemplos, cada um à sua maneira. Vocês são incríveis e fizeram o melhor que puderam sempre. Amo vocês, obrigada por tudo. Ao meu irmão, Erick, por estar sempre comigo, por ter vivido todas as situações da vida ao meu lado (não que tivéssemos muita escolha haha, mas aprendi que as coisas são melhores quando divididas contigo), por me ensinar muito, me motivar, por rir comigo, por ser a minha fonte maior de orgulho e admiração. Por ter crescido e me permitido participar disso, por ter se tornado esse ser humano incrível e que conquistará absolutamente tudo o que almejar, te amo.

Ao meu “namorado”, André. Por me compreender, me apoiar, estar ao meu lado nos piores e nos melhores momentos, por não me julgar, por confiar em mim desde o dia 1, por me ensinar o que é confiar em alguém. Te conhecer talvez tenha sido a melhor coisa que já me aconteceu e eu sinceramente não sei se mereço tanto, mas serei eternamente grata por estar aqui e por me amar, me respeitar e me curar, de certa maneira. Dizem que lar é onde o coração está, você é o meu lar.

Às minhas melhores amigas, Valéria, Ana Comelli, Leticia, Bianca, Georgia, Lais, Luana, Gabrielle, Kamila, Thamires, Juliana e Ana Nogarolli. Obrigada por serem exatamente quem são, por estarem comigo, por não soltarem a minha mão mesmo quando as coisas ficam difíceis, por me entenderem e por crescerem e mudarem comigo. Agradeço ao universo por estarmos no mesmo momento de existência e pelo nosso encontro de almas. Palavras jamais descreveriam tudo o que vocês representam.

Ao meu orientador, prof. Marcelo de Meira Santos Lima, por todos esses anos de ensinamento, por me aceitar como sua aluna de mestrado em 2015 e confiado numa jovem de 22 anos recém formada de outra universidade. Por ser um pesquisador exemplar e incansável, por ser um excelente professor e orientador. Mas, mais do que tudo, por ser um ser humano extremamente empático, preocupado e compreensivo. Agradeço muito por todo aprendizado ao longo destes quase 8 anos de convivência e pela confiança depositada em mim nesse período, por nunca me deixar desistir dos meus objetivos e por ser uma inspiração profissional não só para mim mas para todos os alunos que te conhecem.

Aos meus incomparáveis colegas de laboratório e amigos: Adriano, Lais, Patricia, Juliane, Evellyn, Flavia e Ana Paula. Não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês me ensinaram e por toda ajuda não só durante os experimentos, mas também na carreira e na vida. Agradeço muito por termos sido extremamente unidos e pela maneira como sempre fomos capazes de erguer e enaltecer uns aos

outros. Obrigada pelos anos de convivência, pelos conselhos trocados e pela amizade insubstituível. Trabalhar com vocês todos os dias era minha melhor alegria e nos tornamos amigos fez tudo valer ainda mais a pena. Quero vocês na minha vida pra sempre. Ju e Adriano, logo logo eu visito vocês! Amo e admiro todos vocês, minhas ariranhas, capybaras, meus tchokos e xambos, meu eterno lab “cérebro”.

À minha psicóloga, Gabriela Martim, por me acompanhar desde 2018 nessa trajetória do doutorado e da vida. Por me auxiliar e ajudar a me entender, por contribuir com meu diagnóstico, por não desistir mesmo quando ficou muito difícil. Serei eternamente grata.

Agradeço aos alunos de iniciação científica do laboratório de neurofisiologia, Jessica, Gustavo, Max, Hannan, Daniel, Jaqueline e Kamilly por toda a ajuda durante a execução do projeto. Aos meus alunos do curso técnico profissionalizante em análises clínicas que ao longo de 5 anos me permitiram compartilhar meu conhecimento e que também me ensinaram muito.

Aos professores do departamento de Fisiologia, em especial à prof<sup>a</sup> Fabíola Iagher e ao prof. Fernando Louzada, por acompanharem de perto o desenvolvimento do projeto. À todos os profissionais que contribuíram para minha formação. Aos funcionários do biotério e aos técnicos do departamento, em especial ao Fabio Roberto Caetano, pelo auxílio e pela amizade.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido ao projeto.

E por fim, a todas as pessoas não pessoalmente nomeadas mas que também compõem este trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente na população mundial, sendo caracterizada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc). Sabe-se que a neuroinflamação está diretamente relacionada ao surgimento e progressão da DP, sendo associada à diminuição da neurogênese adulta em seus locais de ocorrência, zona subgranular do hipocampo e zona subventricular (ZSV), uma vez que a administração de anti-inflamatórios foi capaz de promover melhora do quadro. Durante os estágios iniciais da DP estão presentes distúrbios não-motores como alterações olfatórias, de sono (principalmente de sono REM) e sinais e sintomas depressivos como apatia e anedonia. Detectamos, em estudo prévio, que a diminuição dos neurônios da camada glomerular do bulbo olfatório (BO) por lesão local de 6-OHDA foi capaz de reverter o prejuízo olfatório em modelo animal de parkinsonismo ao apresentar redução dos neurônios periglomerulares. Frente a este dado, o objetivo do presente estudo foi investigar a neuroinflamação e seus possíveis efeitos sobre olfação em modelo de lesão dupla (intranigral e intrabulbar) com a neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) através de testes comportamentais de reconhecimento olfatório e reconhecimento social, análise neuroinflamatória através da quantificação de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) por Western Blot de BO e SNpc. O resultado do teste de reconhecimento olfatório não corroborou dados prévios do laboratório obtidos nos mesmos grupos. Desse modo, a exploração ativa do ambiente estimulada pela preferência ao odor demonstrou-se prejudicada em todos os casos de lesão aguda. Porém em 14 dias observou-se o comportamento de tendência limítrofe para a diferença de exploração no grupo com a dupla lesão. Em relação ao teste de reconhecimento social não houve diferenças significativas entre os grupos lesionados e o controle nas duas timelines, sugerindo que o prejuízo olfatório no modelo se deve a alterações de detecção do olfato e não a memória olfatória. Já para análise de GFAP no BO não observamos diferenças significativas entre os grupos ou linhas do tempo para alfa-GFAP enquanto para beta foi observado um aumento no grupo com a lesão somente na SNpc comparado ao com a dupla lesão. Na SNpc foi observado um aumento significativo no grupo somente com a lesão no bulbo em relação a todos os outros grupos, 7 dias após a cirurgia. Assim, observamos o interessante papel da neuroinflamação sobre o prejuízo olfatório de animais modelo de parkinsonismo.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, distúrbios olfatórios, sistema dopaminérgico, neuroinflamação, GFAP.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease in the world population, being characterized by the degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc). It is known that neuroinflammation is directly related to the onset and progression of PD, being associated with a decrease in adult neurogenesis in its sites of occurrence, subgranular zone of the hippocampus and subventricular zone (SVZ), since the administration of anti-inflammatory drugs was able to promote improvement of the picture. During the initial stages of PD, non-motor disturbances are present, such as olfactory and sleep disorders (mainly REM sleep) and depressive signs and symptoms such as apathy and anhedonia. In a previous study, we detected that the reduction of neurons in the glomerular layer of the olfactory bulb (BO) by local 6-OHDA injury was capable of reversing the olfactory impairment in an animal model of parkinsonism by presenting a reduction in periglomerular neurons. In view of this data, the aim of the present study was to investigate neuroinflammation and its possible effects on olfaction in a model of double lesion (intranigral and intrabulbar) with the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) through behavioral tests of olfactory recognition and olfactory recognition. social, neuroinflammatory analysis through the quantification of glial fibrillary acidic protein (GFAP) by Western Blot of BO and SNpc. The result of the olfactory recognition test did not corroborate previous laboratory data obtained in the same groups. Thus, the active exploration of the environment stimulated by preference for odor was impaired in all cases of acute injury. Regarding the social recognition test, there were no significant differences between the injured and control groups in the two timelines, suggesting that the olfactory impairment in the model is due to changes in smell detection and not olfactory memory. As for the analysis of GFAP in BO, we did not observe significant differences between groups or timelines for alpha-GFAP, while for beta an increase was observed in the group with the lesion only in the SNpc compared to the group with the double lesion. In SNpc, a significant increase was observed in the group with only the bulb lesion in relation to all other groups, 7 days after surgery. Thus, we observed the interesting role of neuroinflammation on the olfactory impairment of parkinsonism model animals.

Keywords: Parkinson's disease, olfactory disorders, dopaminergic system, neuroinflammation, GFAP.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina – Serotonina  
6-OHDA – 6-hidroxidopamina  
AINE's – Anti-inflamatórios não esteroidais  
BO – Bulbo olfatório  
DA – Dopamina  
DAT – Transportador de dopamina  
DP – Doença de Parkinson  
EPI – Camada plexiforme externa do bulbo olfatório  
GABA – Ácido gama-aminobutírico  
GFAP – proteína ácida fibrilar glial  
Gl – Camada glomerular  
LC – *Locus coeruleus*  
MPP+ - 1-metil-4-phenylpyridinium  
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
NA - Noradrenalina  
OBX- Bulbectomia Olfatória Bilateral  
REM – Movimentos oculares rápidos  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
SN – Substância negra  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SNpc – Substância negra pars compacta  
TDO – Tarefa de discriminação olfatória  
TRO – Teste de Reconhecimento Olfatório  
TRS – Teste de Reconhecimento Social  
TH – Tirosina hidroxilase  
TH-ir – Neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase  
VTA – Área tegmental ventral

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.....	16
Figura 2.....	18
Figura 3.....	20
Figura 4.....	23
Figura 5.....	24
Figura 6.....	27
Figura 7.....	31
Figura 8.....	32
Figura 9.....	33
Figura 10.....	34
Figura 11.....	37
Figura 12.....	38
Figura 13.....	39
Figura 14.....	40
Figura 15.....	42
Figura 16.....	43
Figura 17.....	45
Figura 18.....	47
Figura 19.....	49
Figura 20.....	50

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1. DOENÇA DE PARKINSON.....	11
1.2. ETIOLOGIA DA DP.....	12
1.2.1. Estresse Oxidativo.....	12
1.2.2. Excitotoxicidade.....	13
1.2.3. Fatores Genéticos e Ambientais.....	14
1.2.4. Neuroinflamação.....	14
1.3. MODELOS ANIMAIS NA PD.....	15
1.4. FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON.....	17
1.4.1. Prejuízo Olfatório na DP.....	21
1.5. NEUROINFLAMAÇÃO E DISTÚRBO OLFATÓRIO NA DP.....	25
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1. ANIMAIS.....	29
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.2.1. Padronização do Teste de Reconhecimento Olfatório.....	30
4.2.2. Delineamento dos grupos experimentais principais.....	30
4.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	34
4.4. MICROINFUSÃO DE 6-OHDA NO BULBO OLFATÓRIO.....	35
4.5. ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE ACETATO DE ZINCO + GLUCONATO DE ZINCO (ZICAM®).....	36
4.6. TESTE DE RECONHECIMENTO OLFATÓRIO.....	36
4.7. TESTE DE RECONHECIMENTO SOCIAL MODIFICADO.....	38
4.8. ANÁLISE DA PROTEÍNA GFAP POR WESTERN BLOT.....	40
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE RECONHECIMENTO OLFATÓRIO (TRO)..	41
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS PRINCIPAIS.....	43
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>73</b>
7.1 ARTIGO CIENTÍFICO METODOLÓGICO.....	73
7.2 ARTIGO CIENTÍFICO DE COLABORAÇÃO.....	85
<b>8. MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>94</b>
8.1 PADRONIZAÇÃO DO WESTERN BLOT PARA GFAP.....	94
8.2 TESTES DE NORMALIDADE.....	96

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada por uma neurodegeneração progressiva e crônica, com uma taxa de incidência de 4,5-19 casos a cada 100.000 habitantes por ano (WHO, 2006) sendo a segunda doença neurodegenerativa progressiva mais prevalente (MHYRE *et al.*, 2012; DELAMARRE & MEISSNER, 2017). O aumento da idade é o maior fator de risco, afligindo cerca de 1% das pessoas com mais de 65 anos de idade e 4-5% das pessoas acima de 85 anos de idade (LANG & LOZANO, 1998; HIRSCH *et al.*, 2016). A incidência é 1,8 vezes maior em homens do que mulheres (WIRDEFELDT *et al.* 2011 *apud* MHYRE *et al.* 2012) e no Brasil – país que está em transição demográfica, apresentando diminuição da taxa de natalidade e aumento na longevidade (BOVOLENTA & FELICIO, 2017) – não há um número oficial sobre incidência da doença. Porém, um estudo aponta a prevalência de 3,3% da população acima de 65 anos (BARBOSA *et al.*, 2006) – o que hoje representaria 630 mil pessoas (desconsiderando a população ≤64 anos) (BOVOLENTA & FELICIO, 2017).

A DP foi primeiramente descrita pelo médico britânico James Parkinson, em seu mais famoso artigo, “An essay on the shaking palsy”, de 1817, que a denominou “paralisia agitante”, já descrevendo os sinais motores clássicos como bradicinesia, rigidez, tremor de repouso e instabilidade postural (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). A mudança do nome para DP foi sugerida por Charcot, em homenagem a descrição clássica de James Parkinson (TEIVE & MENEZES, 2003). Arvid Carlsson e colaboradores (1957) identificaram a dopamina como o neurotransmissor mais abundante nos gânglios basais e propuseram que a DP resultaria de depleção dopaminérgica, sendo essa hipótese demonstrada em estudos posteriores (CARLSSON *et al.* 1957; BERTLER & ROSENGREN, 1959). Além disso, foi descoberto que a reposição de dopamina por seu precursor levodopa (L-DOPA) ameniza os distúrbios motores (BIRKMAYER & HORNYKIEWICZ, 1961) – sendo utilizado até os dias de hoje (MHYRE *et al.* 2012). Entretanto, em função da cronicidade do tratamento com levodopa, observaram-se quadros de discinesia

tardia manifestadas pelos pacientes, o que nos permite afirmar que este fármaco somente ameniza os sintomas motores, mas não impede a evolução da neurodegeneração – além de não possuir efeito sobre sintomas não motores relacionados à DP (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

## 1.2. ETIOLOGIA DA DP

Menos de 10% dos casos da DP podem ser diretamente ligados às mutações genéticas (monogênicas e/ou heterogênicas). Assim, fatores ambientais ou a combinação destes com possíveis susceptibilidades genéticas têm sido propostos como a possível causa da DP esporádica (TIEU, 2011). Desse modo, essa é vista como uma doença complexa, com múltiplos fatores genéticos e fatores de riscos ambientais associados (MHYRE *et al.* 2012). As causas específicas por trás da deflagração dos processos de degeneração que levam à doença são alvos de grande investigação na literatura (OSSOWSKA and LORENC-KOCI, 2013). Há evidências de que estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, alterações conformacionais de proteínas, perturbações da homeostase intracelular de cálcio e ferro, além de polimorfismos em genes que regulam o metabolismo e o transporte de dopamina (DA), neuroinflamação e necrose/apoptose sejam possíveis fatores patológicos que desencadeiam a DP (LEWY *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2012).

### 1.2.1. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo define um desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas e a capacidade de um sistema biológico para desintoxicar os intermediários reativos, criando um estado que contribui para danos celulares (DIAS *et al.*, 2013). Diversos estudos indicam que o dano oxidativo e a disfunção mitocondrial contribuem para a cascata de eventos que levam à degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, responsável pelos sinais motores e não-motores da DP (SCHAPIRA and JENNER, 2011; ZHU and CHU, 2010; PARKER *et al.*, 2008; JENNER and OLANOW, 2006; BEAL, 2005).

São reconhecidas várias fontes e mecanismos para a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o metabolismo da dopamina, disfunção mitocondrial, ferro, neuroinflamação, cálcio e envelhecimento. Adicionalmente, os processos homeostáticos celulares incluindo o sistema de ubiquitina-proteassoma e a mitofagia são afetados pelo estresse oxidativo (DIAS *et al.*, 2013). A interação entre esses vários mecanismos contribui para a neurodegeneração na DP como um cenário de retroalimentação positiva onde os danos primários levam ao estresse oxidativo, que danifica as principais proteínas patogênicas celulares que, por sua vez, causam mais produção de ROS (KIM *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2013).

### 1.2.2. Excitotoxicidade

A excitotoxicidade é definida como “(...) morte neuronal causada por altas concentrações de glutamato ou compostos com ação agonista sobre receptores glutamatérgicos” (OLNEY, 1969). O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no encéfalo, sendo responsável por um terço de todas as sinapses do SNC (BARBOSA *et al.*, 2006 *apud* SANTIAGO *et al.*, 2014) e a excitotoxicidade ocorre devido a processos intracelulares após hiperestimulação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (AMPA e NMDA) responsáveis pelo influxo do íon  $Ca^{2+}$ . A maior entrada desses íons leva a ativação de fatores pró-apoptóticos e a produção de ROS, além de provocar dano mitocondrial (CAUDLE & ZHANG, 2009; AMBROSI *et al.*, 2014).

Um estudo mostrou a relação entre excitotoxicidade e DP ao estimularem um modelo de excitotoxicidade glutamatérgica em cultura celular e encontrarem a formação de aglomerados da proteína parkina (uma das proteínas ligada à formação de corpúsculos de Lewy) em mitocôndria e retículo endoplasmático (VAN LAAR *et al.*, 2015). Ainda, camundongos com Parkinsonismo induzido pela neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) apresentaram aumento nos níveis de glutamato extracelular quando comparado aos animais controles, sendo que o tratamento com L-DOPA produziu uma diminuição significativa de glutamato comparado aos animais MPTP não-tratados, o que pode indicar uma relação – possivelmente indireta – entre a neurodegeneração dopaminérgica e o

aumento de glutamato extracelular, responsável pela excitotoxicidade (MEREDITH *et al.*, 2009).

### 1.2.3. Fatores Genéticos e Ambientais

Fatores genéticos têm sido identificados em formas familiares de DP, o que compõe aproximadamente 10% dos casos. (LESAGE and BRICE, 2009; ROSNER and ORR-URTREGER, 2008). Os produtos de genes que causam a DP, incluindo DJ-1, PINK1, parkina, alfa-sinucleína e LRRK2, têm impacto em funções mitocondriais complexas, levando à exacerbação da geração de ROS e à susceptibilidade ao estresse oxidativo (DIAS *et al.*, 2013).

Enquanto os fatores genéticos podem explicar cerca de 60% dos casos de DP, sendo a maior parte esporádica, o que significa que há fatores ambientais e de estilos de vida que influenciam o desenvolvimento da DP (MHYRE *et al.* 2012). O primeiro achado de fator ambiental foi reportado por Davis e colaboradores (1979), quando um paciente de 23 anos ao receber uma injeção intravenosa de análogos da Meperidina desenvolveu parkinsonismo. Pesquisas posteriores realizadas pelo grupo do Professor James Langston isolaram o composto e o identificaram como MPTP, descobrindo-o como uma potente neurotoxina para os neurônios dopaminérgicos.

A partir da descrição dos efeitos do MPTP, outra neurotoxina foi descoberta através de sua semelhança estrutural: o paraquat. Este é um herbicida muito utilizado na agricultura de todo mundo e é atualmente visto como um fator ambiental muito relevante (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003). Além desse herbicida, há um pesticida utilizado em alguns países (como o Brasil) que também possui potencial neurotóxico bastante semelhante: a rotenona (CICCHETTI *et al.*, 2009). Todos estes compostos atualmente são utilizados para mimetizar a DP em modelos animais (MHYRE *et al.* 2012).

### 1.2.4. Neuroinflamação

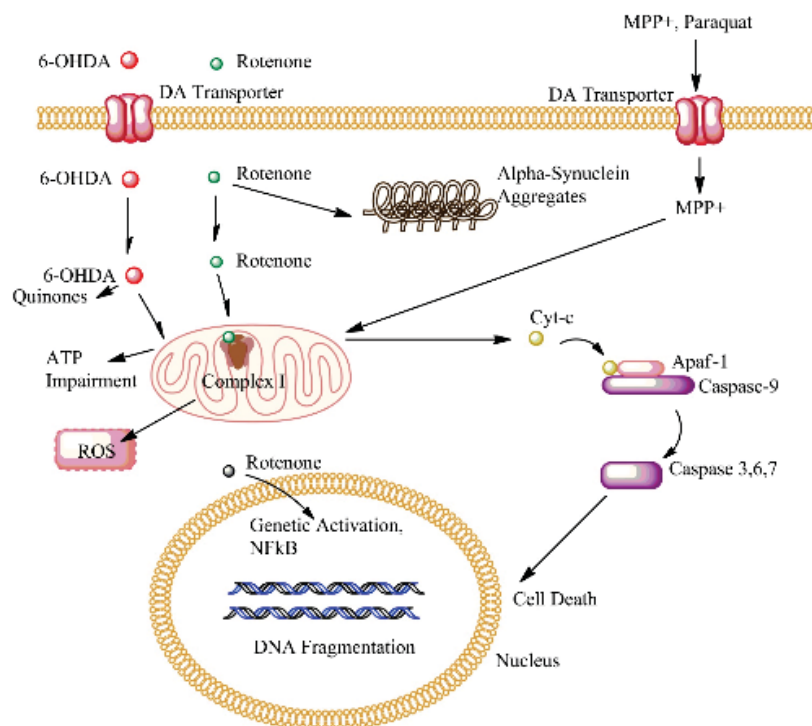
Inflamação é um mecanismo de proteção no corpo que funciona para reparar, regenerar e remover os tecidos danificados / células ou agentes infecciosos, parasitas ou toxinas do corpo, onde respostas inflamatórias são realizadas por várias células imunológicas e inflamatórias, incluindo células T, neutrófilos, macrófagos, microglia e mastócitos (KULKARNI *et al.*, 2016). Do mesmo modo, a neuroinflamação é um mecanismo protetor para restaurar as células gliais danificadas e as células neuronais no sistema nervoso central. Ou seja, inicialmente a neuroinflamação é uma medida de proteção ao encéfalo, porém o excesso de respostas inflamatórias pode ser prejudicial e de fato inibe a regeneração neuronal (KEMPURAJ *et al.*, 2016).

Fatores como o processo de envelhecimento, demência, trauma, acidente vascular cerebral, hipertensão, depressão, diabetes, tumores, infecções, toxinas e drogas podem iniciar a neuroinflamação no sistema nervoso central (SNC) (BARRIENTOS *et al.*, 2015). Além disso, o processo de envelhecimento causa diminuição da neurogênese, maior estresse metabólico, neuroinflamação aumentada, declínio cognitivo, déficits comportamentais e maior reatividade a qualquer desafio imunológico (DE VIRGILIO *et al.*, 2016; KEMPURAJ *et al.*, 2016). Ainda, estudos pré-clínicos demonstraram que o pré-tratamento com antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) protege os neurônios dopaminérgicos da degeneração induzida por neurotoxinas como o MPTP e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (REKSIDLER *et al.*, 2007; BASSANI *et al.*, 2015) que induzem um importante aumento da expressão da enzima pró-inflamatória COX-2 (LIMA *et al.*, 2006).

### 1.3. MODELOS ANIMAIS NA PD

A partir dos diferentes fatores (ambientais e genéticos) que envolvem o surgimento da DP, modelos experimentais utilizando exposição a neurotoxinas exógenas, mutações nos genes ligados à DP ou uma combinação de ambos, são utilizados para estudar a DP e selecionar estratégias terapêuticas (TIEU, 2012). Os modelos animais atuais de DP podem ser divididos em duas categorias: modelos

genéticos e neurotóxicos. Os modelos neurotóxicos envolvem a utilização de pesticidas, como paraquat e rotenona, e neurotoxinas, como MPTP e 6-OHDA, podendo ser utilizadas via intracerebral (CABEZAS *et al.*, 2013) e até intranasal (PREDIGER *et al.*, 2006; PREDIGER *et al.*, 2009). Os mecanismos de neurotoxicidade destes agentes químicos estão representados abaixo (Fig.1).



**Figura 1.** Modelos experimentais em PD. Paraquat, 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e MPP+ (metabólito do MPTP) atravessam facilmente a membrana celular através do transportador de dopamina (DAT), induzindo assim a formação de agregados de  $\alpha$ -sinucleína e comprometimento mitocondrial com a subsequente produção de ROS e quinonas. Os compostos, como rotenona, são extremamente hidrofóbicos e penetram facilmente a membrana celular de neurônios e astrócitos. A rotenona pode promover processos tais como a formação de agregados de  $\alpha$ -sinucleína e a ativação genética através da translocação nuclear de NF- $\kappa$ B. Além disso, como inibidor do complexo mitocondrial I, a rotenona provoca o comprometimento do ATP, a geração de ROS e a liberação de moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo c que ativam a caspase 9, que desencadeiam as caspases 3, 6 e 7 e induzem a apoptose. Retirado de Cabezas *et al.* 2013.

Assim como o MPTP, a 6-OHDA é uma neurotoxina catecolaminérgica seletiva utilizada, na maioria dos estudos, para mimetizar a depleção dopaminérgica da via nigroestriatal em ratos (UNGERSTEDT, 1968). A lesão direta na SNpc para mimetizar a DP utilizando a 6-OHDA desencadeia seu efeito neurodegenerativo a partir de um mecanismo relacionado ao aumento do estresse oxidativo local (MEREDITH *et al.*, 2008; SANTIAGO *et al.*, 2014). Sendo

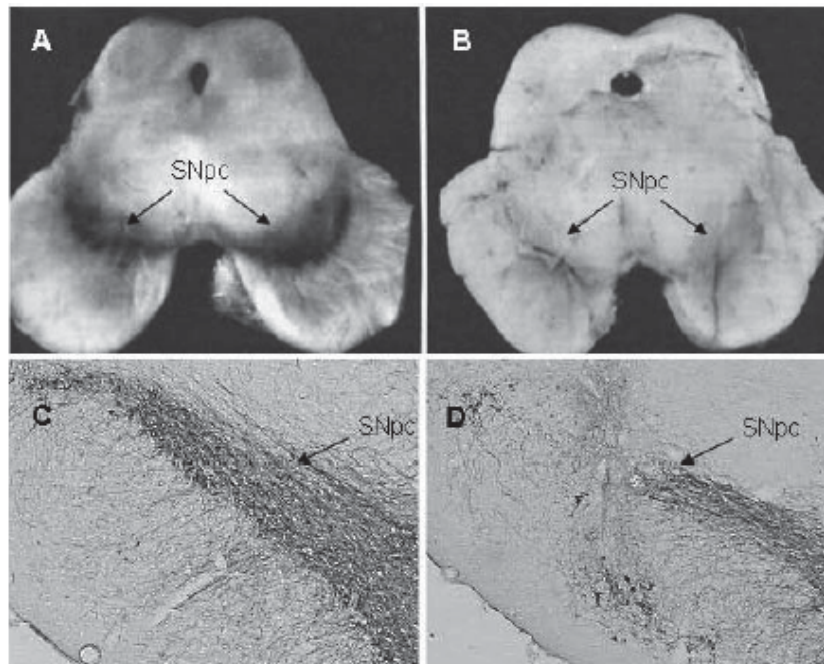
estruturalmente semelhante à DA, a 6-OHDA mostra uma elevada afinidade pelo transportador de DA (DAT), o que leva ao influxo da toxina nos neurônios dopaminérgicos, indicando haver grande seletividade de seus efeitos (LIMA *et al.*, 2009; SANTIAGO *et al.*, 2014). Uma vez no neurônio, essa neurotoxina acumula-se no citosol e é submetida a uma rápida auto-oxidação, promovendo uma elevada taxa de formação de radicais livres, principalmente  $H_2O_2$ , e quinonas (MEREDITH *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2009). Há evidências também de que a 6-OHDA age inibindo ativamente a cadeia respiratória mitocondrial à nível de complexo I (GLINKA and YODIM, 1995).

O modelo animal de 6-OHDA intranigral tem sido usado para testes pré-clínicos de novas terapias sintomáticas incluindo estratégias para prevenir alterações motoras e discinesias induzidas por levodopa (BOVÉ & PERIER, 2012). Os modelos animais não só replicam os sintomas motores da DP como também os sintomas não motores presentes em pacientes com a DP (ANSARI and JOHNSON, 1975; PREDIGER *et al.*, 2006). Em modelos animais, o comportamento tipo-depressivo é visto e comprovado através do aumento do tempo de imobilidade no teste de natação forçada e a diminuição do consumo de sacarose detectado no teste que quantifica a preferência pela solução açucarada, caracterizando o comportamento anedônico (SANTIAGO *et al.*, 2014). Já em relação aos distúrbios olfatórios na DP, sabe-se que os testes a serem realizados podem ter caráter social (odores que o animal convive/ poderá conviver) (MROCHEN *et al.*, 2016) e não social (odores que não são do convívio do animal), que são identificados e processados por diferentes vias olfatórias (FEINBERG *et al.*, 2012). Os odores usados em testes podem ser ainda prazerosos/ apetitivos – por exemplo, a apresentação de odor de urina de fêmea a machos (social) e odor de comida açucarada (não social) – ou aversivos, como odor de urina de predador (social) (LAZARINI *et al.*, 2014).

#### 1.4. FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

A fisiopatologia da DP envolve a degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos da SNpc – evidenciada macroscopicamente pela despigmentação

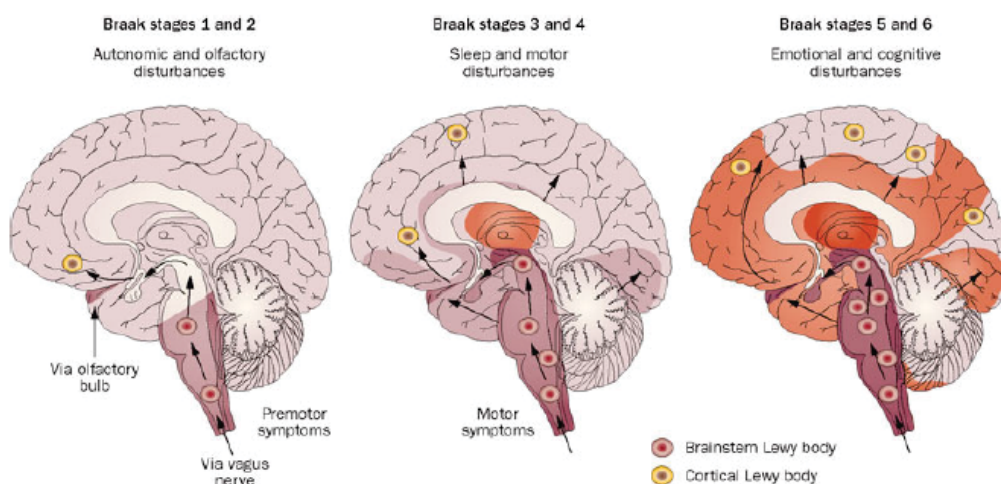
ventrolateral dessa estrutura (Fig. 2) – que desencadeia a denervação da via nigroestriatal e consequente redução significativa dos níveis de DA e seus metabólitos no estriado dorsal. Esse processo acarreta num desequilíbrio da projeção estriato-palidal e vias de saída do eixo palidal-talâmico, causando grande prejuízo motor (ALBIN, YOUNG & PENNEY, 1989; KANDEL, 2003).



**Figura 2.** Perda maciça de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral na substância negra pars compacta (SNpc). Os painéis A e B representam o mesencéfalo bilateral humano *post mortem* de indivíduos normais e parkinsonianos, respectivamente. C e D mostram o equivalente unilateral do mesencéfalo de rato depois de injeção intranigral do veículo (C) ou MPTP (D). As setas indicam a imunoreatividade da tirosina hidroxilase presente na SNpc. Retirado de Lima *et al.*, 2012.

A principal marca fisiopatológica da DP é a formação de inclusões intracitoplasmáticas protéicas nos neurônios dopaminérgicos, chamadas corpúsculos de Lewy (LBs) e neuritos de Lewy (LNs) que podem ser fusiformes ou em forma de fio. A  $\alpha$ -sinucleína é a principal proteína formadora desses corpúsculos, sendo estes também formados por parkina, ubiquitina, sinfilina-1, subunidades de proteossomas e várias outras proteínas (TRECIDI & BRAAK, 2012; OSSOWSKA & LORENC-KOCI, 2013).

O diagnóstico geralmente ocorre no início dos sintomas motores, porém, neste estágio, 40-60% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc já foram acometidos (IRANZO, 2013; WALTER *et al.*, 2013). A fim de se compreender evolutivamente a progressão neuropatológica da DP, Braak e colaboradores (2004) estabeleceram seis estágios progressivos da doença, elaborando a hipótese de evolução ascendente da DP (Fig. 3) (BRAAK *et al.*, 2004). No estágio 1 as primeiras lesões vistas no sistema nervoso central são no núcleo motor dorsal do nervo vago e no bulbo olfatório (BO). No estágio 2 os danos neuronais progridem ascendentemente, avançando ao longo do tegmento pedúnculo-pontino, afetando os neurônios da porção mais baixa dos núcleos da rafe (serotoninérgico), porções magnocelulares da formação reticular e células noradrenérgicas do complexo *locus coeruleus* (LC) e *subcoeruleus* (este no caso de roedores). No estágio 3 ocorre as alterações na SNpc, células dopaminérgicas da amígdala central, neurônios colinérgicos do núcleo pedúnculo pontino, prosencéfalo basal e núcleos orais da rafe são também afetados. No estágio 4 ocorrem lesões nas áreas corticais do mesocórtex, este interligado com estruturas límbicas como: córtex entorrinal, amígdala e hipocampo. Nos estágios 5 e 6 ocorre a sobrecarga da SNpc devido à sua neurodegeneração e de todo o neocórtex, incluindo pré-frontal, associado à processos cognitivos (BRAAK *et al.*, 2004). Nos estágios 1 e 2 ocorre o aparecimento de prejuízos autonômicos e olfatórios; nos estágios 3 e 4 ocorrem distúrbios do sono e motores; e nos estágios 5 e 6 ocorrem os sintomas de distúrbios cognitivos e emocionais (DOTY, 2012).



**Figura 3.** O estágio esquemático da doença de Parkinson proposto por Braak, que mostra os locais de início no bulbo olfatório e medula oblonga, através do aparecimento de corpos de Lewy em regiões corticais. A patologia relacionada com  $\alpha$ -sinucleína é possivelmente iniciada na periferia através do epitélio olfatório ou do estômago, talvez envolvendo fatores de xenobióticos. O sombreamento vermelho representa o padrão topográfico da patologia. Retirado de Doty, 2012.

Desde sua descrição inicial em 1817 por James Parkinson, a DP é caracterizada por seus sinais motores como bradicinesia, rigidez, tremor de repouso, e instabilidade postural. Entretanto, os distúrbios não motores têm ganhado destaque na literatura como, por exemplo, as alterações olfatórias, de sono, no paladar, função cardiovascular, função gástrica e intestinal, salivação, atividade das glândulas sebáceas, humor e cognição (CHAUDHURI *et al.*, 2006; DOTY, 2013). Alguns sintomas não motores como depressão, ansiedade, hiposmia, constipação e distúrbios de sono dos movimentos oculares rápidos (REM) podem aparecer antes dos distúrbios motores – chamada de fase prodrômica, onde o paciente apresenta os sintomas não motores, porém não pode ser diagnosticado já que os mesmos podem ser similares à outras enfermidades (LIU *et al.*, 2017). Outros sintomas como a demência, psicoses, sonolência e disfunções autonômicas, são muito comuns em estágios avançados (MODUGNO *et al.*, 2013).

Além da ligação de depressão e prejuízo olfatório à DP, diversos autores citam a relação entre depressão e prejuízo olfatório sem o contexto de Parkinsonismo (ATANASOVA *et al.*, 2008; NEGOIAS *et al.*, 2010; ORAL *et al.*, 2013; CROY *et al.*, 2013; CROY *et al.*, 2014; YUAN & SLOTNICK, 2014; RAYNAUD *et al.*, 2015), pois é sabido que a depressão pode gerar prejuízo olfatório através da diminuição da neurogênese na zona subventricular – de onde neurônios migram para o BO – (CROY *et al.*, 2013; YUAN & SLOTNICK, 2014) o qual poderia ocorrer no BO, afetando os interneurônios granulares presentes na camada granular e os interneurônios periglomerulares presentes na camada glomerular (MARXREITER *et al.*, 2013), causando a redução direta da sensibilidade olfatória (NEGOIAS *et al.*, 2010). Além disso, a bulbectomia olfatória bilateral (OBX) é considerada um modelo de depressão em animais, já que tanto a retirada cirúrgica quanto a lesão química bulbar acarretam alterações hipotalâmicas e límbicas (YUAN & SLOTNICK, 2014) similares às vistas em comportamentos tipo-depressivos e que podem ser responsáveis pelas alterações comportamentais, por exemplo, o aumento da

hiperatividade em um ambiente novo, déficits de aprendizagem-evasão passiva, e anedonia (ORAL *et al.*, 2013; MATURANA *et al.*, 2014; RAYNAUD *et al.*, 2015).

#### 1.4.1. Prejuízo Olfatório na DP

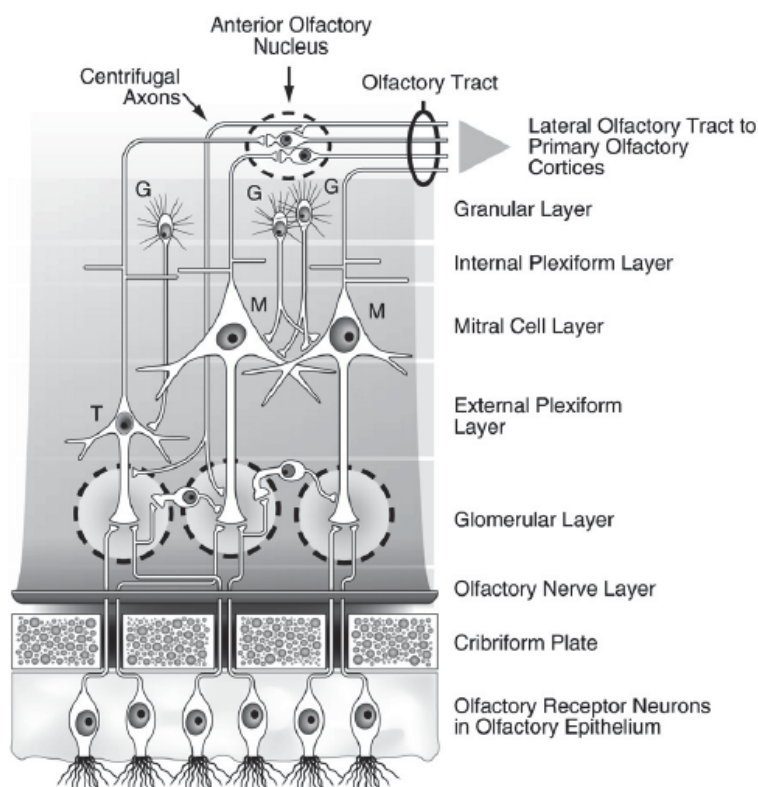
O prejuízo olfatório é talvez a primeira alteração pré-motora da DP (BRAAK *et al.*, 2003; DOTY, 2013), afetando mais de 90% dos pacientes (PREDIGER *et al.*, 2009; BERENDSE *et al.*, 2011; LAZARINI *et al.*, 2014; KNUDSEN *et al.*, 2015). Estudos realizados com parentes de pacientes têm sugerido a hiposmia como um sinal pré-motor que pode preceder o início dos sintomas motores em até cinco anos (BERENDSE *et al.*, 2011), porém outros estudos afirmam que o sintoma pode ser encontrado até décadas antes do primeiro sinal motor (DUDA, 2010). Em pacientes com DP foram encontradas evidências de corpos e neuritos de Lewy no bulbo olfatório, além de uma diminuição dos neurônios do núcleo olfatório anterior, bem como um aumento paradoxal de neurônios dopaminérgicos da camada glomerular do bulbo olfatório (interneurônios periglomerulares), mas a relação destes achados com o prejuízo olfatório ainda precisam ser elucidadas (LIU *et al.*, 2017).

O sistema olfatório de vertebrados é especializado em discriminar uma enorme variedade de moléculas e essa capacidade depende de uma série de etapas de processamento que ocorrem em diferentes estruturas ao longo do sistema olfatório: epitélio olfatório no nariz, bulbo olfatório e estruturas hierarquicamente superiores, tais como o córtex piriforme – que recebe informação proveniente do bulbo olfatório e a distribui para outras regiões do sistema nervoso (AIRES, 2012). Em humanos, essa via é a única responsável por transmitir estímulos olfatórios (SALAZAR *et al.*, 2016). Já em roedores, o sistema olfatório é composto por duas vias distintas. A via previamente descrita é chamada de via olfatória principal, enquanto a secundária é denominada via olfatória acessória (ou sistema vomeronasal) (SALAZAR *et al.*, 2016). As duas vias transmitem informações diferentes, a via principal transmitindo informações sobre estímulos olfatórios voláteis e a via acessória sobre não voláteis (MARTINEZ-MARCOS, 2009 *apud* FEINBERG *et al.*, 2012). Os odores sociais são compostos de uma variedade complexa de moléculas, além de componentes compartilhados entre os animais, transmitindo informações sobre a idade, sexo, estado de saúde e parentesco

(BRENNAN & KENDRICK, 2006). Estes odores sociais são processados através de ambas as vias olfatórias, enquanto odores não sociais são processados unicamente através da via principal (FEINBERG *et al.*, 2012).

A transmissão do estímulo olfatório em humanos e pela via principal de roedores está representada na Figura 4. A molécula odorante é identificada pelos neurônios receptores olfatórios, presentes no epitélio olfatório do nariz. Esses neurônios projetam seus axônios para a camada mais externa do bulbo olfatório, (camada glomerular) onde o axônio dos neurônios receptores olfatórios encontram os dendritos dos neurônios de segunda ordem localizados no bulbo olfatório (células mitrais e tufozas m/t) em sinapses especializadas chamadas de glomérulos (KANDEL, 2003; AIRES, 2012).

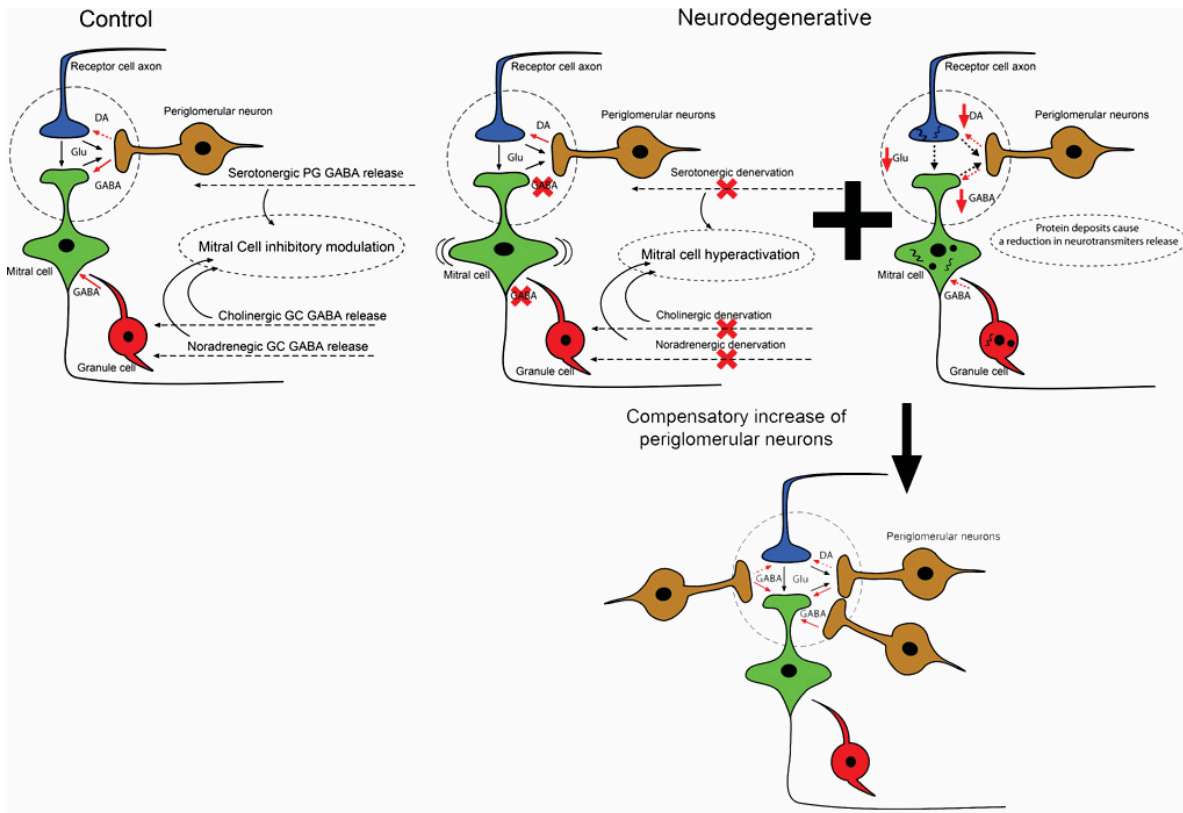
As células mitrais apresentam o corpo celular na camada mitral do bulbo olfatório, enquanto que as células tufozas apresentando seus corpos celulares na camada plexiforme externa (DUDA, 2010; KANDEL, 2003; DOTY, 2013). Há ainda a presença de interneurônios na camada glomerular (chamados de células periglomerulares) sendo estes em sua maioria neurônios dopaminérgicos que têm como função desempenhar uma ação inibitória sobre neurônios receptores olfatórios e células mitrais/tufozas (HUISMAN *et al.*, 2004; MUNDIÑANO *et al.*, 2011), modulando a transmissão do estímulo olfatório já que estas células possuem receptores dopaminérgicos da família D2 (inibitórios) (KANDEL, 2003; LAZARINI *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Representação esquemática da circuitaria do bulbo olfatório. Neurônios receptores olfatórios projetam seus axônios para o epitélio através da placa crívosa (cribriforme) que divergem ao entrar no bulbo olfatório para formar glomérulos. Nos glomérulos, os neurônios receptores olfativos fazem sinapse com células mitrais (M) e células tufosas (T) e são modulados pelos neurônios e axônios periglomerulares. Células mitrais e tufosas são os principais neurônios do bulbo olfatório, projetando a informação olfatória para áreas corticais. Legenda: Olfactory receptor neurons (neurônios receptores olfatórios); cribriform plate (placa crívosa); olfactory nerve layer (camada de nervos olfatórios); glomerular layer (camada glomerular); external plexiform layer (camada plexiforme externa); mitral cell layer (camada de células mitrais); internal plexiform layer (camada plexiforme interna); granular layer (camada granular); lateral olfactory tract to primary olfactory cortices (trato olfatório lateral para o córtex olfatório primário); olfactory tract (trato olfatório); anterior olfactory nucleus (núcleo olfatório anterior); centrifugal axons (axônios centrífugos). Retirado de Duda, 2010.

Sabe-se que na DP há um aumento significativo do número destes interneurônios em humanos (HUISMAN *et al.*, 2004; MUNDIÑANO *et al.*, 2011) e também em modelo animal induzido pela rotenona (RODRIGUES *et al.*, 2014) – levantando a hipótese deste aumento ser uma resposta compensatória à perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc – podendo ser relacionado ao prejuízo olfatório observado em tal condição (DOTY, 2012; DOTY, 2013). Mundiñano e colaboradores (2011), a partir dos resultados encontrados de aumento no número de neurônios dopaminérgicos na camada glomerular do BO, propuseram que tal ocorrência seja compensatória à diminuição das projeções serotoninérgicas e noradrenérgicas fruto

da neurodegeneração de regiões como os núcleos da rafe e o LC durante as fases iniciais da DP (Fig. 5).



**Figura 5.** Representação esquemática da hipótese proposta por Mundiñano *et al.* (2011) para o aumento dos neurônios periglomerulares dopaminérgicos detectados na DP. Em situação normal (control), as aferências olfatórias colinérgicas, noradrenérgicas e serotonérgicas exercem uma modulação inibitória das células mitrais. Nas doenças neurodegenerativas (neurodegenerative), as projeções colinérgicas, noradrenérgicas e serotonérgicas estão reduzidas, o que pode diminuir ou mesmo extinguir estas projeções olfatórias centrífugas. O resultado dessa diminuição seria a hiperatividade da célula mitral. Dado que os neurônios periglomerulares dopaminérgicos libertam neurotransmissores inibitórios tais como a dopamina (DA) e GABA para modular a sinalização olfatória no glomérulo, um aumento nos neurônios periglomerulares dopaminérgicos poderia ser uma resposta plástica para compensar a falta de inibição centrífuga. Por outro lado, os depósitos de Tau, amiloide e alfa-sinucleína nas células do bulbo olfatório podem afetar a liberação normal do neurotransmissor, reduzindo os níveis glomerulares de DA e GABA. O aumento observado de neurônios dopaminérgicos poderia ser uma resposta para compensar esse efeito. Retirado de Mundiñano *et al.*, 2011.

A partir do achado de Huisman *et al.* (2004) e da proposição de Mundiñano *et al.* (2011) e Rodrigues *et al.* (2014) que identificaram um aumento de 50% dos interneurônios periglomerulares em modelos de Parkinsonismo induzido por rotenona intranigral quando comparado ao grupo controle. Desse modo, a hipótese do presente estudo é que a lesão com 6-OHDA infligida especificamente na camada

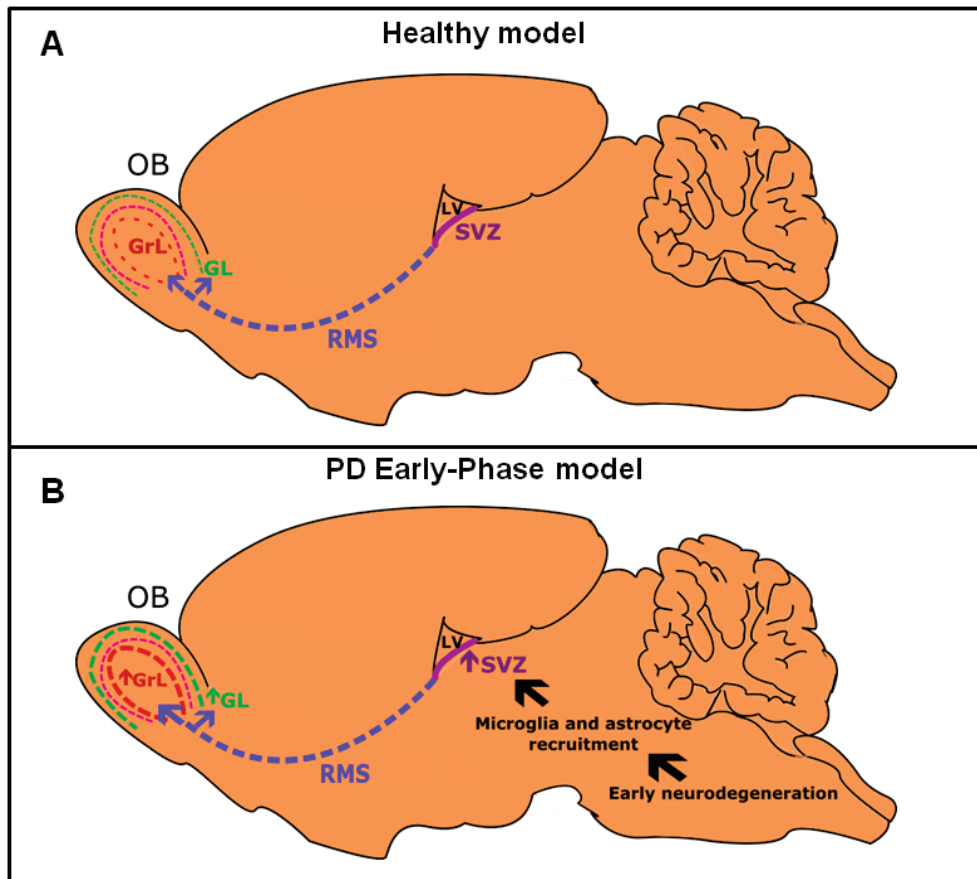
glomerular do BO reduziria a quantidade de neurônios que estão em maior número devido à prévia lesão da via nigroestriatal – mimetizando a DP – que, hipoteticamente, seriam os responsáveis pela ocorrência dos distúrbios olfatórios. Portanto, a redução no número e/ou densidade destes neurônios dopaminérgicos presentes no BO poderia promover uma melhora olfatória no contexto de Parkinsonismo induzido por 6-OHDA injetado na SNpc.

Há ainda uma hipótese alternativa que prevê que essa lesão do BO poderia gerar um prejuízo olfatório ainda maior (devido ao desequilíbrio neuronal causado pela lesão local), sendo averiguado através dos controles sham e do grupo que sofreu um bloqueio de detecção olfatória por meio da administração intranasal do fármaco Zicam<sup>®</sup>, previamente utilizado como controle positivo de anosmia, gerando o bloqueio da atividade dos neurônios receptores olfatórios presentes no epitélio olfatório, causando prejuízo olfatório clássico (LIM et al., 2009).

## 1.5. NEUROINFLAMAÇÃO E DISTÚRBIO OLFATÓRIO NA DP

Os interneurônios periglomerulares são gerados em uma região denominada zona subventricular (ZSV), estrutura associada ao terceiro ventrículo e que juntamente com a zona subgranular do hipocampo é responsável pela proliferação celular adulta, presente tanto em roedores quanto em humanos (Doetsch, 2003). Fisiologicamente, a ZSV é responsável pela geração de células-tronco em neuroblastos que migram através da via migratória rostral até as camadas granular e glomerular do bulbo olfatório onde se diferenciam nos interneurônios dopaminérgicos anteriormente citados (Hoglinger et al., 2004; Tieu, 2011). Porém, em situações de degenerações maciças, estes neurônios podem migrar para as regiões afetadas, aparentemente em uma tentativa de regenerar a região e restabelecer as conexões, como demonstrado através do aumento de neurônios BrdU+ no estriado dorsal em modelo de acidente vascular encefálico isquêmico (Hoehn et al., 2005; Palm et al., 2012), assim como em modelo de Parkinsonismo por 6-OHDA (Cooper and Isacson, 2004; Worlitzer et al., 2012).

De acordo com nossos dados prévios (Ilkiw et al., 2018), os neurônios periglomerulares parecem ter um papel fundamental no olfato porque as lesões seletivas dessas células promovem um impacto negativo nesse processamento sensorial, provavelmente provocando a migração de neurônios recém-nascidos da ZSV. Complementarmente, uma lesão aguda da camada periglomerular é capaz de neutralizar a distúrbio olfatório provocado pela lesão dopaminérgica na SNpc, reforçando esse antagonismo. Como hipótese de justificativa para a relação entre a neuroinflamação e a olfação, em nosso mais recente trabalho (Ilkiw and Lima, 2019) supomos que de acordo com o estagiamento de Braak, na DP as alterações começam tanto no BO quanto no tronco encefálico, possivelmente causando o distúrbios não motores. A neurodegeneração inicial provocaria um recrutamento importante de células neuroinflamatórias, especialmente microglias e astrócitos, sinalizando o SVZ para intensificar o processo de neurogênese e respectiva migração para o OB (Fig. 6). Tal mecanismo é supostamente responsável por criar um circuito capaz de promover uma potente inibição de neurônios mitrais/tufais levando a comprometimento olfatório pré-clínico na DP.



**Figura 6.** Padrão de migração de interneurônios em direção ao bulbo olfatório. Em indivíduos saudáveis (A), a zona subventricular (SVZ) é responsável por gerar neurônios recém-nascidos. Assim que nascem, esses neurônios migram pela via migratória rostral (RMS) até atingirem o bulbo olfatório (OB) onde se diferenciam em interneurônios granulares na camada granular (GrL) e interneurônios periglomerulares na camada glomerular (GL). De acordo com o estadiamento de Braak, na DP as alterações começam tanto no BO quanto no tronco encefálico, possivelmente causando o distúrbio não motor. (B) A neurodegeneração inicial provoca um recrutamento importante de células neuroinflamatórias, especialmente microglias e astrócitos, sinalizando o SVZ para intensificar o processo de neurogênese e respectiva migração para o OB. Tal mecanismo é supostamente responsável por criar um circuito capaz de promover uma potente inibição de neurônios mitrais/tufais levando a comprometimento olfatório pré-clínico na DP. LV: Ventrículo lateral. (ILKIW and LIMA, 2019).

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é a principal proteína dos filamentos intermediários do citoesqueleto dos astrócitos maduros. Alterações na expressão dessa proteína já foram vistas em várias doenças neurodegenerativas como DP, doença de Alzheimer e demência frontotemporal (Clairembault et al., 2014). Essa expressão elevada de GFAP demonstra a ativação e proliferação dos astrócitos em resposta à neurodegeneração, resultante da modificação dos astrócitos da sua forma quiescente para sua forma reativa, assim levando a GFAP a ser um bom

marcador de neurodegeneração (Liu et al., 2017). Também em animais submetidos ao modelo de Parkinsonismo, uma lesão seletiva na camada glomerular do bulbo olfatório pela neurotoxina 6-OHDA reverteu o prejuízo olfatório, reduzindo os neurônios periglomerulares que possivelmente estavam em número aumentado devido a lesão na SNpc (Ilkiw et al., 2018). Desse modo, a quantificação do marcador GFAP permitiria a análise e possíveis correlações do processo neuroinflamatório em animais sob o paradigma de lesão dupla na via nigroestriatal e no bulbo olfatório.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O prejuízo olfatório é uma importante alteração não motora encontrada na DP, levando os pacientes a uma piora significativa da qualidade de vida. Além disso, esta alteração é prodrômica, sendo considerado o primeiro sintoma da DP, o que confere um alto valor preditivo. Deste modo, investigar os mecanismos fisiopatológicos e possíveis correlações entre essa disfunção e a sintomatologia clássica torna-se essencial para que, através da identificação de biomarcadores moleculares e comportamentais, possa-se realizar um diagnóstico precoce e tratamento mais eficiente, além de expandir o entendimento funcional da circuitaria olfatória no contexto da regulação do olfato.

## **3. OBJETIVOS**

Investigar a relação entre a neuroinflamação e a DP em seus possíveis efeitos sobre olfação no modelo de lesão dupla (intranigral e intrabulbar) com a neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver e padronizar um novo teste de odor social para avaliação do

distúrbio olfatório no modelo animal de Parkinsonismo

- Realizar os testes de reconhecimento olfatório e reconhecimento social modificado (para avaliação de discriminação e memória olfatória, respectivamente);
- Análises neuroinflamatórias através da quantificação de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) por Western Blot de amostras do BO e SNpc

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. ANIMAIS**

Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo CEUA/BIO da Universidade Federal do Paraná, que visam à aplicação de princípios éticos modernos em relação ao uso de animais de experimentação. Foram utilizados ratos Wistar machos de três meses de idade, pesando entre 280-330g. Os animais foram mantidos isolados em caixas de propileno em uma sala com padrões de umidade e temperatura controlados ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), em um ciclo de claro-escuro de 12:12 h (7:00-19:00 h). Água e comida serão fornecidas à vontade aos animais durante todo o experimento. Além disso, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (aprovação nº 1162).

### **4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

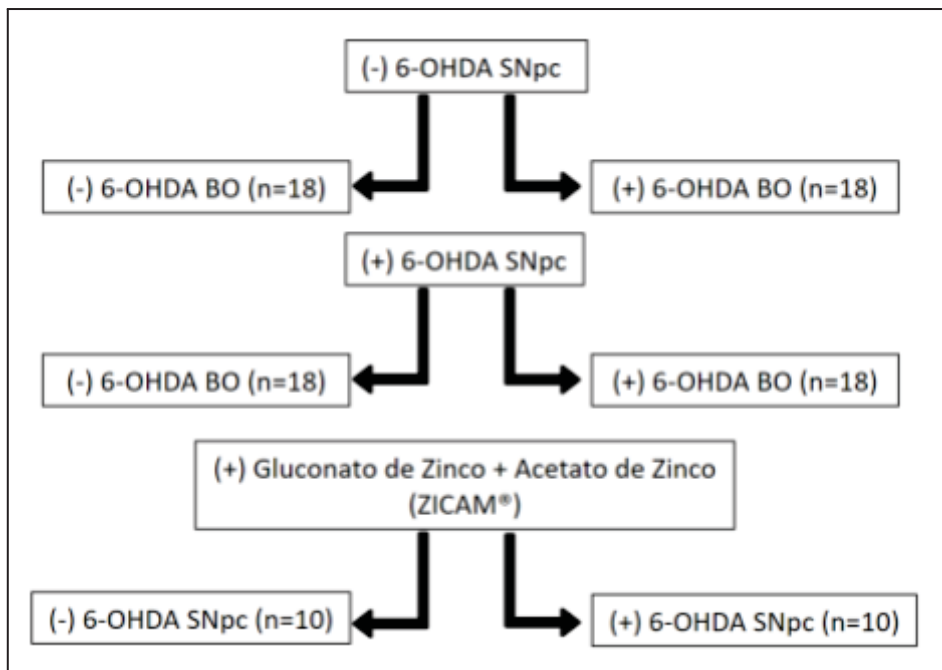
O delineamento experimental deste projeto foi organizado em dois momentos, a padronização de um teste olfatório novo para odor social e os grupos experimentais principais, descritos abaixo.

#### 4.2.1. Padronização do Teste de Reconhecimento Olfatório

Para a realização da padronização do novo teste olfatório (Teste de Reconhecimento Olfatório) foram testados dois tempos (3 ou 5 minutos) de treinamento e teste para animais Naïve (animais sem nenhuma manipulação) e Zicam (grupo de anosmia positiva) n=10/grupo (Total=40 animais). Após os resultados primários, foram estabelecidos mais três grupos para realizar o teste que apresentou o resultado esperado (n = 10/grupo): Sham (animais operados, mas não feridos), 6-OHDA e Rotenona (Total = 30 animais) realizado 3 minutos treinamento e teste para TRO. 6-OHDA e Rotenona são neurotoxinas que mimetizam a DP, que foram administradas por cirurgia estereotáxica na substância nigra pars compacta. Zicam é uma formulação de gluconato de zinco + acetato de zinco que causa anosmia, atuando como um controle positivo para prejuízo olfatório.

#### 4.2.2. Delineamento dos grupos experimentais principais

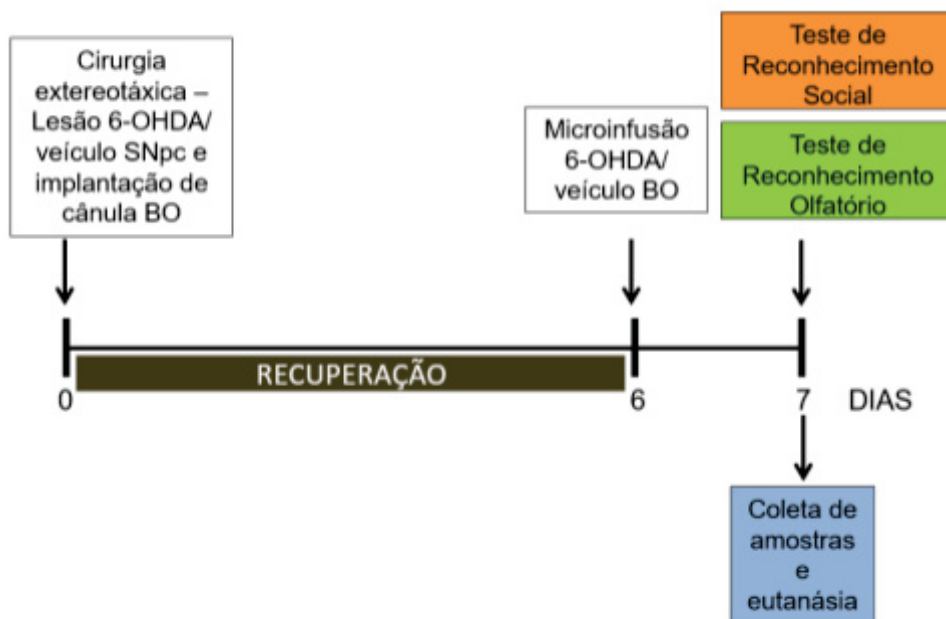
Após a realização da padronização do teste olfatório, outros animais foram distribuídos randomicamente em 4 grupos experimentais (Figura 7): 6-OHDA (-)SNpc/(-)OB-gl; 6-OHDA (-)SNpc/(+)OB-gl; 6-OHDA (+)SNpc/(-)OB-gl; 6-OHDA (+)SNpc/(+)OB-gl. Os sinais (+) ou (-) indicam infusão de 6-OHDA, ou seu veículo, respectivamente. Posteriormente esses animais foram divididos em 2 linhas do tempo, formando os dois primeiros experimentos descritos abaixo. O experimento 3 descreve a realização de mais dois grupos, os controle positivo para o prejuízo olfatório estabelecidos pelo uso intranasal do medicamento Zicam (Rodrigues *et al.*, 2014; Ilkiw *et al.*, 2018).



**Figura 7.** Representação da divisão dos grupos experimentais principais. (n total=184 animais, incluindo grupos positivos para anosmia),  $n=18$  por grupo +  $n=10$  por grupo de modelo animal de anosmia (Zicam) a serem divididos em 2 linhas do tempo. Legendas: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; BO, bulbo olfatório; SNpc, substância nigra pars compacta. Os sinais (+) ou (-) indicam infusão de 6-OHDA, ou seu veículo, respectivamente.

### 2.2.2.1 Experimento 1

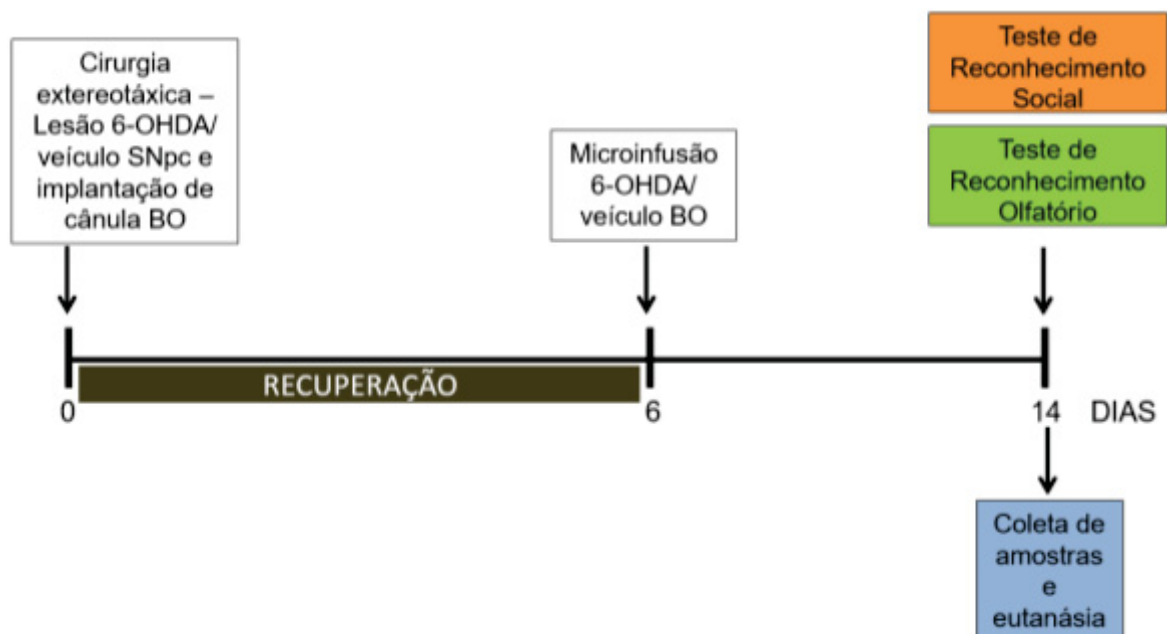
No dia zero foi realizada cirurgia estereotáxica com lesão na SNpc e implantação de cânula no BO. Seis dias após a cirurgia foi realizada a microinfusão com 6-OHDA/sham para lesão da camada glomerular, sendo que 24 horas após foram realizados os testes comportamentais (campo aberto e teste de discriminação olfatório) seguidos de eutanásia para coleta de amostras para a quantificação da proteína GFAP por Western Blot (Figura 8).



**Figura 8.** Representação esquemática do experimento 1. n= 18 por grupo. Legendas: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; BO, bulbo olfatório; SNpc, substância nigra pars compacta.

#### 2.2.2.2 Experimento 2

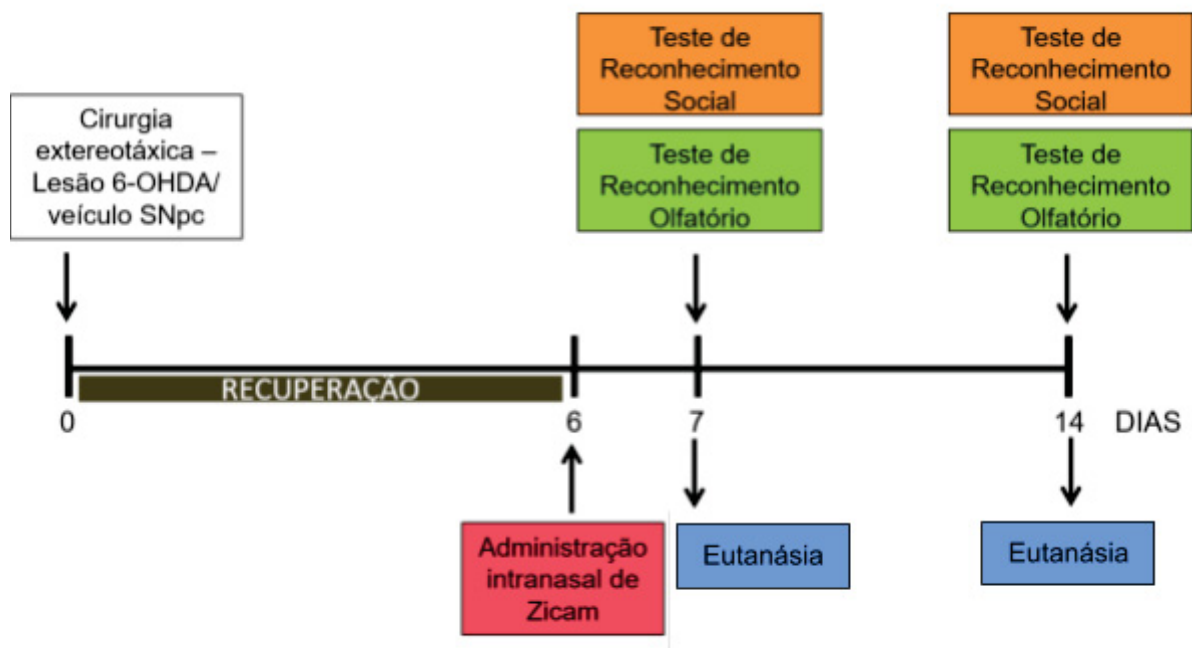
No dia zero foi realizada cirurgia estereotáxica com lesão na SNpc e implantação de cânula no BO. Seis dias após a cirurgia foi realizada a microinfusão com 6-OHDA/sham para lesão da camada glomerular, sendo os testes comportamentais (campo aberto e teste de discriminação olfatório) realizados 14 dias após a cirurgia (8 dias após a microinfusão) e assim seguidos de eutanásia para coleta dos encéfalos para quantificação da proteína GFAP por Western Blot (Figura 9).



**Figura 9.** Representação esquemática do experimento 2. n= 18 por grupo. Legendas: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; BO, bulbo olfatório; SNpc, substância nigra pars compacta.

### 2.2.2.3 Experimento 3

No dia zero foi realizada cirurgia estereotáxica com lesão na SNpc mas sem a implantação de cânula no BO. Seis dias após a cirurgia foi realizada a infusão intranasal de Zicam, sendo os testes comportamentais (campo aberto e teste de discriminação olfatório) realizados 7 ou 14 dias após a cirurgia (1 ou 8 dias após a microinfusão, respectivamente) e assim seguidos de eutanásia (Figura 10).



**Figura 10.** Representação esquemática do experimento 3. n= 10 por grupo. Legendas: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; BO, bulbo olfatório; SNpc, substância nigra pars compacta.

#### 4.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram sedados com xilazina (10 mg/kg) e então anestesiados com quetamina (90 mg/kg). As seguintes coordenadas foram utilizadas para a lesão bilateral, bregma como referência: substância nigra pars compacta (SNpc) (AP) = - 5,0 mm, (ML) =  $\pm$  2,1 mm e (DV) = - 8,0 mm (Paxinos e Watson 2005). Para os animais da Padronização do TRO, no grupo 6-OHDA, as agulhas foram guiadas até a região de interesse para infusão bilateral de 2  $\mu$ L de 6-OHDA (3 $\mu$ g/ $\mu$ L) de solução salina contendo ácido ascórbico a 0,2% usando uma bomba de infusão eletrônica (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brasil) a uma taxa de 0,33  $\mu$ L/min por 6 minutos (modificado de Lima, et al., 2006). Já para o grupo Rotenona, 1 mL de rotenona (12 mg/mL) ou de dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) usando uma bomba de infusão eletrônica (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brasil) a uma taxa de 0,33 mL/min por 3 min (Saravanan et al., 2005; Moreira et al., 2012; Dos Santos et al., 2013) administrados na mesma estrutura. As

operações simuladas seguiram o mesmo procedimento, mas 2  $\mu\text{L}$  de solução salina contendo 0,02% de ácido ascórbico foi injetado.

Para os animais dos grupos experimentais principais, a infusão bilateral de 6-OHDA na SNpc as coordenadas, a partir do bregma, serão: (AP) = - 5,0 mm, (ML) =  $\pm$  2,1 mm e (DV) = - 8,0 mm (Paxinos and Watson, 2005). Agulhas serão guiadas até a região de interesse e foi feita a infusão de 2  $\mu\text{L}$  de solução de ácido ascórbico 0,2% em salina, contendo a neurotoxina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) utilizando micro seringa de 10  $\mu\text{L}$  (Hamilton Apparatus) com auxílio de uma bomba de infusão eletrônica (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brasil), a uma taxa de 0,33  $\mu\text{L}/\text{min}$ , durante 6 minutos (modificado de Lima et al., 2006). Os animais do grupo sham foram injetados apenas com veículo ácido ascórbico 0,2% em salina. Uma cânula guia foi implantada no Bulbo Olfatório para a infusão de 6-OHDA. As coordenadas para a implantação da cânula a partir do bregma foram: (AP) = + 7,08 milímetros (ML) = 0,0 milímetros e (DV) = - 3.6 mm (Paxinos and Watson, 2005). Após as cirurgias, os animais permaneceram acomodados nas caixas de manutenção durante um período de 05 dias para recuperação antes da infusão de 6-OHDA no Bulbo olfatório e dos testes comportamentais.

#### 4.4. MICROINFUSÃO DE 6-OHDA NO BULBO OLFATÓRIO

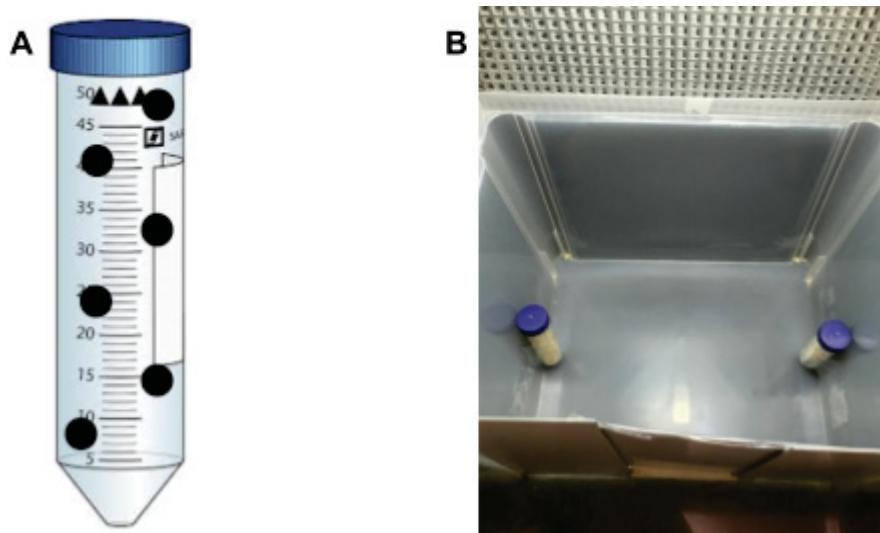
No 6º dia após as cirurgia foram infundidas a neurotoxina 6-OHDA através da cânula guia implantada no bulbo olfatório. Realizou-se a infusão de 1  $\mu\text{L}$  de solução de ácido ascórbico 0,2% em salina contendo a neurotoxina (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) utilizando uma micro seringa de 10  $\mu\text{L}$  (Hamilton Apparatus) com auxílio de uma bomba de infusão eletrônica (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brasil), a uma taxa de 0,33  $\mu\text{L}/\text{min}$ , durante 3 minutos. Os animais do grupo sham foram injetados apenas com veículo ácido ascórbico 0,2% em salina, nas mesmas condições.

#### 4.5. ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE ACETATO DE ZINCO + GLUCONATO DE ZINCO (ZICAM®)

Para os grupos controle positivo para anosmia realizou-se à administração de Zicam® Oral Mist (Matrixx Initiatives, Scottsdale, AZ, EUA) como relatado por (Chioca et al., 2013): "Os animais foram sedados com uma administração intraperitoneal de 90 mg/kg de cetamina e 3mg/kg de xilazina, e 30 µl de solução de Zicam® foi lentamente infundido na cavidade nasal utilizando uma seringa de Hamilton ligada a uma agulha de calibre 30 através de uma cânula de polietileno". A cânula foi inserida 15 milímetros na narina externa direita para ajudar a irrigar o epitélio olfativo. O procedimento foi repetido na narina esquerda. Durante a respiração, uma parte pequena da solução é expelida através da narina sendo seca com papel absorvente, para permitir que o animal continuasse a respirar normalmente (Lim et al., 2009; Rodrigues et al., 2014).

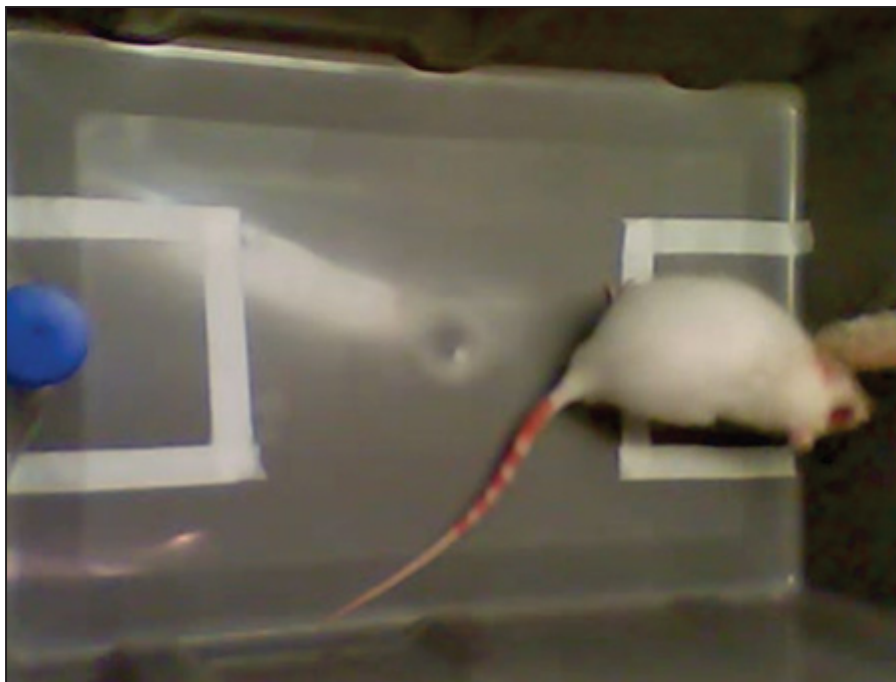
#### 4.6. TESTE DE RECONHECIMENTO OLFATÓRIO

Para o teste de odor social, os ratos foram colocados individualmente em uma caixa contendo 2 falcons semelhantes com pequenos orifícios ao longo de suas superfícies (Fig 11, A). O teste foi realizado em duas etapas, a primeira (chamada de "treinamento") foi realizada como uma habituação à caixa. Os animais foram colocados na caixa contendo cepilho limpo dentro dos dois falcons e a exploração de ambos foi observada por 3 minutos. Na segunda etapa, denominada teste, um falcon foi escolhido aleatoriamente e o cepilho limpo foi substituído por cepilho coletado da caixa em que o animal permaneceu previamente isolado durante 48 horas (odor denominado de familiar) e no outro tubo falcon foi mantido o cepilho limpo (odor denominado de não familiar) durante 3 minutos. Isso nos proporciona uma análise muito mais clara do interesse do animal na detecção e de que quando há um tempo de exploração maior significa genuinamente que ele apresentou um maior interesse pelo odor do falcon.



**Figura 11.** Representação do Teste de Reconhecimento Olfatório. **(A)** Representação do tubo falcon com furos para auxiliar o animal na exploração do cepilho. **(B)** Espaço de teste demonstrando os dois tubos falcons em lados opostos da caixa, podendo conter cepilho sujo ou limpo, dependendo se treino ou teste (imagem da câmera de análise).

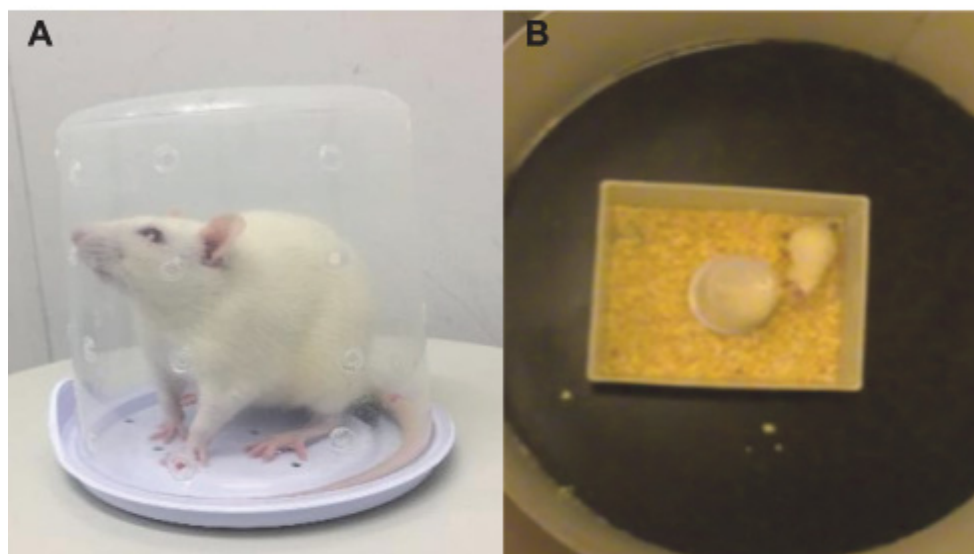
Para a determinação da exploração ativa do odor foi estabelecida uma linha de limite de 2 cm ao redor de cada tubo e se o animal atravessa essas linhas com a cabeça e as patas dianteiras, o tempo era contado como exploração (Fig. 12). As duas etapas foram gravadas para posterior análise. Um animal que não possui prejuízo olfatório explora mais ativamente, e por mais tempo, o tubo falcon com o cepilho familiar do que animais que possuem prejuízo olfatório (Dados ainda não publicados do Laboratório de Neurofisiologia da UFPR, 2023).



**Figura 12.** Imagem do TRO. Imagem real da avaliação do teste de reconhecimento olfatório, onde era apresentado dois tubos falcons com cepilho dentro e dado 3 minutos para o animal explorar a sua livre escolha. A fita adesiva no chão determina a faixa de exploração do animal e esta apresenta 2 cm de distância aos tubos falcons. (Acervo pessoal, 2023).

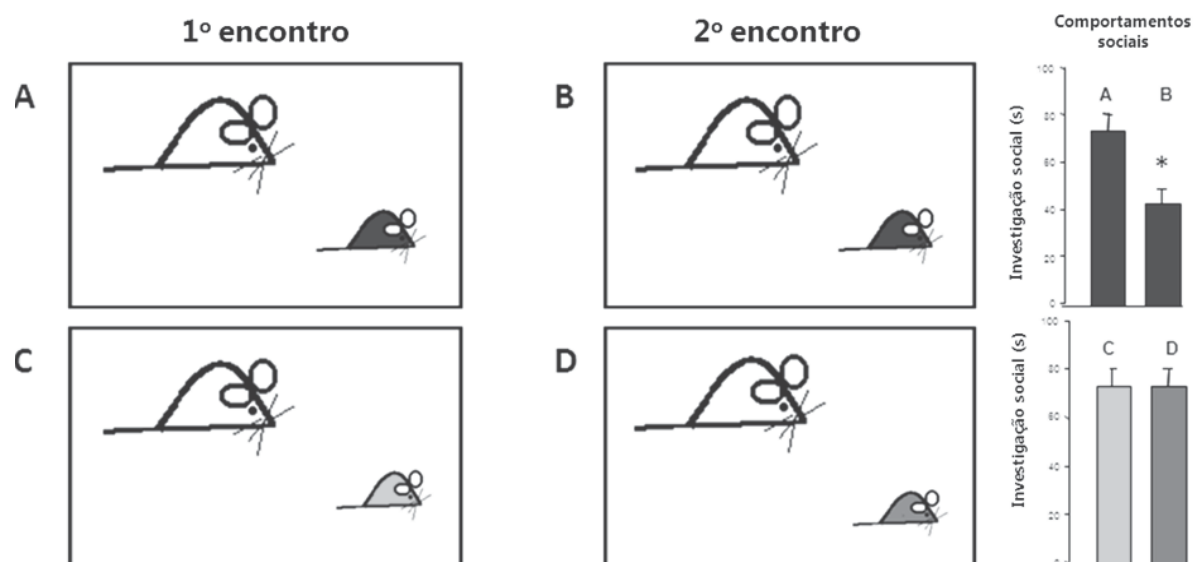
#### 4.7. TESTE DE RECONHECIMENTO SOCIAL MODIFICADO

O teste foi adaptado de Dantzer e colaboradores (DANTZER et al., 1987) e consiste em introduzir uma mesma espécie de animal juvenil (intruso) na gaiola de alojamento do animal adulto isolado durante 48h (residente) para avaliar o animal adulto. Este animal jovem está isolado em um pequeno compartimento transparente com vários orifícios (figura 13), para que o mesmo não tenha como escapar do animal que irá reconhecê-lo (residente). Tem-se a interação do residente com o animal intruso por 5 minutos. Após a primeira apresentação, o intruso é retirado da gaiola e aguarda por 20 minutos até a próxima apresentação. O mesmo intruso é então apresentado pela segunda vez ao mesmo residente e a interação é quantificada durante 5 minutos. No final, o tempo de exploração ativa do residente ao intruso é comparado entre a primeira e a segunda apresentações.



**Figura 13.** Representação do Teste de Reconhecimento Social modificado. **(A)** Animal filhote (30 dias de vida) no compartimento transparente para ser apresentado ao animal adulto residente. **(B)** Animal residente explorando o animal filhote no compartimento transparente (imagem da câmera de análise durante uma fase do teste) (Arquivo próprio).

Um animal com uma memória de reconhecimento social prejudicada interage com o intruso por um tempo semelhante em ambas as apresentações. O animal sem comprometimento da memória olfatória interage por menos tempo na segunda apresentação, reconhecendo o intruso (Figura 14).



**Figura 14.** Representação esquemática do paradigma intruso-residente e dos resultados usualmente observados. Num primeiro encontro (**A**) e (**C**) um intruso (representado pelo roedor menor) é apresentado ao rato residente (representado pelo rato maior) ao longo de 5 minutos. Num segundo encontro, realizado 20 minutos depois, o mesmo intruso (**B**) ou um intruso diferente (**D**) é apresentado ao rato residente ao longo de 5 minutos. A quantidade de comportamentos sociais observados nessas condições experimentais é mostrada nos gráficos à direita. A redução da quantidade de comportamentos sociais do primeiro para o segundo encontros com o mesmo intruso (colunas A e B, respectivamente) é interpretada como evidência de memória de reconhecimento social. A ausência de redução na quantidade de comportamentos sociais do primeiro para o segundo encontros com intrusos diferentes (colunas C e D, respectivamente) sugere que o efeito anterior não está associado à habituação (Retirado de Moura e Xavier, 2010).

#### 4.8. ANÁLISE DA PROTEÍNA GFAP POR WESTERN BLOT

Para a quantificação por western blot, as amostras de BO e SN foram homogeneizadas por sonicador, em tampão de lise (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM NaVO<sub>4</sub>, 1mM NaF) com inibidor de protease (Roche). Uma vez sonicadas, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos, recuperado o sobrenadante para quantificação de proteínas. A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford, em leitor de placas de 96 poços (Meridian ELX 800). Amostras do BO e SN contendo 40 µg de proteínas totais foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS a 12%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, as quais foram bloqueadas por uma solução de leite 5% para evitar ligações inespecíficas durante 1 hora e incubadas com anticorpo específico contra GFAP (anti-rabbit 1: 5.000) overnight à 4°C. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo Rabbit anti-HRP (1:50.000) por 2 horas. Os complexos imunes foram detectados usando o sistema de detecção de quimiluminescência ECL (GE Healthcare Life Sciences, Brasil) no fotodocumentador presente no departamento de Fisiologia da UFPR. Após a obtenção das imagens, as membranas sofreram o processo de Stripping, para retirada da marcação de GFAP, com Glicina 0,1M durante 20 minutos, seguida de uma lavagem rápida de TBST e incubação de 3 minutos com NaOH 0,2M. Após as lavagens, as membranas foram novamente bloqueadas e incubadas com o anticorpo Mouse Beta-actina (1:5.000) overnight, seguido de lavagens com TBST e incubação do secundário Mouse

anti-HRP (1:25.000). Os níveis de proteína foram quantificados por densitometria usando o software ImageJ v1.47 (National Institutes of Health, EUA).

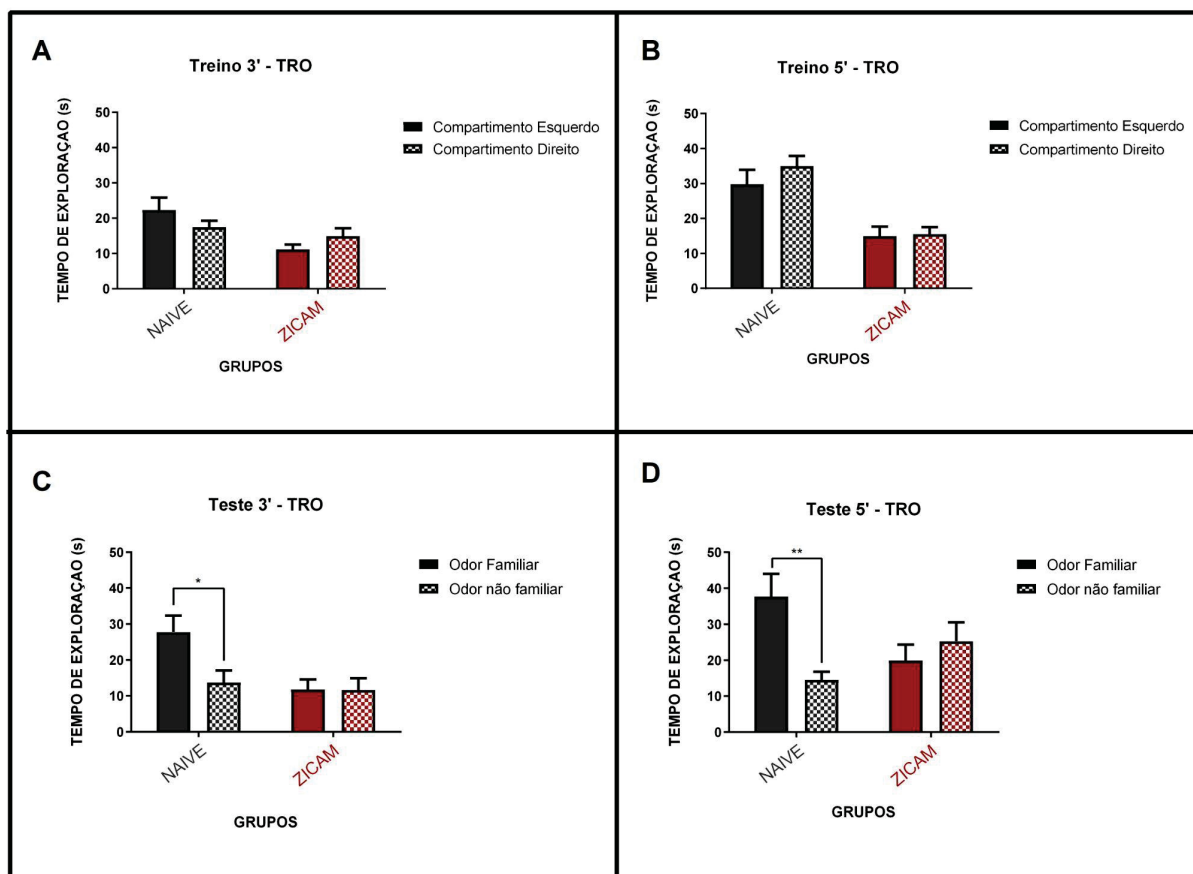
#### 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk e, se paramétricos, foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) de duas ou três vias, seguido por post hoc de Bonferroni. Os fatores utilizados foram: lesão, exploração (no caso do TRO) e tempo para os testes comportamentais. Para quantificação por western blot foi considerado lesão e tratamento. Além disso, foi considerado o nível de significância de  $P \leq 0,05$  para que se rejeite a hipótese de nulidade e os valores foram expressos como média + erro padrão da média (E.P.M.). Para o TRO foi utilizada ANOVA de três vias seguida de post-hoc de Fisher; para o Teste de Reconhecimento Social Modificado foi utilizada ANOVA de duas vias seguida do post-hoc de Fisher; e para a quantificação GFAP foi utilizada a ANOVA de uma via seguida do teste Newman-Keuls;

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE RECONHECIMENTO OLFATÓRIO (TRO)

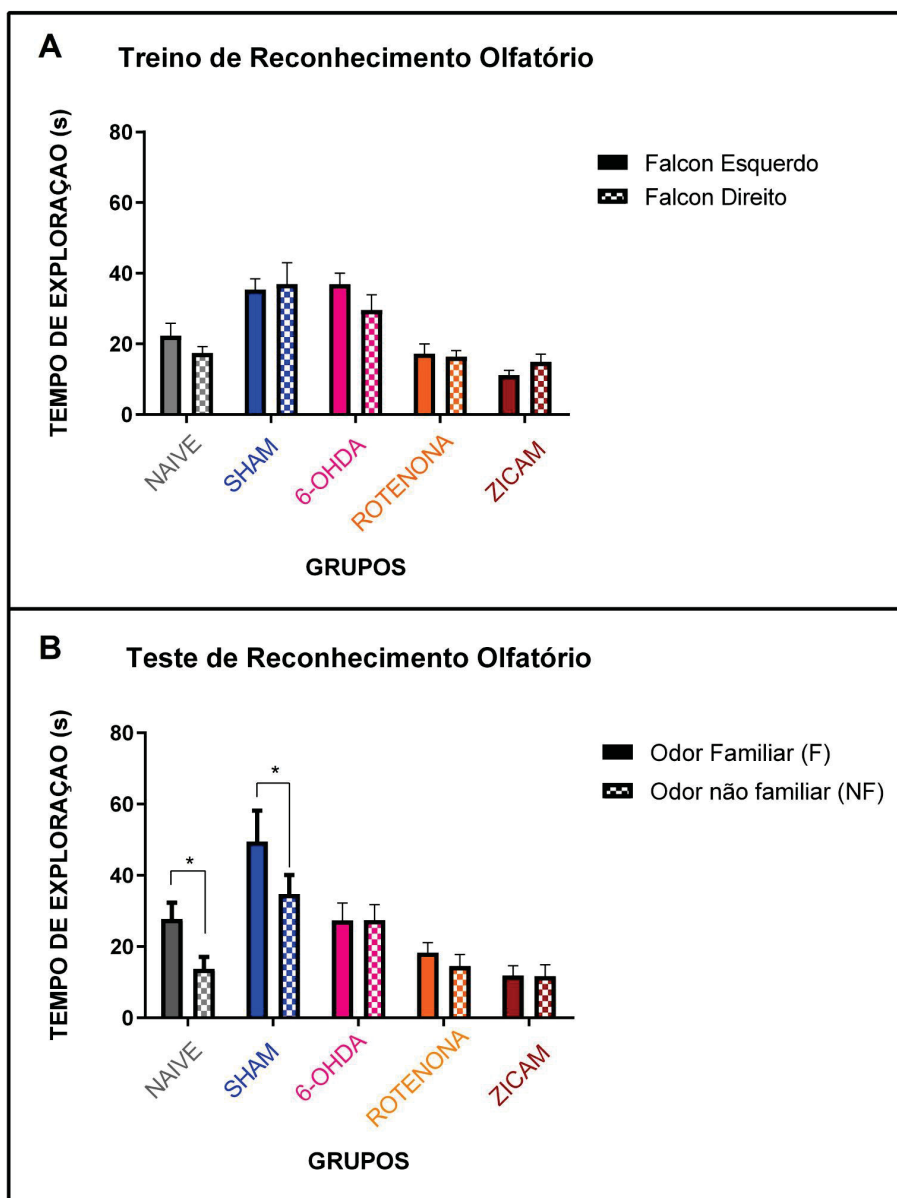
Os resultados estão demonstrados graficamente abaixo na figura 15. Primeiramente, foram testados dois tempos (3 ou 5 minutos) de treino e teste para os animais Naïve (animais sem nenhuma manipulação) e Zicam (grupo de controle positivo para anosmia) com o objetivo de estabelecer o tempo ideal para o teste e verificar possíveis diferenças entre eles. Durante os testes, os animais do grupo zicam exploraram os tubos falcon de maneira semelhante, pois não apresentavam diferenças (Figura 15 A e B). Enquanto isso, o grupo Naïve explorou mais o falcon com odor familiar do que o não familiar (Figura 15, C e D) [Naive 5 minutos (fator de interação:  $F(1, 32) = 8,567$ ;  $p = 0,0064$ ), Naïve 3 minutos (fator grupo:  $F(1, 34) = 6,632$ ;  $p = 0,0187$ )].



**Figura 15.** Representação gráfica de treino e teste do reconhecimento olfatório em dois tempos para validação do tempo ideal: 3 e 5 minutos.  $**p \leq 0,01$ ;  $*p \leq 0,05$ . (A) e (C) representam treinos de 5 e 3 minutos respectivamente, e (B) e (D) seus respectivos testes. N = 10 por grupo. ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc de Fisher.

Com o tempo de 3 minutos já estabelecido, realizamos o teste envolvendo os grupos que passaram por cirurgia, tanto os modelos animais clássicos de Parkinson (Rotenona e 6-OHDA) quanto o grupo de animais Sham (Figura 16, A). Nesta etapa, durante o treino, apesar da ANOVA apresentar o fator grupo significativo [Fator grupo:  $F(4, 72) = 21,67$ ;  $p < 0,0001$ ], na comparação pós-teste nenhum dos grupos mostrou preferência por localizar ou explorar qualquer um dos tubos falcon apresentados [Naive:  $p = 0,2321$ ; Sham:  $p = 0,7490$ ; 6OHDA:  $p = 0,1123$ ; Rotenona:  $p = 0,8199$ ; Zicam:  $p = 0,3539$ ]. Já durante o teste, os grupos que não apresentaram comprometimentos olfatórios (Naive e Sham) exploraram com um tempo significativamente maior o tubo falcon com odor de cepilho familiar em relação ao não familiar [Naive ( $p = 0,0107$ ) e Sham ( $p = 0,0429$ )], enquanto os grupos com hiposmia exploraram de forma semelhante ambos os falcons [6-OHDA ( $p = 0,9854$ ), Rotenona ( $p = 0,4586$ ) e Zicam ( $p = 0,9804$ )] (Figura 16, B) [Fator Tempo de Exploração:  $F(1, 70) = 6,092$ ;  $p = 0,0160$ ; Fator grupo:  $F(4, 70) = 13,83$ ;

$p < 0,0001$ ]. Desse modo, é demonstrado que o teste de reconhecimento olfatório é eficaz para avaliar o comprometimento olfatório em animais modelos de DP.



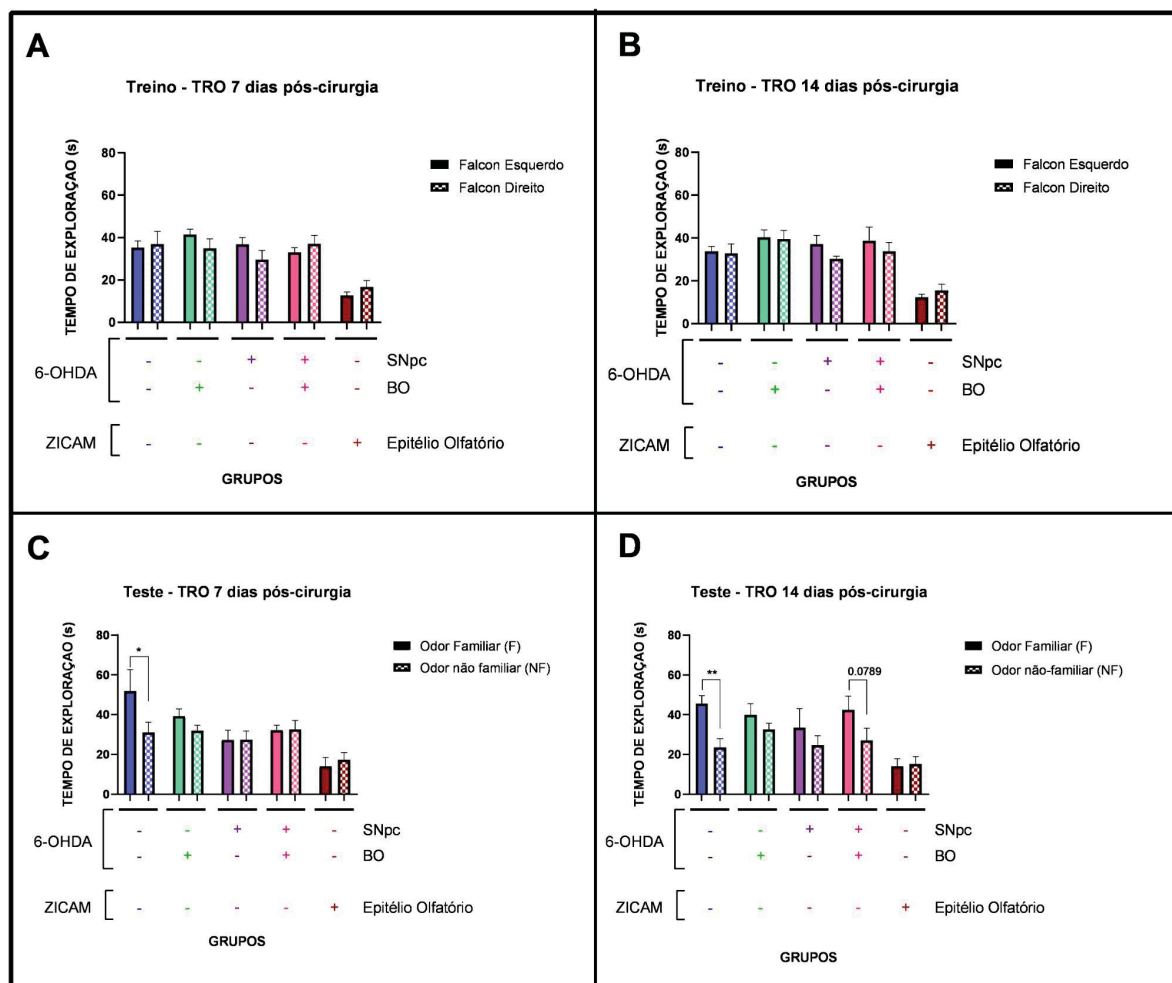
**Figura 16.** Representação gráfica da padronização do teste do reconhecimento olfatório para modelos animais clássicos da doença de Parkinson. **(A)** representa o treino e **(B)** seu teste.  $N = 10$  por grupo,  $*p \leq 0,05$ , comparando o tempo de exploração ativa entre falco direito e esquerdo no treino e em odor familiar e não familiar nos testes. ANOVA de duas vias seguida do teste post hoc de Fisher.

## 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS PRINCIPAIS

### 3.2.1 Teste de Reconhecimento Olfatório (TRO)

Sete dias após a cirurgia, os animais do experimento 1 passaram por testes comportamentais. Durante o treino de 7 dias no TRO (Fig. 17, **A**), ao compararmos o tempo de exploração entre o tubo falcon direito e o esquerdo, não houve diferenças significativas entre os grupos testados, quanto ao tempo de exploração [Fator grupo:  $F(4, 60) = 12,33$ ;  $p < 0,0001$ ; Fator Tempo de Exploração:  $F(1, 60) = 0,1262$ ;  $p = 0,7236$ ]. Já durante o Teste de 7 dias (Fig. 17, **C**), a ANOVA se apresentou significativa para o fator grupo [Fator grupo:  $F(4, 54) = 8,687$ ;  $p < 0,0001$ ], porém nas múltiplas comparações de Fisher, somente o grupo controle Sham SNpc e veículo no BO [(-) SNpc(-) BO] (identificado em azul) apresentou diferença significativa no tempo de exploração entre odor familiar e não familiar ( $p = 0,0496$ ), enquanto os demais não apresentaram tais diferenças intragrupo.

Os resultados dos animais do experimento 2, onde os testes foram realizados 14 dias após a cirurgia estereotáxica (8 dias após a microinfusão de 6-OHDA ou seu veículo no BO, Fig. 17, **B**) demonstraram que, da mesma forma que os animais do experimento 1, ao compararmos o tempo de exploração entre o tubo falcon direito e esquerdo intragrupo, não houve diferença significativa entre o tempo de exploração [Fator grupo:  $F(4, 58) = 17,27$ ;  $p < 0,0001$ ; Fator Tempo de Exploração:  $F(1, 58) = 0,8323$ ;  $p = 0,3654$ ]. E durante o Teste aos 14 dias (Fig. 17, **D**), a ANOVA se apresentou significativa para o fator grupo [Fator grupo:  $F(4, 54) = 8,687$ ;  $p = 0,0004$ ; Fator Tempo de Exploração:  $F(1, 56) = 9,452$ ;  $p = 0,0033$ ], porém nas múltiplas comparações de Fisher, somente o grupo controle Sham SNpc e veículo no BO [(-) SNpc(-) BO] apresentou diferença significativa no tempo de exploração entre odor familiar e não familiar ( $p = 0,0068$ ), enquanto os demais não apresentaram tais diferenças intragrupo. Entretanto, o grupo com a dupla lesão [(+) SNpc(+) BO] apresentou um valor de  $p$  que pode ser considerado limítrofe ( $p = 0,0789$ ).

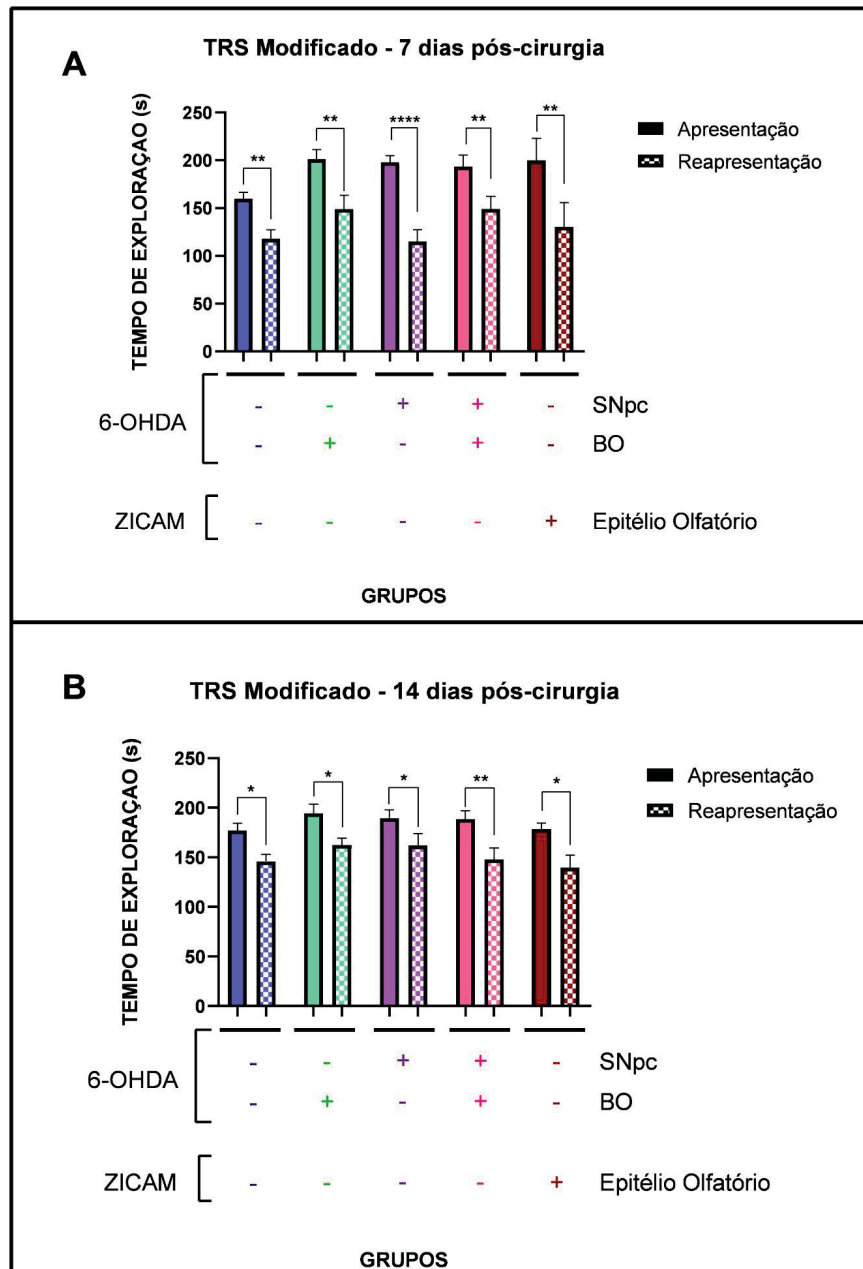


**Figura 17.** Representações gráficas do TRO em dois tempos dos diferentes grupos principais. **(A)** e **(B)** representam o treino em 7 e 14 dias pós-cirurgia, respectivamente. Já **(C)** e **(D)** representam os testes em 7 e 14 dias pós-cirurgia, respectivamente.  $N = 18$  por grupo,  $**p \leq 0,01$ ;  $*p \leq 0,05$ , comparando o tempo de exploração ativa entre falcon direito e esquerdo no treino e em odor familiar e não familiar nos testes. ANOVA de três vias seguida do teste post hoc de Fisher. Legenda: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; BO, bulbo olfatório; SNpc, substância nigra pars compacta; (+) presença de lesão por 6-OHDA ou Zicam; (-) ausência de lesão por 6-OHDA ou Zicam (manipulação Sham).

### 3.3.2 Teste de Reconhecimento Social Modificado (TRS modificado)

Os resultados do TRS modificado estão representados abaixo (Fig 18). Ao analisar o comportamento entre a apresentação e a reapresentação do animal intruso ao residente, todos os grupos apresentaram uma redução do tempo de exploração entre a reapresentação e a apresentação, independente da linha do tempo de realização do teste. Para os grupos que realizaram o teste 7 dias após a cirurgia (Fig 18, A) a ANOVA apresentou diferença significativa nos fatores Grupo e

Tempo de exploração [Fator Tempo de Exploração:  $F(1, 91) = 52,42$ ;  $p < 0,0001$ ; Fator grupo:  $F(4, 91) = 2,965$ ;  $p = 0,0237$ ]. O grupo controle [(-) SNpc(-) BO] apresentou  $p = 0,0095$ ; o grupo com somente lesão no BO [(-) SNpc(+) BO]  $p = 0,0067$ , somente lesão SNpc [(+) SNpc(-) BO]  $p < 0,0001$ , o grupo com a dupla lesão  $p = 0,0089$  e o controle para anosmia [(-) SNpc(+) BO (+) Epitélio olfatório, chamado de Zicam  $p = 0,0026$ ]. Já para os grupos que realizaram o teste 14 dias após a cirurgia (Fig 18, B) a ANOVA apresentou diferença significativa somente ao fator Tempo de exploração [Fator Tempo de Exploração:  $F(1, 128) = 31,55$ ;  $p < 0,0001$ ; Fator grupo  $F(4, 128) = 1,496$ ;  $p = 0,2072$ ]. O grupo controle [(-) SNpc(-) BO] apresentou  $p = 0,0247$ ; o grupo com somente lesão no BO [(-) SNpc(+) BO]  $p = 0,0125$ , somente lesão SNpc [(+) SNpc(-) BO]  $p = 0,0270$ , o grupo com a dupla lesão  $p = 0,0012$  e o controle para anosmia [(-) SNpc(+) BO (+) Epitélio olfatório, chamado de Zicam  $p = 0,0195$ ].

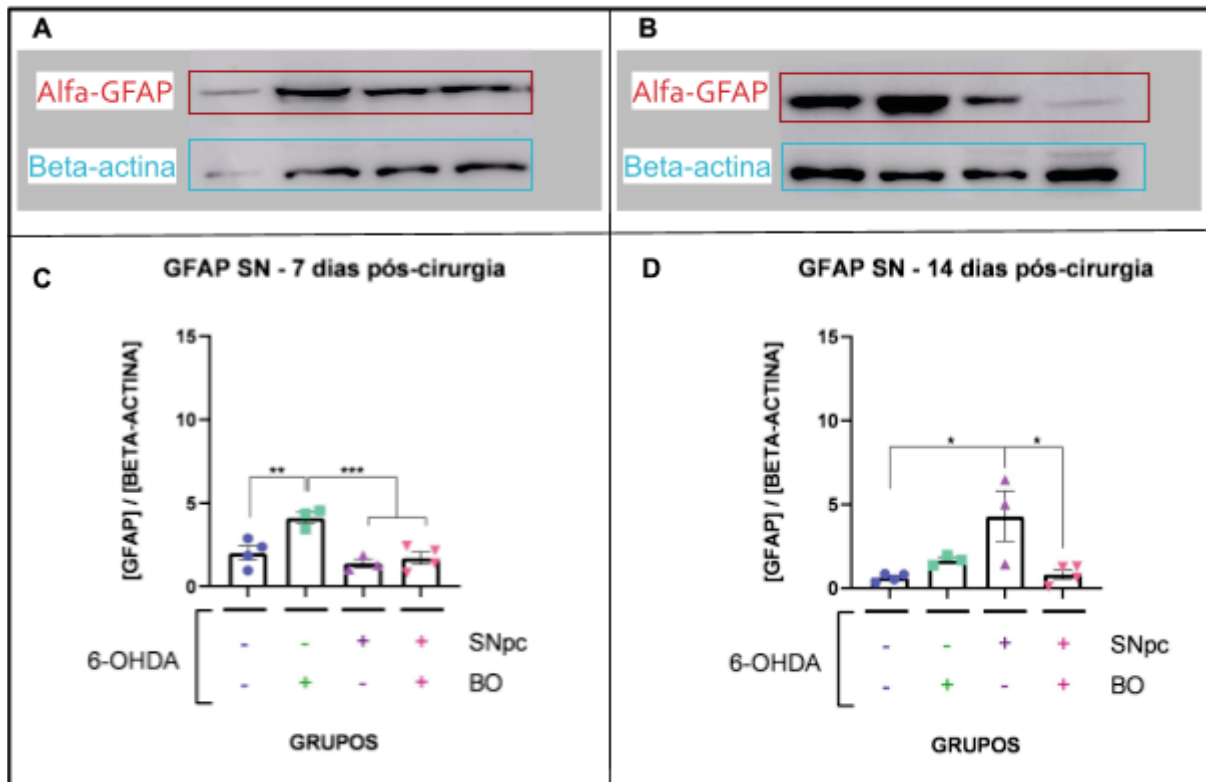


**Figura 18.** Representações gráficas do TRS modificado em dois tempos dos diferentes grupos principais. **(A)** representa a exploração do animal residente ao intruso durante a apresentação e a reapresentação 7 dias pós-cirurgia. **(B)** representa a exploração do animal residente ao intruso durante a apresentação e a reapresentação 14 dias pós-cirurgia. N = 18 por grupo, \*\*\*\*p ≤ 0,0001; \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*p ≤ 0,01; \*p ≤ 0,05, comparando o tempo de exploração ativa entre falcon direito e esquerdo no treino e em odor familiar e não familiar nos testes. ANOVA de três vias seguida do teste post hoc de Fisher. Legenda: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; BO, bulbo olfatório; SNpc, substância nigra pars compacta; (+) presença de lesão por 6-OHDA ou Zicam; (-) ausência de lesão por 6-OHDA ou Zicam (manipulação Sham).

### 3.3.3 Análise de GFAP por Western Blot

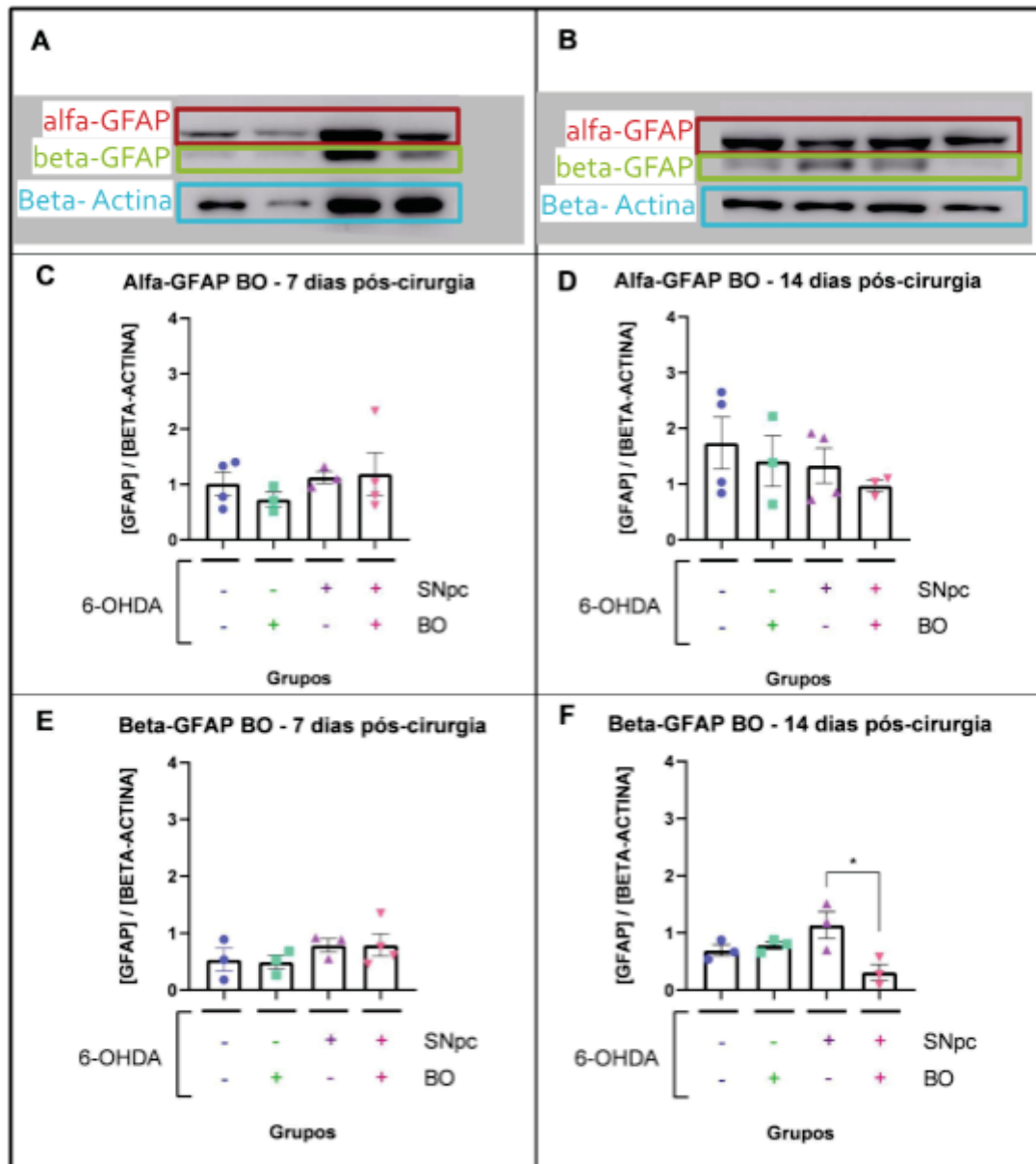
Para a quantificação da proteína GFAP, dividimos a análise em SN (substância negra - Fig 19) e BO (Fig 20) onde a expressão de GFAP foi estabelecida através do cálculo de razão da densidade ótica de suas bandas com a densidade ótica da proteína Beta-actina para padronização. Na comparação de expressão de GFAP nos grupos que realizaram os testes comportamentais e foram eutanasiados no dia 7 após a cirurgia, a ANOVA de uma via apresentou diferença significativa [ $F(3, 10) = 10,00$   $P=0,0023$ ] e na múltipla comparação de Fisher o grupo com somente a lesão no BO [(-) SNpc(+) BO] apresentou um aumento na concentração de GFAP em relação aos demais grupos {em comparação ao grupo [(-) SNpc(-) BO]  $p=0,0024$ ; ao grupo [(+) SNpc(-) BO]  $p=0,0007$ ; e ao grupo [(+) SNpc(+) BO]  $p=0,0009$ }.

Já na quantificação das expressões protéicas para os grupos 14 dias após a cirurgia, a ANOVA também demonstrou diferença significativa [ $F(3, 10) = 6,284$ ;  $p=0,0114$ ] e na análise de comparação múltipla somente o grupo com a lesão somente na SNpc [(+) SNpc(-) BO] apresentou aumento em relação ao grupo controle [(-) SNpc(-) BO] ( $p=0,0165$ ) e ao grupo dupla lesão [(+) SNpc(+) BO] ( $p=0,0231$ ).



**Figura 19.** Representação gráfica da análise de GFAP na SNpc nas duas linhas do tempo. (A) e (B) são as expressões de proteínas imunomarcadas de Alfa-GFAP e Beta-actina na SN de 7 e 14 dias pós-cirurgia, respectivamente. (C) representa a quantificação de GFAP nos grupos 7 dias pós-cirurgia. (D) representa a quantificação de GFAP nos grupos 14 dias pós-cirurgia. Para a quantificação, foi estabelecida a concentração de GFAP através do cálculo de razão com a proteína Beta-actina para padronização. N = 4 por grupo, \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$ . Legenda: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; BO, bulbo olfatório; SNpc, substância nigra pars compacta; (+) presença de lesão por 6-OHDA ou Zicam; (-) ausência de lesão por 6-OHDA ou Zicam (manipulação Sham).

Na quantificação de GFAP no BO observamos a divisão da proteína em seus dois principais subtipos (Alfa e Beta-GFAP), enquanto na SN GFAP se apresentou somente com o subtipo Alfa, o mais comumente encontrado. Ao avaliarmos a quantificação de GFAP nos animais 7 dias após a cirurgia, não foram encontradas diferenças significativas na comparação da ANOVA tanto para alfa quanto beta. [Alfa-GFAP 7 dias:  $F(3, 10) = 0,5359$ ;  $p=0,6682$ ; Beta-GFAP 7 dias:  $F(3, 9) = 0,8464$ ;  $p=0,5024$ ]. Já ao analisar a quantificação dos grupos de 14 dias, Alfa-GFAP novamente não apresentou diferenças significativas na ANOVA [ $F(3, 10) = 0,6774$ ;  $p=0,5855$ ], porém para Beta-GFAP houve um aumento significativo do grupo somente com a lesão no BO [(-) SNpc(+)] para o grupo com a dupla lesão [(+) SNpc(+)] [ $p=0,0191$  /  $F(3, 8) = 5,127$ ;  $p=0,0287$ ].



**Figura 20.** Representação gráfica da análise de GFAP no BO nas duas linhas do tempo. **(A)** e **(B)** são as expressões de proteínas imunomarcadas de Alfa-GFAP, Beta-GFAP e Beta-actina no BO de 7 e 14 dias pós-cirurgia, respectivamente. **(C)** e **(E)** representam a quantificação de dois subtipos de GFAP (alfa e beta, respectivamente) nos grupos 7 dias pós-cirurgia. **(D)** e **(F)** representam a quantificação de dois subtipos de GFAP nos grupos 14 dias pós-cirurgia. Para tais quantificações, foram estabelecidas as expressões de GFAP através do cálculo de razão com a expressão da proteína Beta-actina para padronização. N = 4 por grupo, \* $p \leq 0,05$ . Legenda: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; BO, bulbo olfatório; SNpc, substância nigra pars compacta; (+) presença de lesão por 6-OHDA ou Zicam; (-) ausência de lesão por 6-OHDA ou Zicam (manipulação Sham).

### 3.3.4 Correlações de Pearson

As correlações de Pearson estão descritas na tabela abaixo (tabela 1) e divididas nos grupos 7 e 14 dias após a cirurgia. Para permitir a comparação entre

os dados de quantificação de GFAP e os parâmetros de discriminação olfatória, os dados do TRS modificado foram transformados em índice de discriminação social (IDS), seguindo a seguinte fórmula: [(tempo de exploração da apresentação - tempo de exploração da reapresentação) / tempo total do teste]. Para os dados do TRO, foi realizado o índice de discriminação olfatória (IDO), seguindo a seguinte fórmula: [(tempo de exploração odor familiar - tempo de exploração odor não familiar) / tempo total do teste].

<b>Tabela 1.</b> Correlações de Pearson entre parâmetros comportamentais e quantificação de GFAP		
<b>CORRELAÇÕES</b>	<b>7 DIAS APÓS CIRURGIA</b>	<b>14 DIAS APÓS CIRURGIA</b>
IDO x IDS	r = -0,1406; P = 0,6036	r = 0,2798; P = 0,2939
IDO x GFAP SN	r = -0,08542; P = 0,7621	<b>r = -0,5538; P = 0,0496*</b>
IDO x alfa GFAP BO	r = 0,3821; P = 0,1975	r = -0,04261; P = 0,8901
IDO x beta GFAP BO	r = 0,2490; P = 0,4119	<b>r = -0,5351; P = 0,0486*</b>
IDS x GFAP SN	r = -0,01274; P = 0,9641	r = 0,1654; P = 0,5892
IDS x alfa GFAP BO	r = -0,01161; P = 0,9686	r = -0,2856; P = 0,3442
IDS x beta GFAP BO	r = 0,04930; P = 0,8729	r = -0,1142; P = 0,7237
GFAP SN x alfa GFAP BO	<b>r = -0,5927; P = 0,0328*</b>	r = 0,2402; P = 0,4293
GFAP SN x beta GFAP BO	<b>r = -0,6371; P = 0,0192*</b>	<b>r = 0,7581; P = 0,0043**</b>

Indicação das correlações: \*p<0,05; \*\*P<0,01. IDS = [(tempo de exploração da apresentação - tempo de exploração da reapresentação) / tempo total do teste]. IDO= [(tempo de exploração odor familiar - tempo de exploração odor não familiar) / tempo total do teste].

#### **4. DISCUSSÃO**

É comum associar o diagnóstico de DP ao estágio tardio da doença e consequentes manifestações clínicas motoras (Braak et al., 2003, 2004; Fahn, 2003; Ross et al., 2008). Enquanto isso, a identificação da DP a partir do distúrbio olfatório é mais rara, principalmente devido à falta de padronização mundial de um teste diagnóstico. Isso é parcialmente explicado por fatores transculturais, como pessoas que vivem em continentes diferentes e não conhecem exatamente os mesmos

odores. (Fullard et al., 2017; Rodrigues et al., 2020; Tarakad e Jankovic, 2017). Isso é particularmente importante para discutir aspectos como a identificação do odor, em que uma pessoa só pode nomear um odor se já tiver sido exposto, o que sugere maior envolvimento cognitivo (Hedner et al., 2010). Portanto, alguns testes de diagnóstico olfativo são padronizados em alguns países, geralmente avaliando a identificação de odores, como o Teste de Identificação de Odores da Universidade da Pensilvânia (UPSIT), que consiste em 40 odores microencapsulados associados a respostas de escolha forçada para identificá-los (Doty, 1996; Doty et al., 1984; Fornazieri et al., 2015; Hsu et al., 2015; Ogihara et al., 2011; Picillo et al., 2014). Além disso, existem testes olfatórios que avaliam a detecção ou discriminação de odores (Doty et al., 2015; Lötsch et al., 2008), que por sua vez consideram, respectivamente, a presença de um odor em baixa concentração ou diferentes limiares (Cain, 1982; Lawless, 2010) e a diferenciação entre dois ou mais odores (Weierstall e Pause, 2012). Obviamente, simular testes de identificação de odores para modelos animais é complexo, embora existam algumas semelhanças, não são padronizados para um modelo de DP (Liu et al., 2017; Olofsson et al., 2019) e dependem de habituação, aprendizado e cognição. A detecção é certamente uma ferramenta a ser considerada e melhor investigada para modelos animais de DP; no entanto, a discriminação de odores ainda é a abordagem mais utilizada neste contexto. Dentre os testes de discriminação olfatória em roedores existem diversos protocolos e dispositivos utilizados, além de estímulos olfatórios de diferentes classes, como odores sociais, não sociais, apetitivos e aversivos (Arbuckle et al., 2015; Cho et al., 2018; Fleming, 2014; Ilkiw et al., 2018; Jakupovic et al., 2008; Mihalick et al., 2000; Prediger et al., 2006; Rodrigues et al., 2014, 2018; Staples et al., 2008; Tillerson et al., 2006; Yang e Crawley, 2009).

Assim como em nosso estudo prévio (Ilkiw et al., 2018), observamos que nos grupos 7 dias após a cirurgia estereotáxica com microinfusão intranigral de 6-OHDA, que as lesões dopaminérgicas na SNpc e OB-gl foram capazes de causar prejuízo olfatório de maneira muito semelhante ao Zicam. Foi relatado que um aumento do número de neurônios TH-ir dentro da camada glomerular encontrados na DP em cérebros post-mortem (Huisman et al., 2004; Mundiñano et al., 2011) e modelo animal rotenona de DP (Rodrigues et al., 2014) pode estar associada ao comprometimento olfatório. Em relação ao grupo com a dupla lesão por 6-OHDA, nossos resultados demonstraram que não houve diferença de exploração ativa no

TRO, resultado que à principio parece contrário ao que encontramos em 2018 com o teste de discriminação olfatório, onde os animais deste grupo haviam preferencialmente explorado o compartimento com odor familiar durante um tempo maior em relação ao compartimento de odor não familiar no teste de discriminação olfatório (TDO). O TDO, adaptado de Soffie e Lamberty (1988), foi baseada nas observações iniciais de Carr et al. (1976) que mostraram que ratos machos maduros significativamente preferem seu próprio odor a nenhum odor e modificado para melhor adaptação (Prediger et al, 2005; Rodrigues et al., 2014; Ilkiw et al., 2018; Rodrigues et al., 2020).

A principal diferença entre os testes TDO e TRO se dá no que é considerado exploração do odor. O TDO é um teste que avalia o tempo de permanência do animal em um ambiente, ou seja, o animal é colocado aleatoriamente entre dois compartimentos (onde ele só tem estas duas escolhas, a cada teste o animal era colocado virado para um lado diferente a fim de evitar um viés de escolha) sendo que um animal sem prejuízo olfatório apresenta preferência pelo ambiente com o próprio odor ao outro ambiente, que só possui cepilho limpo, enquanto o animal com prejuízo olfatório não diferencia os dois ambientes e explora os dois compartimentos em tempos semelhantes (Carr et al., 1976; Soffie e Lamberty, 1988; Prediger et al., 2005; Rodrigues et al., 2014; Ilkiw et al., 2018; Rodrigues et al., 2020). Já no TRO, consideramos o tempo de exploração ativa do odor, ou seja, o tempo em que o animal passou interessado no tubo falcon e comportamentos como usar o tubo para escalar ou o de morder a fita adesiva que demarca a proximidade ao tubo foram excluídos da contagem de tempo. Isso nos proporciona uma análise muito mais clara do interesse do animal na detecção olfatória e de que quando há um tempo de exploração maior significa genuinamente que ele apresentou um maior interesse pelo odor do falcon. No TDO, possíveis alterações motoras nos animais podem prejudicar a análise, já que impediriam o animal de se locomover livremente pelos dois ambientes. O posicionamento aleatório do animal no início do teste permite que essa diferença se dissipe, porém não há como determinar se o animal está mesmo explorando o ambiente em que ele se encontra ou simplesmente não o diferencia mas não apresenta interesse em explorar.

Com relação à análise do TRO, há também o fato de que a exploração ativa do odor dependa exclusivamente do interesse do animal. Ou seja, se o animal

apresenta um comportamento anedônico, ele tende automaticamente a explorar com menos afinco o ambiente em que se encontra (Matheus et al., 2016; Chiu et al., 2015; Ilkiw et al., 2018). Em animais modelos de Parkinsonismo, a anedonia é um sinal que representa a falta de interesse e se apresenta com muita frequência sendo muito utilizado para avaliar comportamento tipo-depressivo. A depressão causa alterações nos circuitos olfativos, reduzindo o limiar olfativo, as habilidades de identificação e discriminação em humanos (Atanasova et al., 2010; Negoias et al., 2010). Analogamente, é mais esperado que pacientes com anosmia congênita exibam sinais de depressão (Croy et al., 2012). No estudo anterior, também vimos que os animais com a dupla lesão apresentaram maior comportamento anedônico que os demais grupos no teste de preferência à sacarose no tempo de 7 dias (incluindo os grupos lesionados, que também apresentaram anedonia) (Tadaiesky et al., 2008; Matheus et al., 2016; Chiu et al., 2015). Isso demonstra que mesmo nessa situação, os animais foram capazes de explorar ativamente os tubos falcos no TRO mas que não os diferenciam.

Desse modo, podemos entender que a exploração dos animais em 7 dias pode ter sido prejudicada por apresentarem um alto comportamento de anedonia, amplamente descrito na literatura e observado em nosso estudo anterior através do teste de preferência a sacarose (Tadaiesky et al., 2008; Matheus et al., 2016; Chiu et al., 2015; Ilkiw et al., 2018).

Ao contrário de resultados do TDO em 2018, aos 14 dias após a cirurgia ambos os grupos lesionados seletivamente no SNpc e na camada glomerular do BO apresentaram alterações olfatórias de detecção. Considerando as diferenças entre os tempos de exploração do grupo com dupla lesão em 14 dias é limítrofe e se assemelha bastante ao comportamento do grupo controle, demonstrando uma possível reversão do prejuízo olfatório. A hipótese que melhor poderia explicar este comportamento seria a existência de uma via dopaminérgica bulbo-nigral, descoberta em 2015 por Hoglinger e colaboradores, e que uma lesão dupla especificamente dopaminérgica poderia equilibrar o aumento de neurônios TH-ir a fim de melhorar os sintomas de prejuízo olfatório (Hoglinger et al., 2015). Além disso, comparando diretamente o interesse pela exploração ativa no TRO e o comportamento anedônico observado em nosso estudo anterior, observamos que os animais de 7 dias com dupla lesão apresentavam o maior comportamento anedônico e que isso sofreu uma recuperação em 14 dias, com esse grupo

apresentando um comportamento melhor do que o grupo somente lesionado na SNpc, também demonstrando que o grupo com a dupla lesão apresenta um comportamento interessante de reversão de ambos os quadros.

No estudo atual, as contagens de neurônios TH-ir na camada glomerular do BO e na SNpc não foram realizadas pois são dados que já obtivemos em nosso estudo anterior (Ilkiw et al., 2018). Em nosso estudo anterior, o grupo 6-OHDA (+)SNpc/(-)BO não apresentou aumento de neurônios TH-ir no OB-gl em relação ao grupo controle. Esse comprometimento olfatório sem aumento da densidade de células periglomerulares corrobora com achados anteriores de Höglinger e colaboradores (2015), que também não encontraram aumento de neurônios dopaminérgicos em OB-gl após 6-OHDA intranigral em ratos. Este resultado em um primeiro momento surpreende, pois um estudo anterior do nosso laboratório observou um aumento de 50% de neurônios TH-ir na camada glomerular do BO (Rodrigues et al., 2014). Porém, a principal diferença entre os estudos se dá no modelo utilizado, já que Rodrigues e colaboradores utilizaram Rotenona para a mimetização da DP. Além disso, os resultados de Huisman e colegas (2008) mostraram um resultado ainda mais intrigante que contestou o chamado aumento neuronal de TH-ir em OB-gl em humanos, conforme encontrado em seu estudo anterior (Huisman et al., 2004). De fato, nossos resultados mostram que o comprometimento olfatório apresentado no grupo com lesão OB-gl pode estar associado à perda neuronal periglomerular de TH-ir em comparação ao controle. Nesse sentido, nosso resultado aponta que os neurônios periglomerulares TH-ir são responsáveis pela modulação olfatória, portanto, uma diminuição da densidade dessas células impacta negativamente o desempenho olfativo, como demonstrado anteriormente (Doty, 2012; Mundiñano et al., 2011; Ilkiw et al., 2018).

Notavelmente, as lesões induzidas por neurotóxicos no OB de camundongos são recuperadas por um aumento no número de neurônios recém-nascidos provenientes da zona subventricular (SVZ), onde são células-tronco (Hoglinger et al., 2004; Tieu, 2011). Tais células são recrutadas e então migram pela via rostral, diferenciando-se apenas em interneurônios dopaminérgicos e GABAérgicos nas regiões glomerular e camadas granulares, aproximadamente 7 dias após a lesão de 6-OHDA (Lazarini et al., 2014). Portanto, esses neurônios recém-nascidos são capazes de repovoar (pelo menos parcialmente) a camada glomerular do BO, recuperando então as entradas sensoriais olfatórias através de

mecanismos compensatórios, através da ativação da via vomeronasal e do sistema olfatório acessório (Salazar et al., 2015). A via vomeronasal é uma via olfatória acessória descrita como um sistema primitivo encontrado em vários mamíferos (Savic et al., 2009; Trotier, 2011), mas em humanos o sistema está presente apenas no feto (Salazar et al., 2015). Em roedores, a via vomeronasal foi relatada pela primeira vez como capaz de identificar feromônios e os odores comuns eram percebidos pela via olfatória (principal sistema olfatório), mas atualmente esse conceito tem sido questionado (Keverne, 2005; Shepherd, 2006 apud Salazar et al., 2015).

O paradigma intruso-residente vem sendo intensamente empregado em estudos para avaliar a memória de reconhecimento social em roedores (Moura e Xavier, 2010). Tipicamente, ratos adultos (residentes) são expostos a dois encontros de 5 minutos cada com um mesmo intruso juvenil ou com juvenis diferentes; o intervalo entre encontros é usualmente 20-40 minutos. A quantidade de comportamentos sociais do residente, no segundo encontro, em relação a um intruso familiar é substancialmente menor do que o observado no primeiro encontro, o que não ocorre quando o segundo encontro envolve um juvenil novo; esse resultado caracteriza memória de reconhecimento social e é considerado um teste clássico de avaliação de memória (Dantzer, Bluthé, Koob, & Le Moal, 1987; Engelmann, Wotjak, & Landgraf, 1995; Grant, 1963; Popik, Ventulani, Bisaga, & van Ree, 1991; Thor & Holloway, 1982). Há peculiaridades na memória de reconhecimento social que, aparentemente, a distingue de outros tipos de memória. Por exemplo, sua duração é maior do que a da memória operacional, mas menor do que uma memória do tipo espacial ou aversiva. Isso tem levado alguns autores a caracterizá-la como um tipo específico de memória, distinto de outros já descritos na literatura da área (Ferguson et al., 2002) e aparentemente, a memória de reconhecimento social pode ser caracterizada como uma entidade única. Diferentes laboratórios vêm defendendo que ela se baseia preponderantemente em informações de natureza olfatória (Ferguson et al., 2000; Ferguson et al., 2002; Dantzer et al., 1988). Embora as tarefas de identificação e discriminação de odores sejam mais dependentes de processos cognitivos (Hedner et al., 2010), na DP, o olfato e a cognição são considerados distúrbios independentes (Doty et al., 1989). Desse modo, realizamos o TRS para avaliar se o prejuízo olfatório dos animais modelo de Parkinson, assim como o modelo de anosmia utilizado, são alterações

relacionadas ao prejuízo de detecção sensorial ou podem ser relacionadas a processos cognitivos relacionados à memória olfatória. Como resultado, visualizamos que todos os grupos foram capazes de identificar o animal intruso na reapresentação, ou seja, os residentes exploraram em menor tempo na reapresentação por, possivelmente, lembrarem do intruso. Esse resultado foi encontrado de maneira similar por Prediger e colaboradores (2005), onde eles observaram que o tempo de lesão e a idade do animal influencia diretamente na memória olfatória de animais modelos de Parkinsonismo.

A escolha de investigar GFAP como marcador da neuroinflamação na DP vem da amplitude do seu papel como principal proteína de filamento intermediário em astrócitos maduros e também um componente importante do citoesqueleto em astrócitos durante o desenvolvimento (Middeldorp & Hol, 2011). Ainda, estudos demonstram o aumento significativo da expressão de GFAP em modelos de Parkinson e também em amostras de encéfalos post-mortem de pacientes (Chou et al., 2014; Clairembault et al., 2014; Bassani et al., 2015; Tieu et al., 2017). Alguns estudos examinaram a GFAP sérica na DP, encontrando níveis séricos elevados de GFAP em comparação aos controles (Su et al., 2012; Oeckl et al., 2019) e, além disso, estudos recentes têm focado em analisar GFAP como um possível biomarcador da DP no plasma (Tang et al., 2023).

A descoberta de diferentes variantes de splicing de GFAP deu um impulso adicional para explorar esta proteína com mais detalhes. Além disso, foram identificadas diferentes subpopulações de astrócitos, que provavelmente têm tarefas distintas na fisiologia e patologia do cérebro, e que não são classificadas apenas por sua aparência espacial e temporal, mas também por sua expressão específica de filamentos intermediários, incluindo distintas isoformas de GFAP (Middeldorp & Hol, 2011). A presença dessas isoformas aumenta a complexidade do citoesqueleto dos astrócitos e provavelmente está subjacente a funções específicas do subtipo. A isoforma GFAP $\delta$  (delta) é preferencialmente expressa por astrócitos neurogênicos na ZSV, enquanto o GFAP- $\alpha$  é encontrado em um subconjunto de astrócitos em todo o cérebro. Da mesma forma, foi relatada a expressão dessas isoformas em material cerebral humano de pacientes com epilepsia, Alzheimer e glioma. O estudo de Kamphius e colaboradores (2012) demonstrou a expressão das isoformas de GFAP em modelos de camundongos na doença de Alzheimer (DA). No córtex,

cerebelo e estriado de camundongos de tipo selvagem, foram detectados transcritos para Gfap- $\alpha$ , Gfap- $\beta$ , Gfap- $\gamma$ , Gfap- $\delta$ , Gfap- $\kappa$  e uma isoforma recentemente identificada Gfap- $\zeta$  (Kamphius et al., 2012). Seus níveis de expressão relativa foram semelhantes em todas as regiões estudadas. GFAP $\alpha$  mostrou uma expressão ampla, enquanto a distribuição de GFAP $\delta$  foi proeminente no SVZ, fluxo migratório rostral (RMS), astrócitos neurogênicos da zona subgranular (SGZ) e astrócitos subpial (Kamphius et al., 2012).

Na quantificação de GFAP por western blot, ao usar um gel 12% ou mais concentrado e anticorpo primário policlonal (panGFAP), foi possível diferenciar as isoformas principais de GFAP (que se localizam entre 55 e 37 kDA), encontradas na estrutura encefálica analisada. Sabe-se que na SNpc a isoforma mais comum é a GFAP- $\alpha$ , pois esta é a mais abundante no cérebro. Já em relação ao BO, esperava-se que as mais visíveis fossem GFAP- $\alpha$  e GFAP $\delta$  por serem mais comuns em geral e nas regiões de neurogênese, respectivamente. Surpreendentemente, GFAP- $\beta$  se mostrou em grande quantidade na imunomarcação por GFAP no BO, o suficiente para ser quantificada e demonstrou uma grande ligação com os sintomas de prejuízo olfatório.

Curiosamente, a análise de GFAP na SN em 7 dias demonstrou um aumento significativo somente no grupo que apresentou a lesão única no BO para todos os demais grupos, enquanto em 14 dias vimos que somente o grupo com a lesão na SNpc apresentou um aumento em relação ao controle e ao grupo com a dupla lesão, mas não ao grupo com lesão somente no BO. Comumente é visto um aumento na expressão de células GFAP+ na SNpc após a lesão (Liang et al., 2019; Deng et al., 2021; Jayaraj et al., 2022). Porém, um estudo recente observou que a imunorreatividade de GFAP foi maior em áreas relacionadas ao início dos sintomas da DP segundo o estagiamento de Braak e menor em áreas motoras (supostamente afetadas posteriormente). Desse modo, a auto imunorreatividade anti-GFAP de diferentes áreas do cérebro se correlaciona com a disseminação da neurodegeneração histopatológica na DP. Eles trabalham com a hipótese de que autoanticorpos GFAP são fisiológicos, mas podem estar envolvidos como um cofator na patogênese da DP (Gschmack et al., 2022). Nesse sentido, uma lesão no BO afeta a expressão de GFAP da SN possivelmente relacionado às alterações dopaminérgicas e afetando de maneira retrógrada a SNpc pela via bulbo-nigral (Hoglinger et al., 2015), além de poder afetar diretamente as projeções

serotoninérgicas e noradrenérgicas provenientes dos núcleos da rafe e *locus coeruleus*, respectivamente (Mundiñano et al., 2011; Doty, 2012), o que corresponde à evolução do estagiamento de Braak (Braak et al., 2004). Ainda, Murray e colaboradores (2022) encontraram o aumento de GFAP na camada glomerular do BO em amostras post-mortem de pacientes portadores de DP comparados às amostras de pacientes controles, resultado que parece corroborar com nossos achados em 14 dias. Intrigantemente, os animais dos grupos com a dupla lesão não apresentaram aumento significativo de GFAP em nenhum dos tempos, sendo BO ou na SN. Estudos demonstram que a expressão de GFAP tende a seguir locais de lesões específicas, como em caso de AVEs (Zwirner et al., 2021). Porém, neste caso de dupla lesão, a segunda lesão no bulbo olfatório parece produzir um efeito similar aos animais controles em relação à expressão de GFAP, o que poderia significar que a diminuição dos interneurônios periglomerulares poderia também diminuir a neuroinflamação local. Em contrapartida, a redução destes neurônios possivelmente estimula a ZSV, região diretamente responsável pela criação de novos neurônios para o BO e que é sinalizada por astrócitos e micróglia (Ilkiw et al., 2019). Futuramente é interessante a investigação da ZSV para determinar não só a expressão de GFAP sobre a neurogênese, mas a neurogênese em si como importante fator para o prejuízo olfatório na DP.

Ao realizarmos as correlações de Pearson entre parâmetros comportamentais e as quantificações de GFAP no BO e SN observamos resultados que nos ajudam a entender ainda mais o papel da neuroinflamação sobre a olfação. Nos grupos de 7 dias após a cirurgia, foram observadas correlações negativas entre as quantificações de GFAP na SN e as de GFAP (alfa e beta) no BO. Esse dado sugere que mesmo não havendo diferenças significativas nas análises de GFAP alfa e beta no BO em 7 dias, quando a concentração de GFAP estava menor no BO a mesma se apresentava maior na SN. Isso demonstra o papel da migração pró-regeneração dos astrócitos a fim sinalizar e recuperar uma área lesionada (Cooper and Isacson, 2004; Worlitzer et al., 2012). Já nos grupos de 14 dias após a cirurgia, observamos uma correlação negativa entre o desempenho no TRO (transformado em IDO para a correlação) com a quantificação de GFAP SN e beta-GFAP no BO. O estudo de Snyder e colaboradores (2016) demonstrou que a linhagem de ratos knockout para GFAP, chamados de TK-GFAP, apresenta uma

diminuição de 51% nos interneurônios do bulbo olfatório e que isso apresenta um impacto importante na detecção de odores finos (Matsutani & Leon, 1993; Snyder et al., 2016). Surpreendentemente, a correlação entre GFAP na SN e beta-GFAP no BO foi positiva para os grupos de 14 dias. Isso demonstra que com as lesões mais maduras, a migração pró-regeneração parece seguir uma espécie de escala de prioridade, se apresentando de forma similar no BO e na SN, apesar de se tratarem de isoformas diferentes, enquanto a isoforma alfa no BO não apresentou tal correlação. A avaliação da importância das isoformas na DP ainda é pouco estudada e requer mais atenção por apresentar GFAP se demonstrar um fator com bastante potencial para biomarcação e estabelecimento do diagnóstico precoce.

## 5. CONCLUSÕES

- Desenvolvemos e padronizamos um teste de detecção de odor social, o TRO, e o avaliamos para dois modelos de Parkinson clássicos (6-OHDA e Rotenona), além de testarmos em um modelo de anosmia sem o contexto de Parkinsonismo.
- Os grupos 7 dias com as lesões dopaminérgicas SNpc e BO foram capazes de causar prejuízo olfatório de maneira muito semelhante ao Zicam. O grupo com a dupla lesão por 6-OHDA não apresentou diferença de exploração ativa no TRO, demonstrando presença de prejuízo olfatório e contrariando resultados prévios obtidos com outro teste de detecção de odor.
- Aos 14 dias ambos os grupos lesionados seletivamente no SNpc e na camada glomerular do BO apresentaram alterações olfatórias de detecção e grupo com dupla lesão se apresentou como limítrofe na análise estatística e se assemelha bastante ao comportamento do grupo controle, demonstrando uma possível reversão do prejuízo olfatório.
- No TRS, todos os grupos foram capazes de identificar o animal intruso na reapresentação, ou seja, os residentes exploraram em menor tempo na reapresentação por lembrarem do intruso.
- A análise de GFAP na SN em 7 dias demonstrou um aumento significativo somente no grupo que apresentou a lesão única no BO para todos os demais grupos, enquanto em 14 dias somente o grupo com a lesão na SNpc apresentou um aumento em relação ao controle e ao grupo com a dupla lesão, mas não ao grupo com lesão somente no BO.
- Futuramente é interessante investigar a ZSV para determinar não só a expressão de GFAP sobre a neurogênese, mas a neurogênese em si como importante fator para o prejuízo olfatório na DP.
- A avaliação da importância das isoformas na DP ainda é pouco estudada e requer mais atenção por apresentar GFAP se demonstrar um fator com bastante potencial para biomarcação e estabelecimento do diagnóstico precoce.

## 6. REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D. et al. Depression in Parkinson disease — epidemiology, mechanisms and management. *Nat. Rev. Neurol.* (2012) 8, p.35–47
- AIRES, M. M. (2012) *Fisiologia*. 4ª ed., Ed. Guanabara Koogan/GEN, Rio de Janeiro, RJ. ISBN: 9788527721004
- APFELBACH, R., BLANCHARD, C. D., BLANCHARD, R. J., HAYES, R. A., AND MCGREGOR, I. S. (2005). The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29, 1123–1144. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.05.005.
- ANTKIEWICZ-MICHALUK L. Endogenous risk factors in Parkinson's disease: dopamine and tetrahydroisoquinolines. *Pol J Pharmacol.* 2002 Nov-Dec;54(6):567-72. Review.
- ALBIN RL, YOUNG AB, PENNEY JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences.*(1989) 12: p.366–375.
- AMBROSI G., CERRI S. and BLANDINI F. (2014) A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* (Vienna) 121, 849 – 859.
- ANSARI KA and JOHNSON A. Olfactory function in patients with Parkinson's disease. *J Chronic Dis.* 1975 Oct; 28(9):493-7.
- ARBUCKLE, E. P., SMITH, G. D., GOMEZ, M. C., AND LUGO, J. N. (2015). Testing for odor discrimination and habituation in mice. *Journal of Visualized Experiments* 2015, 1–7. doi:10.3791/52615.
- ATANASOVA, B. et al. Olfaction: A potential cognitive marker of psychiatric disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.*32 (2008) p.1315–1325
- BARBOSA MT, CARAMELLI P, MAIA DP, et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). *Mov Disord.* 2006; 21(6): 800–808.
- BARRIENTOS RM, KITT MM, WATKINS LR, MAIER SF. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience.* 2015; 309:84–99. [PubMed: 25772789]
- BASSANI TB, VITAL MA, RAUH LK. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease and therapeutic evidence of anti-inflammatory drugs. *Arq Neuropsiquiatr.* 2015; 73:616–623. [PubMed: 26200058]
- BEAL MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol.* 2005; 58:495–505. [PubMed: 16178023]
- BERENDSE HW, ROOS DS, RAIJMAKERS P, DOTY RL. Motor and non-motor correlates of olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2011 Nov 15;310(1-2):21-4.

BERTLER A, ROSENGREN E. On the distribution in brain of monoamines and of enzymes responsible for their formation. *Experientia*. 1959; 15:382–384. [PubMed: 13799996]

BIRKMAYER W, HORNYKIEWICZ O. The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klin Wochenschr*. 1961; 73:787–788. [PubMed: 13869404]

BLONDER, L. X. et al. Dopaminergic modulation of memory and affective processing in Parkinson depression. *Psychiatry Res*. 2013 November 30; 210(1): p.146–149.

BOVÉ J. and C. PERIER, Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. Volume 211, 1 June 2012, Pages 51-76, ISSN 0306-4522, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>.

BOVOLENTA and FELICIO. How do demographic transitions and public health policies affect patients with Parkinson's disease in Brazil? *Dovepress: Clinical Interventions in Aging*. 2017:12

BRAAK H, GHEBREMEDHIN E, RÜB U, BRATZKE H, DEL TREDICI, K: Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*, 2004, 318, p.121–134.

BRAAK H, RUB U, GAI WP, DEL TREDICI K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm*. 2003; 110: p517–36.

BRENNAN PA, KENDRICK KM. Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006 Dec 29;361(1476):2061-78. Review.

BROADHURST PL (1960) Experiments in psychogenetics. In: Eysenck HJ (ed) *Experiments in personality*. Routledge and Kegan Paul, London, pp 52–71

CABEZAS R., et al. Astrocytes Role in Parkinson: A Double-Edged Sword. Chapter: 20 in *Neurodegenerative Diseases*. Edited by Uday Kishore, ISBN 978-953-51-1088-0, 638 pages, Publisher: InTech, Chapters published May 15, 2013 under CC BY 3.0 license

CARR WJ, YEE L, GABLE D, MARASCO E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. *J Comp Physiol Psychol*. 1976;90:821–8.

CARLSSON A, LINDQVIST M, MAGNUSSON T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*. 1957; 180:1200. [PubMed: 13483658]

CAUDLE WM and ZHANG J. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in parkinson disease. *Experimental Neurology* 220 (2009) 230–233

CHAGAS, M. H. T. et al. Neuroimaging of depression in Parkinson's disease: a review. *International Psychogeriatrics*. (2013), 25:12, p.1953–1961.

CHAGAS, M. H. T. et al. Depression increases in patients with Parkinson's disease according to the increasing severity of the cognitive impairment. *Arq Neuropsiquiatr.* (2014) 72(6): p.426-429.

CHAUDHURI, K.R., HEALY, D.G., SCHAPIRA, A.H. National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* (2006).5, p.235-245.

CHEN J, et al. Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex. *J Mol Biol.* (2001) 314(4): p.683-94.

CHIOCA, L.R., ANTUNES, V.D., FERRO, M.M., LOSSO, E.M., & ANDREATINI, R. (2013). Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice. *Life Sci.* 92, p.971–975.

CHOU VP, KO N, HOLMAN TR, MANNING-BOĞ AB. Gene-environment interaction models to unmask susceptibility mechanisms in Parkinson's disease. *J Vis Exp.* 2014 Jan 7;(83):e50960. doi: 10.3791/50960. PMID: 24430802; PMCID: PMC4089441.

CICCHETTI F., DROUIN-OUELLET J., GROSS R. E.Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models?. *Trends in Pharmacological Sciences* 30 (9): 475-482, 2009.

CLAIREMBAULT T, LECLAIR-VISONNEAU L, NEUNLIST M, DERKINDEREN P. Enteric glial cells: new players in Parkinson's disease? *Mov Disord.* 2015 Apr;30(4):494-8. doi: 10.1002/mds.25979. Epub 2014 Aug 7. PMID: 25100667.

DANTZER, R., BLUTHE, R. M., KOOB, G. F., & LE MOAL, M. (1987). Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology*, 91, 363-368.

DANTZER, R., BLUTHE, R. M., & LEMOAL, M. (1988). Experimental assessment of drug-induced changes in cognitive function: Vasopressin as a case study. *Neurotoxicology*, 9, 471-477.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S.. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909. 2003.

DEL TREDICI, K. and BRAAK, H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. *Mov. Disord.* (2012). 27: p.597–607.

DELMARRE A. and MEISSNER W.G. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse Med.* 2017; 46: p.175–181

DENG I, CORRIGAN F, GARG S, ZHOU XF, BOBROVSKAYA L. Further Characterization of Intrastratial Lipopolysaccharide Model of Parkinson's Disease in C57BL/6 Mice. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 9;22(14):7380. doi: 10.3390/ijms22147380. PMID: 34299000; PMCID: PMC8304722.

DIAS, V. et al. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2013 ; 3(4): 461–491. doi:10.3233/JPD-130230.

DOBKIN, R. D. F. et al. Depression in Parkinson's disease: Symptom Improvement and Residual Symptoms Following Acute Pharmacological Management. *Am J Geriatr Psychiatry.* (2011) March; 19 (3): p.222–229.

DOTY, R. L., RIKLAN, M., DEEMS, D. A., REYNOLDS, C., AND STELLAR, S. (1989). The olfactory and cognitive deficits of parkinson's disease: Evidence for independence. *Annals of Neurology* 25, 166–171. doi:10.1002/ana.410250210.

DOTY, R. L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* (2012) 8, p329–339.

DOTY, R. L. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis.* 2013 June; 46(3): p.527–552.

DUDA, J. E.. Olfactory system pathology as a model of Lewy neurodegenerative disease. *Journal of the neurological sciences*, 289(1), 49-54. 2010.

ENGELMANN, M., WOTJAK, C. T., EBNER, K., & LANDGRAF, L. (2000). Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. *Experimental Physiology*, 85(Spec), 125S-130S.

FEINBERG LM, ALLEN TA, LY D, FORTIN NJ. Recognition memory for social and non-social odors: differential effects of neurotoxic lesions to the hippocampus and perirhinal cortex. *Neurobiol Learn Mem.* 2012 Jan;97(1):7-16.

FERGUSON, J. N., YOUNG, L. J., HEARN, E. F., MATZUK, M. M., INSEL, T. R., & WINSLOW, J. T. (2000). Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nature Genetics*, 25, 284-288.

FERGUSON, J. N., YOUNG, L. J., & INSEL, T. R. (2002). The neuroendocrine basis of social recognition. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 23, 200-224.

FERNIE, B.A. et al. Cognitive behavioural interventions for depression in chronic neurological conditions: A systematic review. *Journal of Psychosomatic Research.* 78 (2015) p.411–419.

FRISINA, P.G.; HAROUTUNIAN, V.; LIBOW, L.S. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 2009, 15, 144-148.

GLINKA, Y.Y.; YODIM, M.B. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 1995, 292, 329-332.

GSCHMACK E, MONORANU CM, MAROUF H, MEYER S, LESSEL L, IDRIS R, BERG D, MAETZLER W, STEIGERWALD F, VOLKMANN J, GERLACH M, RIEDERER P, KOUTSILIERI E, SCHELLER C. Plasma autoantibodies to glial fibrillary acidic protein (GFAP) react with brain areas according to Braak staging of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2022 Jun;129(5-6):545-555. doi: 10.1007/s00702-022-02495-4. Epub 2022 Apr 1. PMID: 35364741; PMCID: PMC9188503

HEDNER, M., LARSSON, M., ARNOLD, N., ZUCCO, G. M., AND HUMMEL, T. (2010). Cognitive factors in odor detection, odor discrimination, and odor identification tasks. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 32, 1062–1067. doi:10.1080/13803391003683070.

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

HÖGLINGER GU, RIZK P, MURIEL MP, DUYCKAERTS C, OERTEL WH, CAILLE I, HIRSCH EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726 –735.

HÖGLINGER GU. et al. A new dopaminergic nigro-olfactory projection. *Acta Neuropathol.* (2015) DOI 10.1007/s00401-015-1451-y

HUISMAN, E, HB UYLINGS; PV HOOGLAND. A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 19:687-692. 2004.

HUISMAN, E. et al. Gender-Related Changes in Increase of Dopaminergic Neurons in the Olfactory Bulb of Parkinson's Disease Patients. *Movement Disorders* Vol. 23, No. 10 (2008) pp. 1407–1413

JAYARAJ RL, AZIMULLAH S, PAREKH KA, OJHA SK, BEIRAM R. Effect of citronellol on oxidative stress, neuroinflammation and autophagy pathways in an in vivo model of Parkinson's disease. *Heliyon*. 2022 Nov 3;8(11):e11434. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e 11434. PMID: 36387498; PMCID: PMC9663872.

JENNER P, OLANOW W. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurol.* 2006; 66:S24–S36.

ILKIW JL, KMITA LC, TARGA ADS, NOSEDA ACD, RODRIGUES LS, DORIEUX FWC, FAGOTTI J, DOS SANTOS P, LIMA MMS. Dopaminergic Lesion in the Olfactory Bulb Restores Olfaction and Induces Depressive-Like Behaviors in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol.* 2019 Feb;56(2):1082-1095. doi: 10.1007/s12035-018-1134-5. Epub 2018 Jun 5. PMID: 29869198.

ILKIW JL, LIMA MMS. Perspectives for the association between olfactory disturbances and depression in Parkinson's disease. *Neural Regen Res.* 2019 Apr;14(4):591-592. doi: 10.4103/1673-5374.247461. PMID: 30632496; PMCID: PMC6352594.

IRANZO, A. Parkinson Disease and Sleep: Sleep–Wake Changes in the Premotor Stage of Parkinson Disease; Impaired Olfaction and Other Prodromal Features. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* (2013) 13: p373-382.

KAMPHUIS W, MAMBER C, MOETON M, KOOIJMAN L, SLUIJS JA, JANSEN AH, VERVEER M, DE GROOT LR, SMITH VD, RANGARAJAN S, RODRÍGUEZ JJ, ORRE M, HOL EM. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One.* 2012;7(8):e 42823. doi: 10.1371/journal.pone.0042823. Epub 2012 Aug 13. PMID: 22912745; PMCID: PMC3418292.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J. H; JESSELL, T. M. (2003).In \_\_. Princípios da Neurociência. ed.São Paulo: Manole, 1227-1246.

KETHARANATHAN et al. Major depressive disorder in Parkinson's disease: a cross-sectional study from Sri Lanka. *BMC Psychiatry*.(2014), 14: 278

KEMPURAJ D., et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine*. 2016 ; 1(1): .

KNUDSEN K, et al. Olfactory function in Parkinson's Disease – effects of training. *Acta. Neurol. Scand.* (2015) DOI: 10.1111/ane.12406

KULKARNI OP, LICHTNEKERT J, ANDERS HJ, MULAY SR. The Immune system in tissue environments regaining homeostasis after injury: Is “inflammation” always inflammation? *Mediators Inflamm*. 2016; 2016:2856213. [PubMed: 27597803]

LANG, E. & LOZANO, A. M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N. England. J. Med*339: 1044-1053.

LAZARINI, F. et al. Adult Neurogenesis Restores Dopaminergic Neuronal Loss in the Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience* (2014), 34 (43) 14430-14442

LEENTJENS AF, VREELING FW, LUIJCKX GJ, VERHEY FR. SSRIs in the treatment of depression in Parkinson's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2003 Jun;18(6):552-4.

LEHMKUHL, A. M., DIRR, E. R., FLEMING, S. M. Olfactory Assays for Mouse Models of Neurodegenerative Disease. *J. Vis. Exp.* (90), e51804, doi:10.3791/51804 (2014).

LESAGE, S. & BRICE, A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet.* (2009);18:R48–59.

LEVY, O.A., MALAGELADA, C., GREENE, L.A., 2009. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis* 14, 478–500.

LIANG Y, CHEN C, XIA B, WU W, TANG J, CHEN Q, TANG L, YANG H, ZHANG Z, LU Y, YANG Y, ZHAO Y. Neuroprotective Effect of Echinacoside in Subacute Mouse Model of Parkinson's Disease. *Biomed Res Int*. 2019 Jan 30;2019:4379639. doi: 10.1155/2019/4379639. PMID: 30834264; PMCID: PMC6374833.

LIM, JH, GE DAVIS, Z WANG, V LI, Y WU, TC RUE et al (2009) Zicam-induced damage to mouse and human nasal tissue. *PLoS One* 4:e7647.

LIMA, M.M.S., REKSIDLER, A.B., ZANATA S.M., MACHADO H.B., TUFIK S., VITAL M.A. (2006) Different Parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res* 1101:117–125.

LIMA, M.M.S., REKSIDLER, A. B. & VITAL, M. A. (2009). The neurobiology of the substantia nigra pars compacta: from motor to sleep regulation. *J Neural Transm Suppl*(73): 135-45.

LIMA, M. M. S., MARTINS, E. F., DELATTRE, A. M., PROENCA, M. B., MORI, M. A., CARABELLI, B. & FERRAZ, A. C. (2012). Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease - a Review of Clinical and Experimental Studies. *CNS Neurol Disord Drug Targets*.

LIU SY, CHAN P, STOESSL AJ. The underlying mechanism of prodromal PD: insights from the parasympathetic nervous system and the olfactory system. *Transl Neurodegener*. 2017 Feb 20; 6:4.

MARSH, Laura. Depression and Parkinson's Disease: Current Knowledge. *Curr Neurol Neurosci Rep*. (2013) 13: p.409-418

MARTYNHAK BJ, KANAZAWA LK, MESSIAS DO NASCIMENTO G, ANDREATINI R. Social interaction with rat exposed to constant light during lactation prevents depressive-like behavior induced by constant light in adulthood. *Neurosci Lett*. 2015 Feb 19; 588:7-11

MARXREITER, F. et al. Adult neurogenesis in Parkinson's disease. *Cell. Mol. Life Sci*. (2013) 70: p.459–473.

MATSUTANI S, LEON M. Elaboration of glial cell processes in the rat olfactory bulb associated with early learning. *Brain Res*. 1993 Jun 11;613(2):317-20. doi: 10.1016/0006-8993(93)90919-e. PMID: 8186984.

MAYEUX, R. Depression in the patient with Parkinson's disease. *J. Clin. Psychiatry*, 1990, 51(Suppl), 20-23; discussion 24-25.

MEREDITH, G.E.; et al. Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 219 (2009) 334–340

MEREDITH, G. E.; SONSALLA, P.; and CHESSELET, M.F. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. *Acta Neuropathol*.115(4): 385–398, 2008.

MHYRE, T. R., BOYD, J. T., HAMILL, R. W., & MAGUIRE-ZEISS, K. A. (2012). Parkinson's Disease. *Sub-Cellular Biochemistry*, 65, 389–455. [http://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4\\_16](http://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_16)

MIDDELDORP J, HOL EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011 Mar;93(3):421-43. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005. Epub 2011 Jan 8. PMID: 21219963.

MODUGNO, N. et al. A clinical overview of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Archives Italiennes de Biologie*. (2013) 151: 148-168.

MOURA, PJ. XAVIER, GF. Memória de reconhecimento social em ratos. *Psicologia UsP, São Paulo*, abril/junho, 2010, 21(2), 355-389

MROCHEN A., F. MARXREITER, Z. KOHL, J. SCHLACHETZKI, B. RENNER, T. SCHENK, J. WINKLER, J. KLUCKEN. From sweet to sweat: Hedonic olfactory range is impaired in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. Volume 22, January 2016, p.9-14.

MUNDIÑANO IC, CABALLERO MC, ORDONEZ C, HERNANDEZ M, DICAUDO C, MARCILLA I, ERRO ME, TUNON MT, LUQUIN MR. Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* 2011; 122: p.61–74.

MURRAY HC, JOHNSON K, SEDLOCK A, HIGHET B, DIERIKS BV, ANEKAL PV, FAULL RLM, CURTIS MA, KORETSKY A, MARIC D. Lamina-specific immunohistochemical signatures in the olfactory bulb of healthy, Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Commun Biol.* 2022 Jan 24;5(1):88. doi: 10.1038/s42003-022-03032-5. PMID: 35075270; PMCID: PMC8786934.

NEGOIAS, S. et al. Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute Major Depression. *Neuroscience.* 169 (2010) p.415–421.

OECKL P, et al. Glial fibrillary acidic protein in serum is increased in Alzheimer's disease and correlates with cognitive impairment. *J. Alzheimers Dis.* 2019;67:481–488. doi: 10.3233/JAD-180325.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, v. 164, p. 719-721, 1969.

ORAL, E. et al. How olfaction disorders can cause depression? The role of habenular degeneration. *Neuroscience.* 240 (2013) p.63–69.

OSSOWSKA, K; LORENC-KOCI, E. Depression in Parkinson's disease. *Pharmacological Reports.* 2013; 65: p1545–1557.

PAPP M, WILLNER P, MUSCAT R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl)* 1991;104:255–9.

PARKER WD, PARKS JK, SWERDLOW RH. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res.* 2008; 16:215–218. [PubMed: 18061150]

PAXINOS, G., AND WATSON, C. (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th Edn. San Diego: Academic Press.

POPIK, P., VETULANI, J., BISAGA, A., & VAN REE, J. M. (1991). Recognition cue in the rat's social memory paradigm. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 2, 315-327.

PREDIGER, R.D., BATISTA, L.C., AND TAKAHASHI, R.N. (2005a). Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol. Aging* 26, p.957–964. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.08.012

PREDIGER, R.D., FERNANDES, D., AND TAKAHASHI, R.N. (2005b). Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav. Brain Res.* 159, p.197–205. doi:10.1016/j.bbr.2004.10.017

PREDIGER R.D., LC. BATISTA, R. MEDEIROS, P. PANDOLFO, J.C. FLORIO, R.N. TAKAHASHI. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, Volume 202, Issue 2, December 2006, p391-403.

PREDIGER R. D., et al. An Intranasal MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine) Rat Model of Parkinson's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. International Symposium on Olfaction and Taste: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1170: 629–636 (2009).

PRINGSHEIM T, JETTE N, FROLKIS A, STEEVES TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2014; 29(13):1583- 90.

RAYNAUD, A. et al. Chronic variable stress exposure in male Wistar rats affects the first step of olfactory detection. *Behavioural Brain Research*. 291 (2015) p.36–45.

REKSIDLER AB, LIMA MM, ZANATA SM, MACHADO HB, DA CUNHA C, ANDREATINI R, TUFIK S, VITAL MA. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol*. 2007; 560:163–75.

RODRIGUES, L.S. TARGA, A.D. NOSEDA, A.C.D. AURICH M.F. CUNHA, C. LIMA M.M.S. 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*. December 2014 | Volume 8 | Article 383.

RODRIGUES, L. S., FAGOTTI, J., TARGA, A. D. S., NOSEDA, A. C. D., ILKIW, J. L., DORIEUX, F. W. C., et al. (2020). "Olfactory disturbances in Parkinson's disease," in *Genetics, Neurology, Behavior, and Diet in Parkinson's Disease*, 539–552. Available at: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>.

RODRIGUES, L. S., NOSEDA, A. C. D., TARGA, A. D. S., AURICH, M. F., AND LIMA, M. M. S. (2018). Olfaction in female Wistar rats is influenced by dopaminergic periglomerular neurons after nigral and bulbar lesions. 1–9. doi:10.1097/FBP.0000000000000443.

ROSNER S, GILADI N, ORR-URTREGER A. Advances in the genetics of Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin* 2008;29:21–34.

SALAZAR I, BARRIOS AW, and SANCHEZ-QUINTEIRO P. Revisiting the Vomeronasal System From an Integrated Perspective. *The Anatomical Record*. 299:1488–1491 (2016)

SANTIAGO, R.M. et al. The Non steroidal Anti inflammatory Drug Piroxicam Reverses the onset of Depressive-Like Behavior in 6-OHDA Animal Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience*. 300 (2015) p.246–253

SCHAPIRA AH, JENNER P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2011; 26:1049–1055. [PubMed: 21626550]

SCHUURMAN AG, VAN DEN AKKER M, ENSINCK KT, METSEMAKERS JF, KNOTTNERUS JA, LEENTJENS AF, BUNTINX F. Increased risk of Parkinson's

disease after depression: a retrospective cohort study. *Neurology*. 2002 May 28;58(10):1501-4.

SHIBA M, BOWER JH, MARAGANORE DM, MCDONNELL SK, PETERSON BJ, AHLSSKOG JE, SCHAID DJ, ROCCA WA. Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord*. 2000 Jul;15(4): p. 669-77.

SLATTERY DA, MARKOU A, CRYAN JF. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 2007;190:555–68.

SNYDER JS, GRIGEREIT L, RUSSO A, SEIB DR, BREWER M, PICKEL J, CAMERON HA. A Transgenic Rat for Specifically Inhibiting Adult Neurogenesis. *eNeuro*. 2016 May 31;3(3):ENEURO.0064-16.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0064-16.2016. PMID: 27257630; PMCID: PMC4886221.

SOFFIÉ, M., AND LAMBERTY, Y. (1988). Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. *Behav. Processes*. 17, p.181–190.doi:10.1016/0376-6357(88)90001-0

STREKALOVA, T. et al. Stress-Induced Anhedonia in Mice is Associated with Deficits in Forced Swimming and Exploration. *Neuropsychopharmacology*.(2004) 29, p.2007–2017.

SU W, CHEN HB, LI SH, WU DY. Correlational study of the serum levels of the glial fibrillary acidic protein and neurofilament proteins in Parkinson's disease patients. *Clin. Neurol. Neurosurg*. 2012;114:372–375. doi: 10.1016/j.clineuro.2011.11.002.

TANG Y, HAN L, LI S, HU T, XU Z, FAN Y, LIANG X, YU H, WU J, WANG J. Plasma GFAP in Parkinson's disease with cognitive impairment and its potential to predict conversion to dementia. *NPJ Parkinsons Dis*. 2023 Feb 9;9(1):23. doi: 10.1038/s41531-023-00447-7. PMID: 36759508; PMCID: PMC9911758.

TEIVE, H.A.G. e MENEZES, M.S.; *Doença de Parkinson*. Guanabara Koogan, 2003.

THOR, D. H., & HOLLOWAY, W. R. (1982). Social memory of the male laboratory rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 96, 1000-1006.

TIEU, K. (2011). A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*., 1(1), a009316. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a009316>

TUON, T. ET AL. Physical training prevents depressive symptoms and a decrease in brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin*.108 (2014) p.106–112.

UNGERSTEDT U., 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, Volume 5, Issue 1, 1968, Pages 107-110, ISSN 0014-2999, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7).

VAN LAAR V.S., et al. Glutamate excitotoxicity in neurons triggers mitochondrial and endoplasmic reticulum accumulation of Parkin, and, in the presence of N-acetyl cysteine, mitophagy. *Neurobiology of Disease*. 74 (2015) 180–193

VRIEND C., et al. Depression and impulse control disorders in Parkinson's disease: Two sides of the same coin? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 38 (2014) 60–71

WALTER, U. et al. Potential impact of self-perceived prodromal symptoms on the early diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol* (2013) 260: p.3077–3085

WANG SH, ZHANG ZJ, GUO YJ, ZHOU H, TENG GJ, CHEN BA. Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. *J Psychopharmacol* (2009); 23:295–304.

WHO – World Health Organization. (2006). Neurological disorders: public health challenges. Acesso em 25 de junho de 2015. Disponível em: [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/neurological\\_disorders\\_report\\_web.pdf](http://www.who.int/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf)

YUAN, T. & SLOTNICK, B.M. Roles of olfactory system dysfunction in depression. *Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*.54 (2014) p.26–30.

ZAHODNE, L. et al. Components of Depression in Parkinson Disease. *J Geriatr Psychiatry N Neurol*.2012 September; 25(3): p.131–137

ZHU J, CHU CT. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010; 20 (Suppl 2):S325–S334. [PubMed: 20442495]

ZWIRNER J, LIER J, FRANKE H, HAMMER N, MATSCHKE J, TRAUTZ F, TSE R, ONDRUSCHKA B. GFAP positivity in neurons following traumatic brain injuries. *Int J Legal Med*. 2021 Nov;135(6):2323-2333. doi: 10.1007/s00414-021-02568-1. Epub 2021 Jun 11. PMID: 34114049; PMCID: PMC8523453.

## 7. ANEXOS

### 7.1 ARTIGO CIENTÍFICO METODOLÓGICO

#### **A new olfactory test to assess olfaction in Parkinson's animal model**

Jessica L. Ilkiw<sup>1</sup>, Lais Soares Rodrigues<sup>1</sup>, Flavia W.C. Dorieux<sup>1</sup>, Marcelo M. S.

Lima<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup> Neurophysiology Laboratory, Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

\* Corresponding author contact information: Federal University of Paraná (UFPR), Biological Sciences Division, Department of Physiology, Laboratory of Neurophysiology, Av. Francisco H. dos Santos s/n, ZIP: 81.531– 990, Caixa Postal: 19031, Curitiba, Paraná, Brazil. Tel.: +55 041 3361 1754.

E-mail addresses: marcelomslima.neuro@gmail.com; mmslima@ufpr.br (M.M.S. Lima).

**Conflicts of interest:** The authors declare that no conflict of interests exists.

**Author's contributions:** Conceptualization: Jessica L. Ilkiw, Lais Soares Rodrigues and Marcelo M. S. Lima. Methodology: Jessica L. Ilkiw, Lais Soares Rodrigues and Flavia W.C. Dorieux. Investigation and formal analysis: Jessica L. Ilkiw, Lais Soares Rodrigues and Flavia W.C. Dorieux. Writing (review and editing); Jessica L. Ilkiw, Lais Soares Rodrigues, Flavia W.C. Dorieux and Marcelo M. S. Lima. Resources (funding acquisition): Marcelo M. S. Lima.

## **Abstract**

Hyposmia is a major non-motor symptom of Parkinson's disease (PD) and affects about 90% of patients. To evaluate hyposmia in animal models there are several tests that can be used to evaluate detection, discrimination and olfactory memory. However, many of these tests are based on whether or not the animal stays in an odorized compartment, which may be affected by freezing behaviors and changes in the animal's locomotion. Thus, we implemented a new olfactory discrimination test by uniting two tests: olfactory discrimination task and object recognition test aiming to implement and standardize the olfactory recognition test (ORT) for PD animal models evaluation.

## **Introduction**

It is common to associate the PD diagnosis with the disease's late-stage and consequent clinical motor manifestations (Braak et al., 2003, 2004; Fahn, 2003; Ross et al., 2008). Meanwhile, the PD identification from the olfactory disorder is rarer, mainly due to the lack of worldwide standardization of a diagnostic test. This is partially explained by cross-cultural factors, such as people who live on different continents and do not know precisely the same odors. (Fullard et al., 2017; Rodrigues et al., 2020; Tarakad and Jankovic, 2017). This is particularly important to discuss aspects such as odor identification, in which a person can only name an odor if it has already been exposed, which suggests greater cognitive involvement (Hedner et al., 2010). Therefore, some olfactory diagnostic tests are standardized in some countries, generally assessing odor identification, such as the University of Pennsylvania's Smell Identification Test (UPSIT), which consists of 40 microencapsulated odorants associated with forced-choice answers to identify them (Doty, 1996; Doty et al., 1984; Fornazieri et al., 2015; Hsu et al., 2015; Ogiwara et al., 2011; Picillo et al., 2014). In addition, there are olfactory tests that evaluate the detection or discrimination of odorants (Doty et al., 2015; Lötsch et al., 2008), which in turn considers, respectively, the presence of an odor in low concentration or different thresholds (Cain, 1982; Lawless, 2010) and the differentiation between two odors or more (Weierstall and Pause, 2012). Although odor identification and

discrimination tasks are more dependent on cognitive processes (Hedner et al., 2010), in PD, olfaction and cognition are considered independent disorders (Doty et al., 1989).

Obviously, simulating odor identification tests for animal models is complex, although there are some similar ones, they are not standardized for a PD model (Liu et al., 2017; Olofsson et al., 2019) and depend on habituation, learning and cognition. Detection is certainly a tool to be considered and better investigated for PD animal models; however, odor discrimination stills the most used approach in this context. Among the olfactory discrimination tests in rodents, there are several protocols and devices used, in addition to odorants stimuli from different classes, such as social, non-social, appetizing and aversive odors (Arbuckle et al., 2015; Cho et al., 2018; Fleming, 2014; Ilkiw et al., 2018; Jakupovic et al., 2008; Mihalick et al., 2000; Prediger et al., 2006; Rodrigues et al., 2014, 2018; Staples et al., 2008; Tillerson et al., 2006; Yang and Crawley, 2009).

In mammals, social odors determine the reproductive and social behavior of a species, including aspects such as age, health status and sex (Brennan and Kendrick, 2006). These odorants are found in feces, urine and skin glands and are processed through the main and accessory olfactory pathways (Brown, 1979; Keller et al., 2009). Non-social odors are arbitrary odor molecules that are not related to the social context, such as lemon or spice odors, which are processed through the main olfactory pathway (Feinberg et al., 2012). Aversive odors are found in the skin of predators, saliva, feces and urine and can trigger an adaptive effect on the detector organism (Apfelbach et al., 2005). In addition to the aversive odors, there are odorants that generate reward responses in animals. Appetizing odorants are found in several sources, such as the peanut butter odor that leads to hedonic responses (Cho et al., 2018; Kobayakawa et al., 2007). Olfactory discrimination tasks can use all these odorants classes, however, appetized and aversive odorants can activate regions of the limbic system related to reward and fear, which could be considered an interference source in the PD olfactory disorder context. In this context, we implemented a new olfactory discrimination test by uniting two tests: olfactory discrimination task and object recognition test aiming to implement and standardize the olfactory recognition test (ORT) for PD animal models evaluation.

## Material and methods

### Ethics statement

All the experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Committee on the Care and Use of Laboratory Animals, United States National Institutes of Health. In addition, the protocol complies with the recommendations of Federal University of Paraná and was approved by the Institutional Ethics Committee (approval ID #1162).

### Animals

Male Wistar rats from our breeding colony weighing 280–320 g at the beginning of the experiments were used. The animals were randomly housed in groups of five in polypropylene cages with wood shavings as bedding and maintained in a temperature-controlled room ( $22\pm 2^\circ\text{C}$ ) on a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 AM). The animals had free access to water and food throughout the experiment.

### Experimental design

We first tested two times (3 or 5 minutes) of training and test for animals Naïve (animals without any manipulation) and Zicam (positive anosmia group)  $n=10/\text{group}$  (Total=40 animals). After the primary results, three more groups were established to perform the test that presented the expected result ( $n = 10/\text{group}$ ): Sham (operated but not injured animals), 6-OHDA and Rotenone (Total = 30 animals) performed 3 minutes training and test for ORT. 6-OHDA and Rotenone are PD mimicking neurotoxins, which were administered by stereotactic surgery on substantia nigra pars compacta. Zicam is a zinc gluconate + zinc acetate formulation that causes anosmia, acting as a positive control for olfactory impairment.

### Stereotaxic Surgery

Rats were sedated with intraperitoneal xylazine (10 mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Brazil) and anesthetized with intraperitoneal ketamine (90 mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Brazil). The following coordinates were used to the bilateral injury, bregma as a reference: substantia nigra pars compacta (SNpc) (AP) = - 5,0 mm, (ML) =  $\pm 2,1$  mm e (DV) = - 8,0 mm (Paxinos and Watson 2005). To 6-OHDA group, needles were guided to the region of interest for a bilateral infusion of 2  $\mu\text{L}$  of 6-OHDA (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) of saline containing 0.2% ascorbic acid using an electronic infusion pump (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brazil) at a rate of 0,33  $\mu\text{L}/\text{min}$  for 6 minutes (modified

from Lima, et al., 2006). To Rotenone group, 1 mL of rotenone(12 mg/mL) or of dimethylsulfoxide—DMSO (Sigma-Aldrich®,United States) using an electronic infusion pump (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brazil) at a rate of 0.33 mL/min for 3min (Saravanan et al., 2005; Moreira et al., 2012; Dos Santos et al., 2013) administrated at the same structure. Sham operations followed the same procedure, but 2  $\mu$ L of saline containing 0.02% ascorbic acid was injected instead.

#### Intranasal administration of Zicam (zinc gluconate + zinc acetate solution)

The administration of Zicam® Oral Mist (Matrixx Initiatives, Scottsdale, AZ, USA) was performed as previously reported (Lim et al., 2009; Chioca et al., 2013; Rodrigues et al., 2014): the animals were sedated with an intraperitoneal administration of 90 mg/kg ketamine and 3 mg/kg xylazine, and approximately 30  $\mu$ L of Zicam solution was slowly delivered into the nasal cavity using a Hamilton syringe connected to a blunted 30-gauge needle through a polyethylene tube. The polyethylene cannula was inserted 15 mm past the right external nostril to help irrigate the olfactory epithelium. The procedure was repeated in the left nostril. During respiration, part of the solution was expelled through the nostril and dried with absorbent paper to allow the animal to continue breathing.

#### Olfactory Recognition Test (ORT)

For the test, rats were placed individually in a box containing 2 similar falcons with small holes along its surfaces. The test was performed in two stages, the first (called “training”) was performed as a box habituation. The animals were placed in the box containing clean sawdust inside the two falcons and the exploration of both falcons was observed for 3 minutes. In the second stage, a falcon was randomly chosen and the clean sawdust was replaced for a sawdust collected from the animal isolated cage (familial odor) and in the other falcon the clean sawdust was maintained (non-familial odor) for 3 minutes. The two steps were recorded for further analysis.

#### Statistical Analysis

Differences between groups in the ORT were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post hoc test. Values were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). The level of significance was set at  $P \leq 0.05$ .

## Results

Firstly, we tested two times (3 or 5 minutes) of training and test for Naïve animals (animals without any manipulation) and Zicam (positive anosmia group. During training all groups showed no statistical difference between falcons explorations (Figure 1, A and B). Though, during both tests, the animals in the zicam group would still explore the falcons similarly as they did not have any differences. Meanwhile, Naïve group explore more the falcon with familial odor then the non-familial one (Figure 1, C and D) [ Naïve 5 minutes (interaction factor:  $F(1, 32) = 8,567$ ;  $p = 0,0064$ ), Naïve 3 minutes (column factor:  $F(1, 34) = 6,632$ ;  $p = 0,0187$ )]. For test habituation (ORT training), all groups showed no preference for locating or exploiting the falcons. Already during the test, the groups that did not present olfactory impairments (Naive and Sham) explored significantly the family time compared to the unfamiliar one [Naive ( $p = 0.0107$ ) and Sham ( $p = 0.0429$ )], while the hyposmia groups explored similarly both falcons [6-OHDA ( $p = 0.9854$ ), Rotenone ( $p = 0.4586$ ) and Zicam ( $p = 0.9804$ )]. Thereby, we conclude that the olfactory recognition test is effective for evaluating olfactory impairment in PD models.

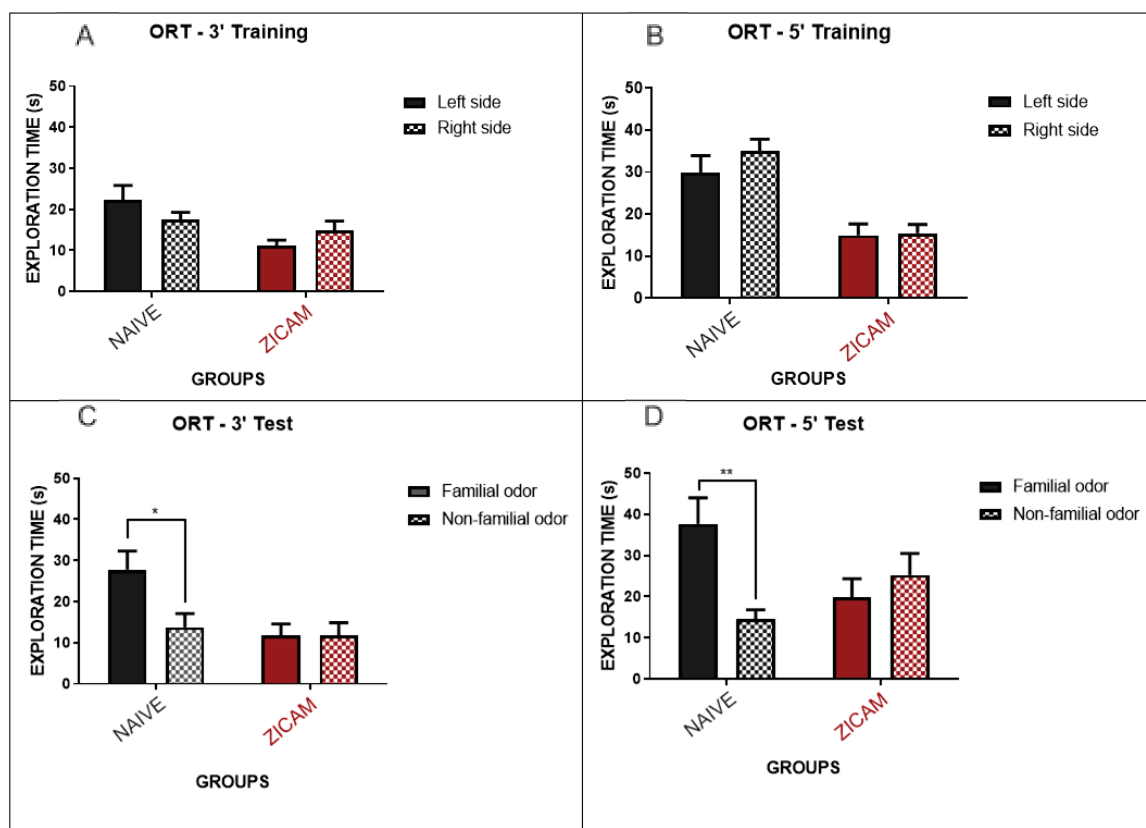


Figure 1. Graphical representation of olfactory recognition training and tests in two times: 3 and 5 minutes. A and C represent training of 5 and 3 minutes respectively, and B and D its tests respectively.

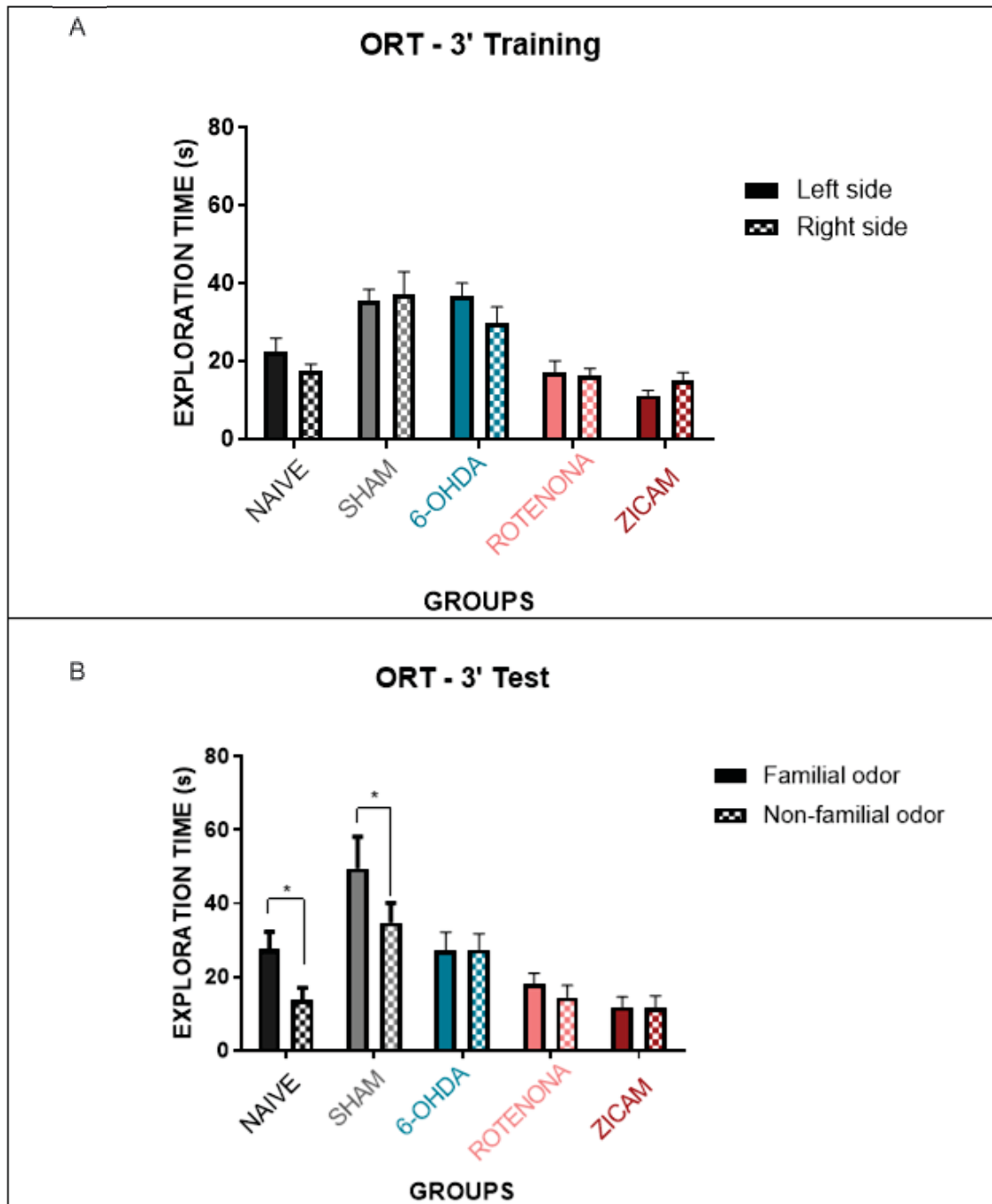


Figure 2. (A) Graphical representation of olfactory recognition training. Three-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc. All groups presented the same significant exploration time on both sides of the box during training. (B) Graphical representation of olfactory recognition test. Three-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc. During the test, the groups that did not present olfactory impairments (Naive and Sham) explored significantly the family time compared to the unfamiliar one [Naive ( $p = 0.0107$ ) and Sham ( $p = 0.0429$ )], while the hyposmia groups explored similarly both falcons [6-OHDA ( $p = 0.9854$ ), Rotenone ( $p = 0.4586$ ) and Zicam ( $p = 0.9804$ )].

## Discussion

When comparing with already established olfactory detection tests, it is visible that the times of 3 and 5 minutes are the most used. By testing these two times, we noticed that the detection pattern did not change, remaining similar to the exploration difference between training and test in Naive animals and anosmia model animals. In this way, we chose to continue the validation with the shortest time, as it makes the test faster in general. By including the groups of operated animals, Sham, 6-OHDA and Rotenone, it was observed that the groups of animals injured in the SNpc - considered classic models of PD - were not able to differentiate the falcon tube with a familiar odor from the tube with an unfamiliar odor. This behavior is visualized in several social odor tests, in the same way (Prediger et al., 2006; Lazarini et al., 2014; Rodrigues et al., 2014, 2018, 2020; Ilkiw et al., 2018) while the operated animals however non-injured individuals presented a longer exploration time to the falcon tube containing snips of social odor than to the tube with non-social odor.

In the ORT, we considered the time of active exploration of the odor, which is, the time the animal spent interested in the falcon tube and behaviors such as using the tube to climb or biting the adhesive tape that demarcates the proximity to the tube were excluded from the time count. For the determination of the active exploration of the odor, a limit line of 2 cm was established around each tube and if the animal crossed these lines with the head and forepaws, the time was counted as exploration. This provides a much clearer analysis of the animal's interest in detection and that when there is a longer exploration time it genuinely means that it has a greater interest in the falcon's odor compared to other tests - such as the olfactory discrimination test - which assess the time of permanence in a compartment that contains the odor.

In addition, the test has the advantage of a short habituation time (3 minutes), low cost involving the test – only the apparatus and falcon tubes, which can be reused. It was also observed the ease of analysis of the test results and the high applicability for two models that reproduce the olfactory deficits. Based on laboratory research that is looking for the best strategy to evaluate the animal olfactory behavior with low cost, good reproducibility, easy analysis and good applicability, we successfully present a new olfactory discrimination task with a standardized social odor for two

PD animal models. Future studies are needed to standardize this task for other classes of odorants and PD rodent models.

## Acknowledgements

This paper was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brasil. MMSL is recipient of CNPq fellowship (305986/2016-3). The authors wish to express their sincere gratitude to Fabio Roberto Caetano from Physiology Department of UFPR for the technical assistance.

## References

- Apfelbach, R., Blanchard, C. D., Blanchard, R. J., Hayes, R. A., and McGregor, I. S. (2005). The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29, 1123–1144. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.05.005.
- Arbuckle, E. P., Smith, G. D., Gomez, M. C., and Lugo, J. N. (2015). Testing for odor discrimination and habituation in mice. *Journal of Visualized Experiments* 2015, 1–7. doi:10.3791/52615.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* 24, 197–211. doi:10.1016/S0197-4580(02)00065-9.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., and Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and tissue research* 318, 121–34. doi:10.1007/s00441-004-0956-9.
- Brennan, P. A., and Kendrick, K. M. (2006). Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 2061–2078. doi:10.1098/rstb.2006.1931.
- Brown, R. E. (1979). Mammalian Social Odors: A Critical Review. *Advances in the Study of Behavior* 10, 103–162. doi:10.1016/S0065-3454(08)60094-7.
- Cain, W. S. (1982). Sumner's "O Testing the Sense of Smell" revisited. *Yale Journal of Biology and Medicine* 55, 515–519.
- Cho, H. J., Lee, Y. H., Kim, B. R., Kim, H. K., Chung, H. J., Park, S. C., et al. (2018). Newly developed method for mouse olfactory behavior tests using an automatic video tracking system. *Auris Nasus Larynx* 45, 103–110.

doi:10.1016/j.anl.2017.03.007.

- Doty, R. L. (1996). Development of the 12-Item Cross Cultural Smell Identification Test (CC-SIT). *Laryngoscope* 106, 353–356.
- Doty, R. L., Laing, D. G., Osman, A., Silas, J., Gottfried, J., Schaal, B., et al. (2015). Human olfactory Measurement, Physiology and Development. *Handbook of olfaction and gustation*, 227–353.
- Doty, R. L., Riklan, M., Deems, D. A., Reynolds, C., and Stellar, S. (1989). The olfactory and cognitive deficits of parkinson's disease: Evidence for independence. *Annals of Neurology* 25, 166–171. doi:10.1002/ana.410250210.
- Doty, R. L., Shaman, P., Kimmelman, C. P., and Dann, M. S. (1984). University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic. *The Laryngoscope* 94, 176–8. doi:10.1288/00005537-198402000-00004.
- Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. *Annals New York Academy of Sciences* 991, 1–14. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07458.x.
- Feinberg, L. M., Allen, T. A., Ly, D., and Fortin, N. J. (2012). Recognition memory for social and non-social odors: Differential effects of neurotoxic lesions to the hippocampus and perirhinal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory* 97, 7–16. doi:10.1016/j.nlm.2011.08.008.
- Fleming, S. M. (2014). Olfactory assays for mouse models of neurodegenerative disease. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e51804. doi:10.3791/51804.
- Fornazieri, M. A., Dos Santos, C. A., Bezerra, T. F. P., De Rezende Pinna, F., Voegels, R. L., and Doty, R. L. (2015). Development of normative data for the Brazilian adaptation of the university of pennsylvania smell identification test. *Chemical Senses* 40, 141–149. doi:10.1093/chemse/bju068.
- Fullard, M. E., Morley, J. F., and Duda, J. E. (2017). Olfactory Dysfunction as an Early Biomarker in Parkinson's Disease. *Neuroscience Bulletin* 33, 515–525. doi:10.1007/s12264-017-0170-x.
- Hedner, M., Larsson, M., Arnold, N., Zucco, G. M., and Hummel, T. (2010). Cognitive factors in odor detection, odor discrimination, and odor identification tasks. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 32, 1062–1067. doi:10.1080/13803391003683070.
- Hsu, N. I., Lai, J. T., and Shen, P. H. (2015). Development of Taiwan smell identification test: A quick office-based smell screening test for Taiwanese. *American Journal of Rhinology and Allergy* 29, e50–e54. doi:10.2500/ajra.2015.29.4174.
- Ilkiw, J. L., Kmita, L. C., Targa, A. D. S., Nosedá, A. C. D., Rodrigues, L. S., Dorieux, F. W. C., et al. (2018). Dopaminergic Lesion in the Olfactory Bulb Restores Olfaction and Induces Depressive-Like Behaviors in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*. doi:10.1007/s12035-018-1134-5.

- Jakupovic, J., Kang, N., and Baum, M. J. (2008). Effect of bilateral accessory olfactory bulb lesions on volatile urinary odor discrimination and investigation as well as mating behavior in male mice. *Physiology and Behavior* 93, 467–473. doi:10.1016/j.physbeh.2007.10.005.
- Keller, M., Baum, M. J., Brock, O., Brennan, P. A., and Bakker, J. (2009). The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behavioural Brain Research* 200, 268–276. doi:10.1016/j.bbr.2009.01.020.
- Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Oka, Y., Imai, T., Ikawa, M., et al. (2007). Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450, 503–508. doi:10.1038/nature06281.
- Lawless, H. T. (2010). A simple alternative analysis for threshold data determined by ascending forced-choice methods of limits. *Journal of Sensory Studies* 25, 332–346. doi:10.1111/j.1745-459X.2009.00262.x.
- Liu, G., McClard, C., Tepe, B., Swanson, J., Pekarek, B., Panneerselvam, S., et al. (2017). Olfactory Cued Learning Paradigm. *Bio-Protocol* 7, 1–10. doi:10.21769/bioprotoc.2251.
- Lötsch, J., Reichmann, H., and Hummel, T. (2008). Different odor tests contribute differently to the evaluation of olfactory loss. *Chemical Senses* 33, 17–21. doi:10.1093/chemse/bjm058.
- Mihalick, S. M., Langlois, J. C., Krienke, J. D., and Dube, W. V. (2000). an Olfactory Discrimination Procedure for Mice. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 73, 305–318. doi:10.1901/jeab.2000.73-305.
- Ogihara, H., Kobayashi, M., Nishida, K., Kitano, M., and Takeuchi, K. (2011). Applicability of the cross-culturally modified University of Pennsylvania Smell Identification Test in a Japanese population. *American Journal of Rhinology and Allergy* 25, 404–410. doi:10.2500/ajra.2011.25.3658.
- Olofsson, J. K., Zhou, G., East, B. S., Zelano, C., and Wilson, D. A. (2019). Odor identification in rats: Behavioral and electrophysiological evidence of learned olfactory-auditory associations. *eNeuro* 6, 1–11. doi:10.1523/ENEURO.0102-19.2019.
- Picillo, M., Pellecchia, M. T., Erro, R., Amboni, M., Vitale, C., Iavarone, A., et al. (2014). The use of University of Pennsylvania Smell Identification Test in the diagnosis of Parkinson's disease in Italy. *Neurological Sciences* 35, 379–383. doi:10.1007/s10072-013-1522-6.
- Prediger, R. D. S., Batista, L. C., Medeiros, R., Pandolfo, P., Florio, J. C., and Takahashi, R. N. (2006). The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 202, 391–403. doi:10.1016/j.expneurol.2006.07.001.
- Rodrigues, L. S., Fagotti, J., Targa, A. D. S., Nosedá, A. C. D., Ilkiw, J. L., Dorieux, F. W. C., et al. (2020). "Olfactory disturbances in Parkinson's disease," in *Genetics, Neurology, Behavior, and Diet in Parkinson's Disease*, 539–552. Available at:

<http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>.

- Rodrigues, L. S., Nosedá, A. C. D., Targa, A. D. S., Aurich, M. F., and Lima, M. M. S. (2018). Olfaction in female Wistar rats is influenced by dopaminergic periglomerular neurons after nigral and bulbar lesions. 1–9. doi:10.1097/FBP.0000000000000443.
- Rodrigues, L. S., Targa, A. D. S., Nosedá, A. C. D., Aurich, M. F., Da Cunha, C., and Lima, M. M. S. (2014). 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* 8, 1–11. doi:10.3389/fncel.2014.00383.
- Ross, G. W., Petrovitch, H., Abbott, R. D., Tanner, C. M., Popper, J., Masaki, K., et al. (2008). Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 63, 167–173. doi:10.1002/ana.21291.
- Staples, L. G., McGregor, I. S., Apfelbach, R., and Hunt, G. E. (2008). Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats. *Neuroscience* 151, 937–947. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.11.039.
- Tarakad, A., and Jankovic, J. (2017). Anosmia and Ageusia in Parkinson's Disease. *International Review of Neurobiology* 133, 541–556. doi:10.1016/bs.irn.2017.05.028.
- Tillerson, J. L., Caudle, W. M., Parent, J. M., Gong, C., Schallert, T., and Miller, G. W. (2006). Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. *Behavioural Brain Research* 172, 97–105. doi:10.1016/j.bbr.2006.04.025.
- Weierstall, R., and Pause, B. M. (2012). Development of a 15-item odour discrimination test (Düsseldorf Odour Discrimination Test). *Perception* 41, 193–203. doi:10.1068/p7113.
- Yang, M., and Crawley, J. N. (2009). Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Current Protocols in Neuroscience*, 1–12. doi:10.1002/0471142301.ns0824s48.

## 7.2 ARTIGO CIENTÍFICO DE COLABORAÇÃO

Experimental Brain Research  
<https://doi.org/10.1007/s00221-023-06605-w>

## 1 RESEARCH ARTICLE



2 **Metabolic dysfunctions in the intranigral rotenone model**  
 3 **of Parkinson's disease**

4 Ana Paula Chuproski<sup>1</sup> · Evellyn Mayla Azevedo<sup>1</sup> · Jéssica Ilkiw<sup>1</sup> · Jéssica Miloch<sup>1</sup> · Marcelo M. S. Lima<sup>1,2</sup>

5 Received: 6 December 2022 / Accepted: 24 March 2023

6 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

7 **Abstract**

8 Parkinson disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of dopamine (DA) neu-  
 9 rons in the substantia nigra pars compacta. In the last years, a growing interest to study the relationship between metabolic  
 10 dysfunction and neurodegenerative disease like PD has emerged. This study aimed to evaluate the occurrence of possible  
 11 changes in metabolic homeostasis due to intranigral rotenone administration, a neurotoxin that damages dopaminergic neu-  
 12 rons leading to motor impairments mimicking those that happen in PD. Male Wistar rats were distributed into two groups:  
 13 sham ( $n=10$ ) or rotenone ( $n=10$ ). Sham group received, bilaterally, within the SNpc, 1  $\mu$ L of vehicle dimethyl-sulfoxide  
 14 (DMSO) and the experimental group was bilaterally injected with 1  $\mu$ L of rotenone (12  $\mu$ g/ $\mu$ L). Twenty-four hours after the  
 15 stereotaxic surgeries, the animals underwent the open field test followed by subsequent peripheral blood and cerebrospinal  
 16 fluid (CSF) samples collection for biochemical testing. The results showed that rotenone was able to replicate the typical  
 17 motor behavior impairment seen in the disease, i.e., decrease in locomotion ( $P=0.05$ ) and increase in immobility ( $P=0.01$ )  
 18 with a strong correlation ( $r=-0.85$ ;  $P<0.0001$ ) between them. In addition, it was demonstrated that this model is able to  
 19 decrease plasmatic total-cholesterol ( $P=0.04$ ) and HDL-cholesterol ( $P=0.007$ ) potentially impacting peripheral metabolism.  
 20 Hence, it was revealed a potential ability to reproduce relevant metabolic dysfunctions like hyperglycemia which could be  
 21 explained by acute and systemic mitochondrial rotenone toxicity and SNpcnigral toxicity. Such mechanisms may still be  
 22 responsible for the potential occurrence of CSF-hyperglycemia ( $d=0.7$ ). Since intranigral rotenone is an early phase model  
 23 of PD, the present results open a new road for studies aiming to investigate metabolic changes in PD.

24 **Keywords** Parkinson disease · Rotenone · Intranigral · Glucose · Cholesterol

25 **Introduction**

26 Parkinson's disease (PD) is the second most common neuro-  
 27 degenerative disease affecting about 1% of people over  
 28 65 years old and 4–5% of people over 85 years (Hirsch et al.  
 29 2016; Tysnes and Storstein 2017). The main neuropatho-  
 30 logical hallmark of PD is the progressive and irreversible  
 31

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 brad-  
 ykinesia, rigidity, resting tremor, and disturbances in balance  
 (Schapira et al. 2017) which emerge when dopaminergic  
 cells reduce about 70–80% (Dauer and Przedborski 2003).  
 The mechanism that underlies the selective dopaminergic  
 neuronal death is still unknown, but several recent find-  
 ings 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 represents 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 phar-  
 macological mechanism as competitive inhibitors of

A1 Communicated by Winston D Byblow.

A2 ✉ Marcelo M. S. Lima  
 A3 mmslima@ufpr.br; marcelomslima.neuro@gmail.com

A4 <sup>1</sup> Neurophysiology Laboratory, Department of Physiology,  
 A5 Federal University of Paraná, Setor de Ciências Biológicas,  
 A6 Av. Francisco H. dos Santos s/n, Zip 81.531-990, Curitiba,  
 A7 Paraná 19031, Brazil

A8 <sup>2</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Paraná,  
 A9 Curitiba, Paraná, Brazil

Springer

Journal : <i>Larger</i> 221	Article No : 6605	Pages : 10	MS Code : 6605	Dispatch : 20-3-2023
-----------------------------	-------------------	------------	----------------	----------------------

49 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)  
50 reductase, promote a somewhat significant anti-inflamma-  
51 tory and immunomodulatory effects, which led the hypoth-  
52 esis that statins could be neuroprotective agents in PD  
53 (Bar-On et al. 2008; Mutez et al. 2009; Lin et al. 2021).  
54 Some clinical studies show that statins treatment would be  
55 associated with a reduction in the risk of PD; however, this  
56 relationship is still unclear (Bykov et al. 2017; Jeong et al.  
57 2019). Additionally, diabetes type 2 has been associated  
58 with a major risk of PD (Hu et al. 2007; Schernhammer  
59 et al. 2011; Pagano et al. 2018; Chohan et al. 2021; Sánchez-  
60 Gómez et al. 2021). In fact, pioglitazone, an antidiabetic  
61 drug, reduced dopaminergic neurodegeneration within the  
62 SNpc (Bonato et al. 2018) and attenuated neuroinflammation  
63 in mice (Pinto et al. 2016; Piatkowska-Chmiel et al. 2022).  
64 Besides, abnormal glucose tolerance has also been under  
65 investigation in PD patients (Hogg et al. 2018; Marques et al.  
66 2018).

67 Rotenone is extensively used as a neurotoxin able to  
68 mimic several features of PD. This agent specifically inhib-  
69 its the complex I (NADH CoQ dehydrogenase) of the elec-  
70 tron transport chain, one of the five enzymatic complexes  
71 of the inner mitochondrial membrane that are involved in  
72 oxidative phosphorylation (Chia et al. 2020). Deficits in this  
73 complex are observed in the SNpc of people with sporadic  
74 and genetic PD (Keeney et al. 2006; Zanellati et al. 2015).  
75 Furthermore, acute nigrostriatal degeneration can be reached  
76 by means of intranigral rotenone infusion which inflicts,  
77 in few hours, an extensive dopaminergic lesion and consequent  
78 several behavioral and biochemical effects from hours to  
79 many days after (Saravanan et al. 2005; Nosedá et al. 2014;  
80 Rodrigues et al. 2014; Madiha et al. 2021) (Table 1).

81 Therefore, in the present study, we sought to investigate  
82 the early phase motor and possible metabolic dysfunctions  
83 after the rotenone-induced intranigral model of PD.

## 84 Methods

### 85 Ethics statement

86 All procedures with animal were conducted according to the  
87 guidelines of ethics and experimental care and use of labora-  
88 tory animals (SBCAL) and were approved by the Ethics  
89 Committee of the Federal University of Paraná (Approval  
90 ID#1216).

### 91 Animals

92 Male Wistar rats weighing 280–320 g at the beginning of  
93 the experiments. The animals were randomly housed in  
94 groups of four in polypropylene cages with wood shav-  
95 ings as bedding and maintained in a temperature-controlled

**Table 1** Pearson's correlations between parameters

Parameter correlations	<i>r</i> and <i>P</i> Values
Total-cholesterol × HDL-cholesterol	0.19; 0.43
Total-cholesterol × LDL-cholesterol	<b>0.80; 0.0001*</b>
Total-cholesterol × triglycerides	0.006; 0.9
Total-cholesterol × plasma-glucose	−0.15; 0.5
Total-cholesterol × CSF-glucose	−0.37; 0.3
Total-cholesterol × locomotion	0.013; 0.96
Total-cholesterol × immobility	−0.091; 0.71
Plasma-glucose × CSF-glucose	<b>0.81; 0.004*</b>
HDL-cholesterol × LDL-cholesterol	0.051; 0.84
HDL-cholesterol × locomotion	0.15; 0.55
HDL-cholesterol × immobility	−0.07; 0.76
Plasma-glucose × locomotion	−0.03; 0.92
Plasma-glucose × immobility	0.19; 0.44
Plasma-glucose × weight	−0.22; 0.37
Total-cholesterol × weight	0.25; 0.32
Locomotion × weight	0.4; 0.1
HDL-cholesterol × weight	−0.04; 0.9
LDL-cholesterol × weight	0.3; 0.3
CSF-glucose × weight	−0.4; 0.2
Triglycerides × weight	0.3; 0.3

Statistical significant correlations are indicated with an asterisk

room ( $22 \pm 2$  °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.

### 99 Experimental design

100 The animals were distributed randomly in two groups called  
101 sham and rotenone ( $n = 10$ ). The rotenone grouped received  
102 bilateral infusion of 1  $\mu$ L of rotenone (12  $\mu$ g/ $\mu$ L). Sham  
103 operations followed the same procedure, but 1  $\mu$ L of dime-  
104 thyl-sulfoxide (DMSO) was injected instead. Twenty-four  
105 hours after the stereotaxic surgeries, the animals underwent  
106 the open field test followed by subsequent cerebrospinal fluid  
107 (CSF) samples acquisition, peripheral blood, and brains'  
108 collection.

### 109 Nigrostriatal lesion

110 The animals were deeply anesthetized with ketamine  
111 (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and fixed on a stere-  
112 otaxic frame. Rotenone (12  $\mu$ g/ $\mu$ L) was bilaterally infused  
113 into SNpc at a rate of 0.33  $\mu$ L/min for 3 min, controlled by  
114 an electronic infusion pump (Insight Instruments, Ribeirão  
115 Preto, Brazil<sup>®</sup>). The following coordinates were used (hav-  
116 ing the bregma as a reference): (AP): −5.0; (ML):  $\pm$ 2.1 mm;  
117 and (DV): −8.0 mm (Paxinos and Watson 1997). In the sham  
118 groups, stereotactic surgery was performed, but the animals

119 received 1  $\mu$ L of vehicle solution instead of the rotenone  
120 infusion.

### 121 Open field test

122 The open field test apparatus consisted of a circular arena  
123 (1 m diameter) limited by a 40 cm-high wall. The animals  
124 were gently placed in the center of the arena and were  
125 allowed to freely explore the area for 5 min. Two motor  
126 parameters were recorded and quantified: number of crosses  
127 (locomotion frequency) and immobility time (rats kept with-  
128 out any movement). The open field was cleaned with a 10%  
129 water-ethanol solution before behavioral testing to eliminate  
130 possible bias due to odors left by previous rat. The tests  
131 were recorded and all analyses were conducted for unbiased  
132 researcher.

### 133 CSF collection

134 After the behavioral tests, CSF was collected by the method  
135 previously described (Pegg et al. 2010). The anesthetized  
136 rat was placed in a stereotaxic frame and was secured with  
137 ear bars. The position of the animal's head was maintained  
138 downward at approximately 45° angle. A 30G-needle con-  
139 nected to a 1 mL syringe was inserted horizontally and centrally  
140 into the cisterna magna at 30° angle to the dura. About  
141 50–100  $\mu$ L of CSF were obtained from each rat. Only clear  
142 CSF without visual signs of blood contamination was col-  
143 lected into 0.5 mL microtube and centrifuged at 10,000 $\times$ g  
144 4° for 2 min, and the supernatant was collected and frozen  
145 at –80 °C until further use. Evaluation of CSF glucose was  
146 conducted using enzymatic assay (Labtest®, Brazil).

### 147 Biochemical blood and CSF analyses

148 At the end of the behavioral tests, the rats were quickly  
149 decapitated followed by total blood sample collection  
150 (exsanguination) from the carcasses. About 7 mL of blood  
151 was collected, for each animal, in tubes containing sodium  
152 heparin to prevent clotting. The separation of plasma was  
153 achieved by centrifugation at 3000 $\times$ g 4° for 15 min. After-  
154 ward, 2 mL of plasma was pipetted and transferred to identi-  
155 fied plastic tubes and stored at –80 °C until analysis. Quanti-  
156 fication of lipid profile and glucose from the plasma and CSF  
157 were obtained with the use of commercial kits (Labtest®,  
158 Brazil) using spectrophotometric methods.

### 159 TH-immunohistochemistry within the SNpc

160 The rat brains were quickly dissected after the decapita-  
161 tion and the tissues were immersed in fixative solution of  
162 formaldehyde 4% in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for  
163 7 days at 4 °C. Subsequently, the brains were placed in 30%

164 sucrose solution for 3 days and were freeze-d at –80 °C  
165 before sectioning. Sections (40  $\mu$ m) were taken from the  
166 SNpc (–4.92 mm and –5.28 mm, an interval of 360  $\mu$ m)  
167 (Rodrigues et al. 2014). Tissue sections were incubated with  
168 primary mouse anti-TH antibody, diluted in phosphate-buff-  
169 ered saline containing 0.3% Triton X-100 (1:500; Chemicon,  
170 CA, USA) overnight at 4 °C. Biotin-conjugated secondary  
171 antibody incubation (1:200 anti-mouse #Vector Labora-  
172 tories, USA) was performed for 2 h at room temperature.  
173 After several washes in phosphate-buffered saline, antibody  
174 complex was localized using the ABC system (Vectastain  
175 ABC Elite kit, Vector Laboratories, USA) followed by  
176 3,3'-diaminobenzidine reaction with nickel enhancement.  
177 The sections were then mounted onto gelatin-coated slides  
178 and coverslipped after dehydration in ascending concentra-  
179 tions of ethanol-xylene solutions. Neuronal density deter-  
180 mination for the SNpc was conducted making use of the  
181 software Image J 1.47v. The mean number of TH-ir neurons  
182 in each hemisphere was considered to be representative of  
183 the SNpc neuronal cells in each animal. For each group, a  
184 mean value was calculated (percentage relative to the sham  
185 group), and compared with the rotenone group. The images  
186 were obtained using a motorized Axio Imager Z2 micro-  
187 scope (CarlZeiss, Jena, DE), equipped with an automated  
188 scanning VSlide (Metasystems, Altusheim, DE).

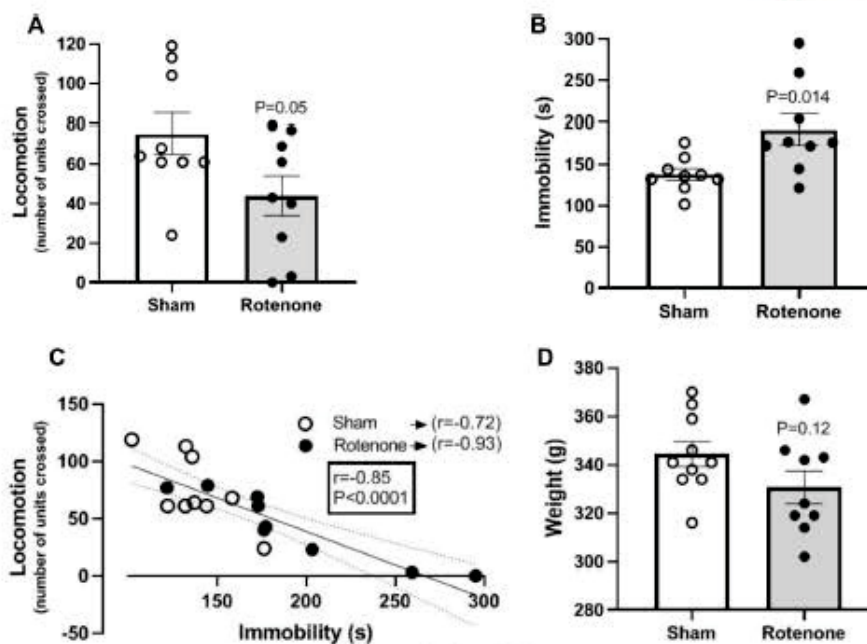
### 189 Statistical analysis

190 Normality of the data was accessed by the Kolmogor-  
191 ov–Smirnov test. Unpaired Student's *t* tests were used to  
192 compare values between the two groups sham and rote-  
193 none. Pearson's correlations coefficients ( $r=0.2$ —weak,  
194  $r=0.5$ —moderate, and  $r\geq 0.8$ —strong) were calculated to  
195 investigate the possible association or similarity measures  
196 between two parameters, such as locomotion and immobility  
197 or total-cholesterol and HDL-cholesterol or plasma-glucose  
198 and CSF-glucose.

199 Comparisons of Pearson's correlation coefficients were  
200 performed according to Fisher's *Z*-transformation (*z*-score).  
201 Relative effect sizes (*d*) were calculated for the CSF-glucose  
202 and LDL-cholesterol concentration comparisons  
203 (sham  $\times$  rotenone) to establish the type of the effect size  
204 observed ( $d=0.2$ —small,  $d=0.5$ —medium, and  $d\geq 0.8$ —  
205 large) (Cohen 1990; Sullivan and Feinn 2012). Values are  
206 expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). The  
207 level of significance was set at  $P\leq 0.05$ .

### 208 Results

209 As shown in Fig. 1A, there was a significant reduction  
210 [ $t(16)=2.16$ ;  $P=0.05$ ] in the locomotion parameter for the  
211 rotenone group, compared to the sham. Complementary, the



**Fig. 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

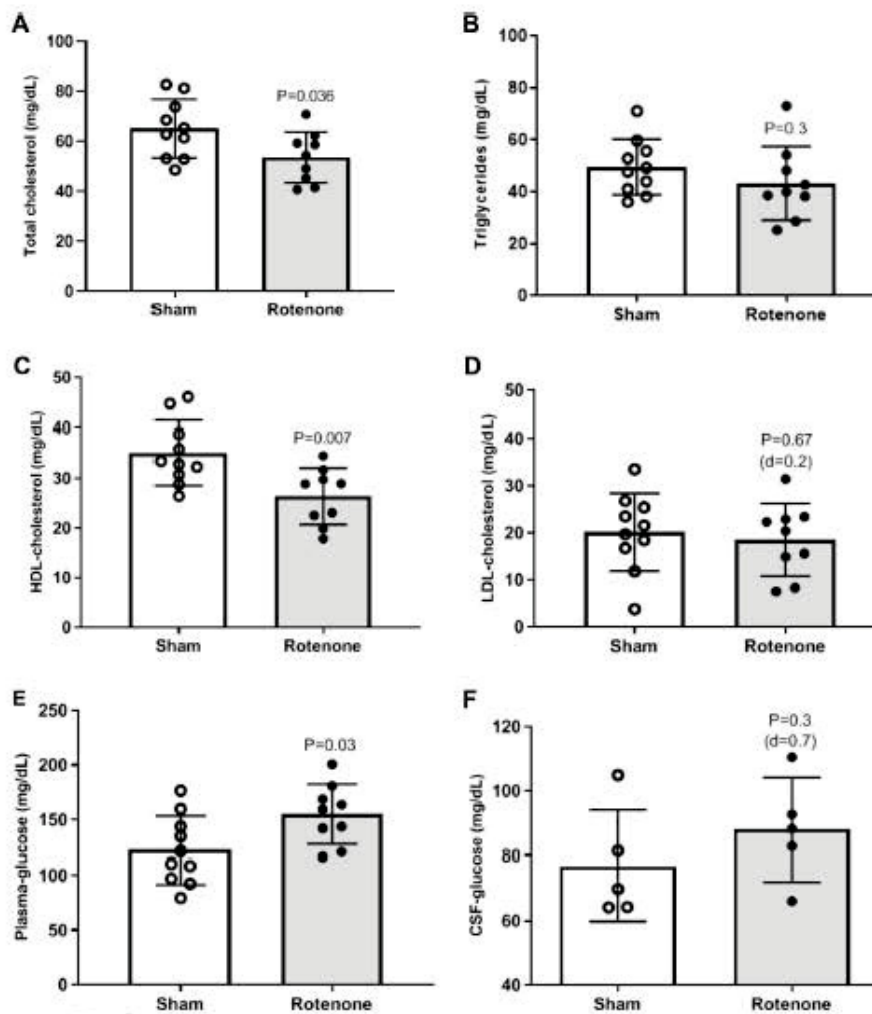
sham or rotenone groups. Also, considering these separate correlations, it was obtained a  $z$ -score ( $z$ ) for sham ( $z=-0.72$ ) and rotenone ( $z=-1.66$ ) groups. **D** Weights (grams)  $t(16)=1.64$ ;  $P=0.12$ . The data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean ( $n=9-10$  per group). Unpaired  $t$  test

212 analysis of the immobility time (Fig. 1B) demonstrated a  
213 significant increase of this parameter for the rotenone group,  
214 when compared to the sham [ $t(16)=2.76$ ;  $P=0.001$ ]. To  
215 provide a clear behavioral demonstration of the intrinsic  
216 association between these two parameters (locomotion and  
217 immobility) as a validation of our PD model, we showed  
218 (Fig. 1C) the existence of a strong negative correlation  
219 between them ( $r=-0.85$ ;  $P<0.0001$ ). In addition, we demon-  
220 strated that dopaminergic lesion within the SNpc, by the  
221 rotenone infusion, did not affect the mean weight of the ani-  
222 mals (Fig. 1D), compared to the sham group [ $t(16)=1.64$ ;  
223  $P=0.12$ ].

224 The evaluation of the biochemical parameters indicated  
225 the occurrence of a significant decrease in the total-choles-  
226 terol concentration (Fig. 2A) in the rotenone group, com-  
227 pared to the sham group [ $t(17)=2.27$ ;  $P=0.036$ ]. However,  
228 we did not observe statistical differences concerning the  
229 levels of triglycerides' concentrations (Fig. 2B) between  
230 both groups [ $t(17)=1.07$ ;  $P=0.28$ ]. Further, HDL-cho-  
231 lesterol showed to be reduced [ $t(17)=3.08$ ;  $P=0.007$ ] as  
232 a product of the rotenone intranigral lesion, considering

233 the comparison with the sham group (Fig. 2C). How-  
234 ever, as shown by Fig. 2D, no difference was detected,  
235 between the groups, regarding the levels of LDL-choles-  
236 terol [ $t(17)=0.43$ ;  $P=0.67$ ]. Interestingly, the detection of  
237 plasma-glucose (Fig. 2E) revealed a significant increase of  
238 this parameter induced by rotenone, compared to the sham  
239 group [ $t(17)=2.43$ ;  $P=0.03$ ]. In contrast, we could not find  
240 a significant difference between the groups, when the levels  
241 of CSF-glucose (Fig. 2F) were measured [ $t(8)=1.06$ ;  
242  $P=0.3$ ].

243 A complementary analysis emphasized the existence  
244 of a significant and strong positive correlation ( $r=0.80$ ;  
245  $P=0.0001$ ) between total-cholesterol and LDL-cholesterol.  
246 Likewise, there was observed an equally strong correla-  
247 tion between plasma-glucose and CSF-glucose ( $r=0.81$ ;  
248  $P=0.004$ ). In opposite, we could not find any other signifi-  
249 cant correlation for the following variables: total-cholesterol  
250 and HDL-cholesterol ( $r=0.19$ ;  $P=0.43$ ); total-cholesterol  
251 and triglycerides ( $r=0.006$ ;  $P=0.9$ ); total-cholesterol and  
252 plasma-glucose ( $r=-0.15$ ;  $P=0.5$ ); total-cholesterol and  
253 CSF-glucose ( $r=-0.37$ ;  $P=0.3$ ); total-cholesterol and



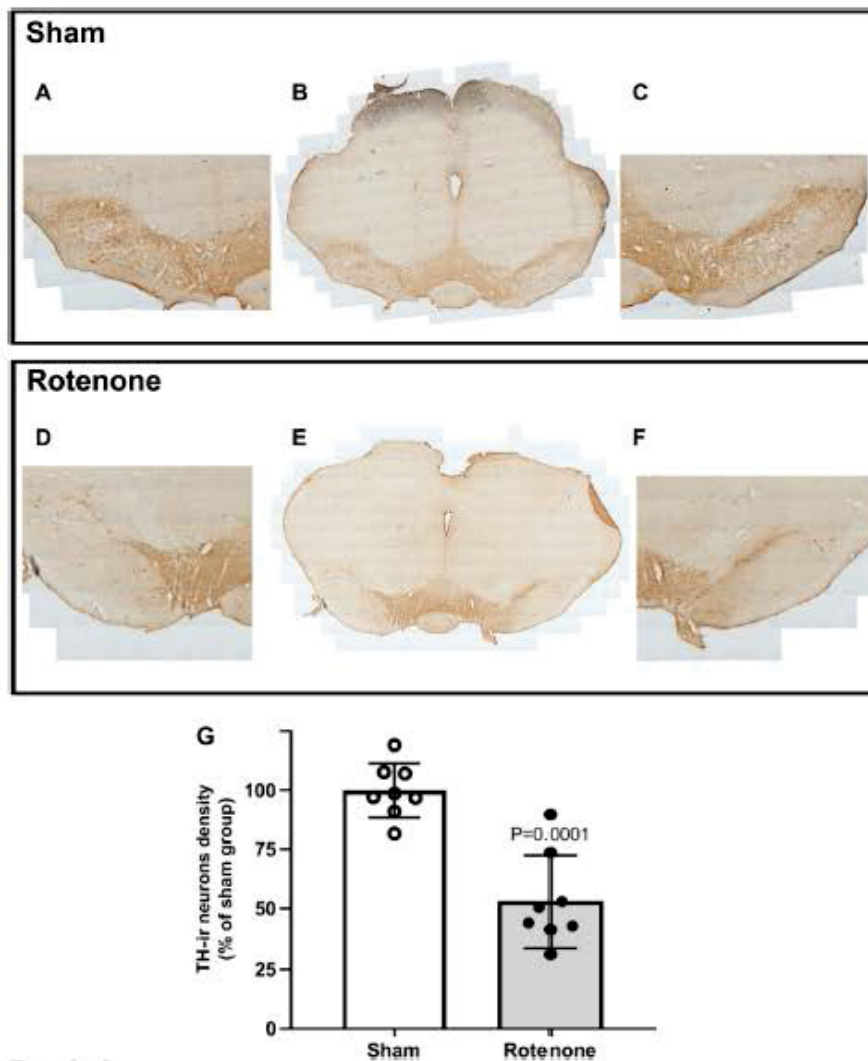
**Fig. 2** Biochemical alterations inflicted by intranigral rotenone. **A** Cholesterol,  $t(17)=2.27$ ;  $P=0.036$ . **B** Triglycerides,  $t(17)=1.107$ ;  $P=0.28$ . **C** HDL-cholesterol,  $t(17)=3.08$ ;  $P=0.007$ . **D** LDL-cholesterol  $t(17)=0.43$ ;  $P=0.67$ , effect size ( $d=0.2$ ) small. **E** Plasma glu-

cose  $t(17)=2.43$ ;  $P=0.03$ . **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

254 locomotion ( $r=0.013$ ;  $P=0.96$ ); total-cholesterol and  
 255 immobility ( $r=-0.091$ ;  $P=0.71$ ); HDL-cholesterol and  
 256 LDL-cholesterol ( $r=0.051$ ;  $P=0.84$ ); HDL-cholesterol  
 257 and locomotion ( $r=0.15$ ;  $P=0.55$ ); HDL-cholesterol and  
 258 immobility ( $-0.07$ ;  $0.76$ ); plasma-glucose and locomotion  
 259 ( $r=-0.03$ ;  $P=0.92$ ); plasma-glucose and immobility  
 260 ( $r=0.19$ ;  $P=0.44$ ); plasma-glucose  $\times$  weight ( $r=-0.22$ ;  
 261  $P=0.37$ ); total-cholesterol and weight ( $r=0.25$ ;  $P=0.32$ );

262 locomotion and weight ( $r=0.4$ ;  $P=0.1$ ); HDL-cholesterol  
 263 and weight ( $r=-0.04$ ;  $P=0.9$ ); LDL-cholesterol and  
 264 weight ( $r=0.3$ ;  $P=0.3$ ); CSF-glucose and weight ( $r=-0.4$ ;  
 265  $P=0.2$ ); triglycerides and weight ( $r=0.3$ ;  $P=0.3$ ).

266 The analysis of the lesion extension inflicted by rotenone  
 267 (Fig. 3) showed a significant reduction ( $P<0.0001$ ) in the  
 268 percentage of TH-immunoreactive neurons within the SNpc,  
 269 compared to the sham group [ $t(17)=5.91$ ;  $P<0.0001$ ].



**Fig. 3** Percentage of TH-immunoreactive neurons in the SNpc in relation to the sham group. Representative images are shown for the sham (A, B, C) and rotenone groups (D, E, F). Panoramic images (10 $\times$  magnification) are shown in B for the sham and E for the rotenone groups. Detailed micrographs (40 $\times$  magnification) are

represented in A and C for the sham and D and E for the rotenone group. G represents the comparison of the percentages of TH-immunoreactive neurons between the groups. The data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean ( $n=8$  per group). Unpaired  $t$  test

## 270 Discussion

271 In the present study, we investigated the metabolic and motor  
272 effects following an acute intranigral lesion induced by  
273 rotenone. As expected, our PD model was able to replicate

the typical motor behavior impairment seen in this disease 274  
(Swarnkar et al. 2010; Santiago et al. 2010; Fathalla et al. 275  
2016; Kmıta et al. 2019). Complementary, we settled this 276  
pattern of motor deficit with the observation of a strong 277  
negative correlation between locomotion and immobility 278

279 time ( $r = -0.85$ ), including both groups (sham and rotenone). That is, the higher was the immobility time, the lower  
 280 was the locomotion units counted during the test. To isolate  
 281 the effect produced by each group, we correlated the motor  
 282 parameters solely using the data from the sham or rotenone  
 283 groups. Thus, such analysis showed a moderate coefficient  
 284 value ( $r = -0.72$ ;  $P = 0.03$ ) obtained for the sham group and  
 285 a strong coefficient ( $r = -0.93$ ;  $P = 0.0003$ ) for the rotenone  
 286 group. Since both coefficients were significant, but different  
 287 in terms of probabilities, we decided to compare the equivalent  
 288  $z$ -scores for each of the groups. Accordingly, it was generated  
 289 a critical  $z$ -score, for the sham group ( $z = -0.91$ ) and  
 290 for the rotenone group ( $z = -1.66$ ). Since  $z$ -score is a measure  
 291 of how many standard deviations below or above the population  
 292 mean a raw score is, these results revealed that  
 293 81.8% of the correlation effect was associated with the sham  
 294 group, although 95.1% of the correlation effect was due to  
 295 rotenone lesion itself. Hence, this increment in 13.3% of the  
 296 effect, due to the presence of the rotenone group, strongly  
 297 corroborates the behavioral validity of the intranigral model  
 298 of PD.

300 Biochemical analysis of plasma showed a reduction in  
 301 both total-cholesterol and HDL-cholesterol concentrations  
 302 associated with the rotenone exposure. Nevertheless,  
 303 we failed to detect statistical differences, between groups,  
 304 regarding the triglycerides and LDL-cholesterol plasmatic  
 305 concentrations. Instead, it was observed a strong correlation  
 306 ( $r = 0.8$ ;  $P = 0.0001$ ) between total-cholesterol and LDL-  
 307 cholesterol concentrations. Since the latter was not affected by  
 308 the rotenone lesion itself, we calculated the effect size ( $d$ ),  
 309 after this comparison, to assess the impact of the intranigral  
 310 rotenone in LDL-cholesterol. In fact, we obtained a small  
 311 ( $d = 0.2$ ) relative effect size, firmly indicating that the correlation  
 312 described is entirely a product of the rotenone-induced  
 313 reduction in the total-cholesterol levels. Moreover, no significant  
 314 correlation was noticed between total-cholesterol  
 315 and HDL-cholesterol concentrations (both affected by rotenone  
 316 lesion), probably because both parameters were equally  
 317 affected by the neurotoxin. These rotenone-induced reductions  
 318 in total and HDL-cholesterol levels could indicate that  
 319 this neurotoxin is able to promote some significant modulation  
 320 in cholesterol extrusion (Huang and Mahley 2014),  
 321 perhaps hampering the apolipoprotein-E binding activity  
 322 (Colardo et al. 2022), thus impacting in cholesterol imbalance  
 323 in the brain, as well. Cholesterol brain homeostasis is  
 324 indispensable for neuronal physiology, as a structural component  
 325 for cellular membrane, synapses metabolism, and myelin sheath  
 326 (Mahley 2016). For instance, in SH-SY5Y neurons co-exposed  
 327 to a hypercholesterolemic condition and to the neurotoxin  
 328 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), it was reported an  
 329 exacerbation of mitochondrial toxicity, probably due to increased  
 330 membrane lipid peroxidation and free radical generation  
 331 (Raju et al. 2018). Certainly, the

332 mechanisms of rotenone-induced cholesterol changes are  
 333 still far from being understood, but our data are the first  
 334 evidence that intranigral rotenone could potentially impact  
 335 such peripheral metabolism with conceivable repercussions  
 336 for locomotor behaviors, probably in later time points.

337 Another parameter that was strikingly affected by the  
 338 intranigral rotenone lesion is the plasma-glucose concentration.  
 339 In fact, the significant increase induced by rotenone,  
 340 apparently, was not equally extended to CSF-glucose concentration.  
 341 Notwithstanding, the verification of a strong correlation  
 342 ( $r = 0.81$ ;  $P = 0.004$ ) between those two parameters  
 343 builds up a hypothesis related to a hyperglycemia repercussion  
 344 from the plasma to the CSF. Indeed, the calculation of the effect  
 345 size for CSF-glucose levels showed a medium-to-large effect  
 346 ( $d = 0.7$ ) attributed to rotenone lesion, which emphasizes our  
 347 hypothesis of a peripheral and central hyperglycemic-induced  
 348 effect. Glucose is the obligatory energy substrate of the adult  
 349 brain and dopaminergic neurons in the SNpc consume a significant  
 350 amount of energy during their pace making activity, which leads  
 351 to increased levels of basal oxidative stress (Guzman et al. 2010).  
 352 Therefore, energy failure associated with mitochondrial dysfunction  
 353 is a very relevant hallmark of PD (Gibson et al. 2003; Perier  
 354 and Vila 2012). Moreover, rotenone is largely used to induce  
 355 mitochondrial dysfunction in dopaminergic cells (Testa et al.  
 356 2005; Panov et al. 2005; Martinez and Greenamyre 2012)  
 357 through a mechanism associated with complex I inhibition  
 358 (de la Fuente et al. 2017) and the generation of ROS (Cartelli  
 359 et al. 2010; Dranka et al. 2012). Together, we suggest that  
 360 this hyperglycemic metabolic dysfunction could be explained,  
 361 at least, with two, not excluding, mechanisms: (1) acute and  
 362 systemic mitochondrial rotenone toxicity; (2) SNpc nigral  
 363 toxicity. The first mechanism supports the peripheral changes  
 364 herein described, while the second may hold the explanation  
 365 for the purportedly central effects of hyperglycemia within  
 366 the CSF. Also, the literature brings interesting evidence of  
 367 profound alterations in the pentose phosphate pathway  
 368 induced by mitochondrial complex I inhibition (Lei et al. 2014).  
 369 The same study also found an increase in the expression of  
 370 glucose-6-phosphate dehydrogenase due to this mitochondrial  
 371 inhibition and associated such increment with a higher cellular  
 372 toxicity (Lei et al. 2014). Complementary, type-2 diabetes  
 373 mellitus affects the regulation of dopaminergic transmission  
 374 and maintenance of synapses' metabolism (Bassil et al. 2014).  
 375 The brains of PD patients with type-2 diabetes mellitus exhibit  
 376 a process similar to peripheral insulin resistance, suggesting  
 377 potential common molecular pathways, which brings more  
 378 relevance to our findings. In animal models, both mice treated  
 379 with high-fat diets and leptin receptor homozygous-deficient  
 380 mice exhibit increased vulnerability to nigrostriatal neurodegeneration  
 381 (Pérez-Taboada et al. 2020), again indicating the close  
 382 relationship between diseases. Considering that  
 383

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. In fact, we did not observe any significant correlation between the metabolic parameters with the weights of animals from both groups, as well as for the behaviors and weights. 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. Also, it was revealed a potential ability to produce relevant metabolic dysfunctions like plasmatic hyperglycemia 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 for neurodegeneration.

**Acknowledgements** The authors wish to express their sincere gratitude to Dr. Fabio Roberto Caetano from Physiology Department of UFPR for the technical assistance. This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Finance code 001), Edital Pro-equipamentos, FINEP—Edital Pro-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 (#306432/2022-6).

**Data availability statement** Data will be made available on reasonable request.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

Bar-On P, Crews L, Koob AO et al (2008) Statins reduce neuronal  $\alpha$ -synuclein aggregation in *in vitro* models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 105:1656–1667. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05254.x>

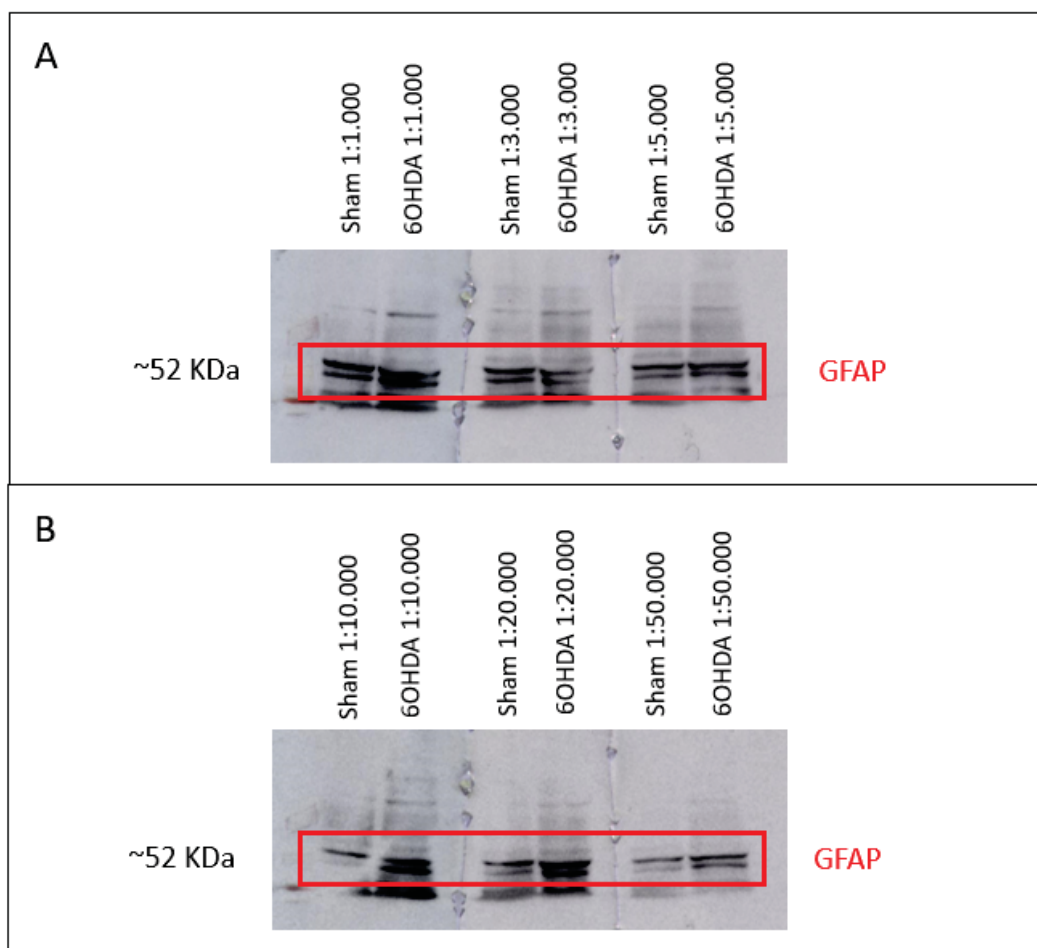
- Bassil F, Fernagut PO, Bezdard E, Meissner WG (2014) Insulin, IGF-1 and GLP-1 signaling in neurodegenerative disorders: targets for disease modification? *Prog Neurobiol* 118:1–18
- Bonato JM, Bassani TB, Milani H et al (2018) Pioglitazone reduces mortality, prevents depressive-like behavior, and impacts hippocampal neurogenesis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in rats. *Exp Neurol* 300:188–200. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.11.009>
- Bykov K, Yoshida K, Weisskopf MG, Gagne JJ (2017) Confounding of the association between statins and Parkinson disease: systematic review and meta-analysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 26:294–300. <https://doi.org/10.1002/pds.4079>
- Cartelli D, Ronchi C, Maggioni MG et al (2010) Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondrial damage in MPP+ induced neurodegeneration. *J Neurochem* 115:247–258. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06924.x>
- Chia SJ, Tan EK, Chao YX (2020) Historical perspective: models of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci* 21
- Chohan H, Senkevich K, Patel RK et al (2021) Type 2 diabetes as a determinant of Parkinson's disease risk and progression. *Mov Disord* 36:1420–1429. <https://doi.org/10.1002/mds.28551>
- Cohen J (1990) Things I have learned (so far). *Am Psychol* 45:1304–1312
- Colardo M, Petrarola 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*. <https://doi.org/10.3390/ijms23094842>
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889–909. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00568-3)
- de la Fuente C, Burke DG, Eaton S, Heales SJR (2017) Inhibition of neuronal mitochondrial complex I or lysosomal glucocerebrosidase is associated with increased dopamine and serotonin turnover. *Neurochem Int* 109:94–100. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.02.013>
- Doria M, Maugeat L, Moreau T et al (2016) Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 101:393–400
- Dranka BP, Zielonka J, Kanthasamy AG, Kalyanaraman B (2012) Alterations in bioenergetic function induced by Parkinson's disease mimetic compounds: lack of correlation with superoxide generation. *J Neurochem* 122:941–951. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07836.x>
- Fathalla AM, Soliman AM, Ali MH, Moustafa AA (2016) Adenosine A2A receptor blockade prevents rotenone-induced motor impairment in a rat model of parkinsonism. *Front Behav Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00035>
- García-Sanz P, AertsMoratalla MFGR (2021) The role of cholesterol in  $\alpha$ -synuclein and lewy body pathology in GBA1 Parkinson's disease. *Mov Disord* 36:1070–1085
- Gibson GE, Kingsbury AE, Xu H et al (2003) Deficits in a tricarboxylic acid cycle enzyme in brains from patients with Parkinson's disease. *Neurochem Int* 43:129–135. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00225-5](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00225-5)
- Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D et al (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468:696–700. <https://doi.org/10.1038/nature09536>
- Hirsch L, Jette N, Frolkis A et al (2016) The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 46:292–300
- Hogg E, Athreya K, Basile C et al (2018) High prevalence of undiagnosed insulin resistance in non-diabetic subjects with Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 8:259–265. <https://doi.org/10.3233/JPD-181305>
- Hu G, Jousilahti P, Bidet S et al (2007) Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. <https://doi.org/10.2337/d006>

- Huang Y, Mahley RW (2014) Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis* 72:3–12
- Huang X, Sterling NW, Du Get al (2019) Brain cholesterol metabolism and Parkinson's disease. *Mov Disord* 34:386–395. <https://doi.org/10.1002/mds.27609>
- Jeong SM, Jang W, Shin DW (2019) Association of statin use with Parkinson's disease: Dose–response relationship. *Mov Disord* 34:1014–1021. <https://doi.org/10.1002/mds.27681>
- Jin U, Park SJ, Park SM (2019) Cholesterol metabolism in the brain and its association with Parkinson's disease. *Exp Neurobiol* 28:554–567
- Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP (2006) Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci* 26:5256–5264. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0984-06.2006>
- Kmita LC, Ilkiw JL, Rodrigues LS et al (2019) 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*, pp 196–202
- Komici K, Femmineilla GD, Bencivenga L, Rengo G, Pagano G (2021) Diabetes mellitus and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Parkinsons Dis* 1(4):1585–1596. <https://doi.org/10.3233/JPD-212725>
- Lei S, Zavala-Flores L, Garcia-Garcia A et al (2014) 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. <https://doi.org/10.1021/cb400894a>
- Lin CH, Chang CH, Tai CH et al (2021) A double-blind, randomized, controlled trial of lovastatin in early-stage Parkinson's disease. *Mov Disord* 36:1229–1237. <https://doi.org/10.1002/mds.28474>
- Madiha S, Batool Z, Tabassum S et al (2021) Quercetin exhibits potent antioxidant activity, restores motor and non-motor deficits induced by rotenone toxicity. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258928>
- Mahley RW (2016) Central nervous system lipoproteins: ApoE and regulation of cholesterol metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:1305–1315. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307023>
- Marques A, Duthel F, Durand E et al (2018) Glucose dysregulation in Parkinson's disease: too much glucose or not enough insulin? *Parkinsonism Relat Disord* 55:122–127. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.05.026>
- Martinez TN, Greenamyre JT (2012) Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 16:920–934
- Mutez E, Duhamel A, Defebvre L et al (2009) Lipid-lowering drugs are associated with delayed onset and slower course of Parkinson's disease. *Pharmacol Res* 60:41–45. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.03.010>
- Nakamura K, Mori F, Tanji K et al (2015) Isopentenyl diphosphate isomerase, a cholesterol synthesizing enzyme, is localized in Lewy bodies. *Neuropathology* 35:432–440. <https://doi.org/10.1111/neup.12204>
- Noseda ACD, Rodrigues LS, Targa ADS et al (2014) Putative role of monoamines in the antidepressant-like mechanism induced by striatal MT2 blockade. *Behav Brain Res* 275:136–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.007>
- Pagano G, Polychronis S, Wilson H et al (2018) Diabetes mellitus and Parkinson disease. *Neurology* 90:E1654–E1662. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005475>
- Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N et al (2005) Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem* 280:42026–42035. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508628200>
- Paxinos WC (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Orlando
- Pegg CC, He C, Stroink AR et al (2010) Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. *J Neurosci Methods* 187:8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.12.002>
- Pérez-Taboada I, Alberquilla S, Martín ED et al (2020) Diabetes causes dysfunctional dopamine neurotransmission favoring nigrostriatal degeneration in mice. *Mov Disord* 35:1636–1648. <https://doi.org/10.1002/mds.28124>
- Perser C, Vila M (2012) Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009332>
- Piatkowska-Chmiel I, Herbet M, Gawronska-Grzywacz M, Dudka J (2022) Regulation of neuroinflammatory signaling by PPAR $\gamma$  agonist in mouse model of diabetes. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms23105502>
- Pinto M, Nissanka N, Peralta S et al (2016) Pioglitazone ameliorates the phenotype of a novel Parkinson's disease mouse model by reducing neuroinflammation. *Mol Neurodegener*. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0090-7>
- Raju A, Jaisankar P, Borah A, Mohanakumar KP (2018) 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced death of differentiated SH-SY5Y neurons is potentiated by cholesterol. *Ann Neurosci* 24:243–251. <https://doi.org/10.1159/000481551>
- Rodrigues LS, Targa ADS, Noseda ACD et al (2014) Olfactory impairment in the rotenone model of parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. *Front Cell Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00383>
- Sánchez-Gómez A, Díaz Y, Duarte-Salles T et al (2021) Prediabetes, type 2 diabetes mellitus and risk of Parkinson's disease: a population-based cohort study. *Parkinsonism Relat Disord* 89:22–27. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.06.002>
- Santiago RM, Barbiero J, Lima MMS et al (2010) 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. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2010.06.004>
- Saravanan KS, Sindhu KM, Mohanakumar KP (2005) Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. *Brain Res* 1049:147–155. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.051>
- Schapiro AHV, Chaudhuri KR, Jenner P (2017) Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci* 18:435–450
- Schernhammer E, Hansen J, Rugbjerg K et al (2011) Diabetes and the risk of developing Parkinson's disease in Denmark. *Diabetes Care* 34:1102–1108. <https://doi.org/10.2337/dc10-1333>
- Stern MB, Lang A, Poewe W (2012) Toward a redefinition of Parkinson's disease. *Mov Disord* 27:54–60
- Sullivan GM, Feinn R (2012) Using effect size—or why the p value is not enough. *J Grad Med Educ* 4:279–282. <https://doi.org/10.4300/jgme-4-12-00156.1>
- Swarnkar S, Singh S, Mathur R et al (2010) A study to correlate rotenone induced biochemical changes and cerebral damage in brain areas with neuromuscular coordination in rats. *Toxicology* 272:17–22. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.03.019>
- Testa CM, Sherer TB, Greenamyre JT (2005) Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Mol Brain Res* 134:109–118. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.11.007>
- Tysnes OB, Storstein A (2017) Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 124:901–905

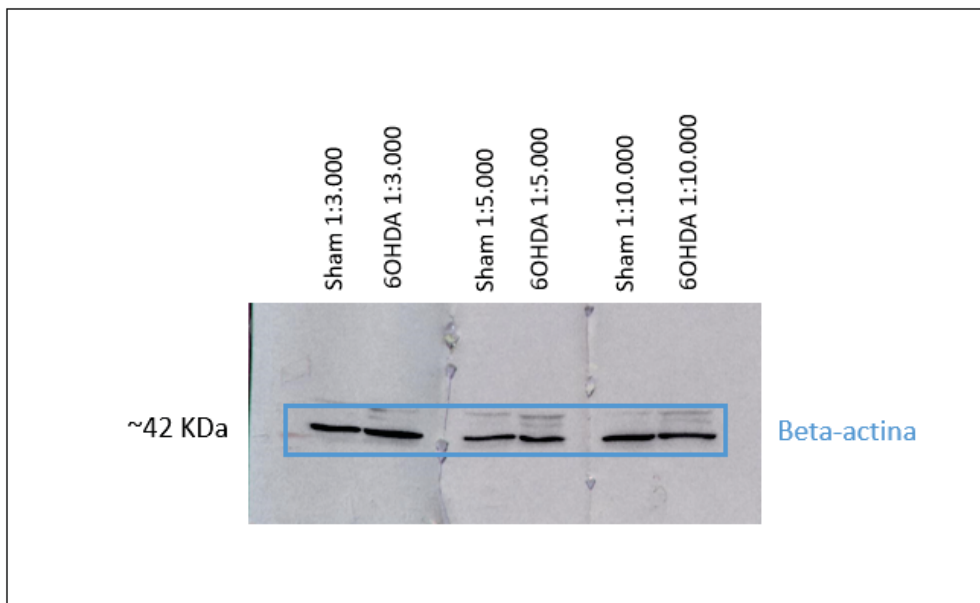
## 8. MATERIAL SUPLEMENTAR

### 8.1 PADRONIZAÇÃO DO WESTERN BLOT PARA GFAP

Para a padronização da quantificação de GFAP e beta-actina por Western Blot foram realizadas curvas com concentrações variadas de anticorpos a fim de se obter a melhor quantificação necessária. No painel 1, a figura A demonstra a revelação das 3 membranas com a curva de concentração de anticorpo primário anti-GFAP, enquanto a figura B demonstra a revelação da curva de concentração do anticorpo secundário anti-HRP ligado ao anti-GFAP (1:5.000). O painel 2 exibe o resultado da curva do anticorpo primário da beta-actina.



Painel 1.Revelação das membranas para a padronização de GFAP. Figura A demonstra a revelação das 3 membranas com a curva de concentração de anticorpo primário anti-GFAP em 1:1.000, 1:3.000 e 1:5.000 nas amostras Sham e 6OHDA, enquanto a figura B demonstra a revelação da curva de concentração do anticorpo secundário anti-HRP 1:10.000, 1:20.000 e 1:50.000 ligado ao anti-GFAP (1:5.000). A visualização das bandas (destacadas em vermelho) foi realizada com o sistema de quimioluminescência (ECL, Pierce) e o peso molecular correto foi verificado através do marcador de peso (Raibow marker).



Painel 2. Revelação das membranas para a padronização de beta actina. Demonstração da revelação das 3 membranas com a curva de concentração de anticorpo primário anti beta-actina em 1:3.000, 1:5.000 e 1:10.000 nas amostras Sham e 6OHDA. A visualização das bandas (destacadas em azul) foi realizada com o sistema de quimioluminescência (ECL, Pierce) e o peso molecular correto foi verificado através do marcador de peso (Rainbow maker).

Como demonstrado, na figura A do painel X foi selecionada a concentração de 1:5000 do anticorpo primário anti-GFAP devida a resolução superior das bandas de interesse, menor arrastamento e background reduzido comparado às concentrações superiores de 1:1000 e 1:3000. Na figura B, utilizando a concentração de 1:5000 do anticorpo primário para seleção da concentração ideal do anticorpo secundário anti-HRP, a concentração de 1:50.000 também possui características preferíveis para quantificação, permitindo boa visualização das bandas de interesse e reduzido background. Também foi feita a curva de padronização para beta-actina como demonstrada no painel 2. A concentração de anticorpo de 1:10.000 foi selecionada pois demonstrou ótima resolução de banda e será utilizada apropriadamente em membranas futuras para padronização do Western Blot e o secundário foi utilizado 1:25.000, padrão para Beta-actina.

## 8.2 TESTES DE NORMALIDADE

Para a análise estatística, todos os dados passaram por testes de normalidade para serem classificados como paramétricos ou não-paramétricos de acordo com a escala gaussiana. Abaixo estão as tabelas contendo os testes de normalidade de cada análise do projeto. Pelas características de variabilidade de nossos resultados escolhemos o teste Shapiro-Wilk como teste principal para avaliação da normalidade.

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,2175	0,8354	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	0,8899	0,6408	Sim	ns
Shapiro-Wilk (W)	0,9852	0,5795	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,05934	0,1000	Sim	ns

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,4880	0,2159	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	0,1951	0,9071	Sim	ns
Shapiro-Wilk (W)	0,9863	0,7005	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,1025	0,0921	Sim	ns

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
----------------------	-------------	------------	--	-------------------

Anderson-Darling (A2*)	0,8515	0,0271	Não	*
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	3,667	0,1598	Sim	ns
Shapiro-Wilk (W)	0,9707	0,1089	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,1194	0,0175	Não	*

Tabela 5. Testes de normalidade - TRO 14 dias (teste)

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,3508	0,4608	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	0,4880	0,7835	Sim	ns
Shapiro-Wilk (W)	0,9854	0,6320	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,09215	0,1000	Sim	ns

Tabela 6. Testes de normalidade - TRS 7 dias

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,2574	0,7136	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	0,8612	0,6501	Sim	ns
Shapiro-Wilk (W)	0,9922	0,8329	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,06084	0,1000	Sim	ns

Tabela 7. Testes de normalidade - TRS 14 dias

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,2306	0,8014	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	1,796	0,4074	Sim	ns

Shapiro-Wilk (W)	0,9937	0,8047	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,03644	0,1000	Sim	ns

Tabela 8. Testes de normalidade - GFAP SN 7 dias

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,3058	0,5218	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	1,245	0,5365	Sim	ns
Shapiro-Wilk (W)	0,9491	0,5470	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,1598	0,1000	Sim	ns

Tabela 9. Testes de normalidade - GFAP SN 14 dias

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,1941	0,8662	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	0,3998	0,8188	Sim	ns
Shapiro-Wilk (W)	0,9723	0,9196	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,1322	0,1000	Sim	ns

Tabela 10. Testes de normalidade - GFAP alfa-BO 7 dias

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,4273	0,2684	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	7,329	0,0256	Não	*
Shapiro-Wilk (W)	0,9098	0,1564	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,1604	0,1000	Sim	ns

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,2323	0,7485	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	0,8830	0,6431	Sim	ns
Shapiro-Wilk (W)	0,9541	0,6608	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,1375	0,1000	Sim	ns

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,3454	0,4305	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	3,414	0,1814	Sim	ns
Shapiro-Wilk (W)	0,9300	0,3056	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,1444	0,1000	Sim	ns

Teste de Normalidade	Estatística	valor de P	Passou no teste de normalidade? (alpha=0,05)	Resumo do valor P
Anderson-Darling (A2*)	0,1109	0,9894	Sim	ns
D'Agostino-Pearson omnibus (K2)	0,2538	0,8808	Sim	ns
Shapiro-Wilk (W)	0,9924	>0,9999	Sim	ns
Kolmogorov-Smirnov (distance)	0,08663	0,1000	Sim	ns