

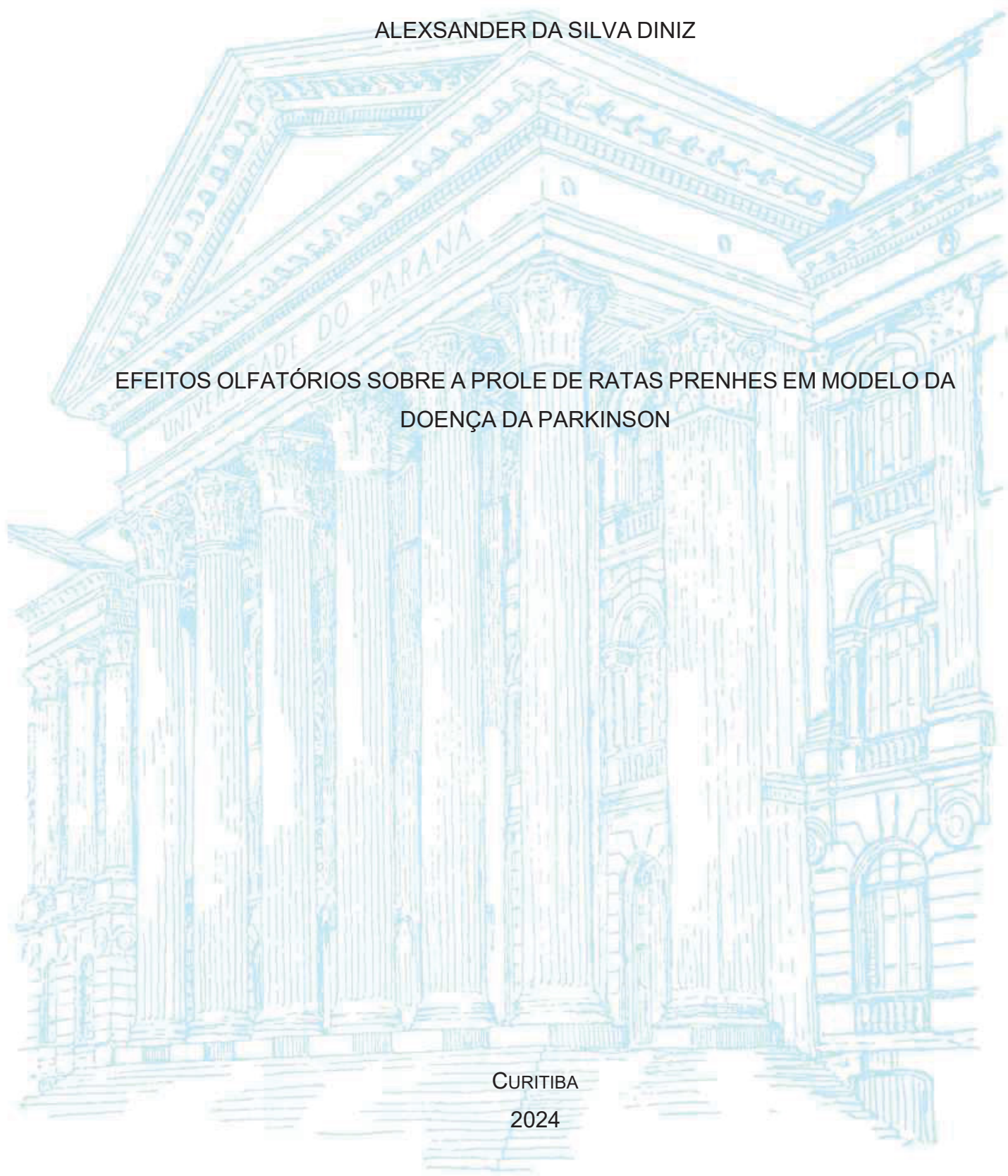
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALEXSANDER DA SILVA DINIZ

EFEITOS OLFATÓRIOS SOBRE A PROLE DE RATAS PRENHES EM MODELO DA
DOENÇA DA PARKINSON

CURITIBA

2024



ALEXSANDER DA SILVA DINIZ

EFEITOS OLFATÓRIOS SOBRE A PROLE DE RATAS PRENHES EM MODELO DA
DOENÇA DA PARKINSON

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo M. S. Lima

Coorientadora: Dra. Lais S. Rodrigues

CURITIBA

2024

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

Diniz, A. S.

Efeitos olfatórios sobre a prole de ratas prenhes em modelo da Doença da Parkinson. /
Alexsander da Silva Diniz. – Curitiba, 2024.
recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo M. S. Lima.

Coorientadora: Dra. Lais S. Rodrigues.

1. Parkinson, Doença de. 2. Rotenona. 3. Transtornos do Olfato. 4. Caracteres
Sexuais. I. Lima, Marcelo de Meira Santos, 1978-. II. Rodrigues, Lais Soares, 1988-. III.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia. IV. 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

ATA Nº83

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FISILOGIA

No dia vinte e nove de fevereiro de dois mil e vinte e quatro às 09:00 horas, na sala 103, Auditório do Departamento de Fisiologia, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **ALEXSANDER DA SILVA DINIZ**, intitulada: **EFEITOS OLFATÓRIOS SOBRE A PROLE DE RATAS PRENHES EM MODELO DA DOENÇA DA PARKINSON**, sob orientação do Prof. Dr. **MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: **MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)**, **JANAÍNA MENEZES ZANVELI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)**, **ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)**. A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela **APROVAÇÃO**. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, **MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA**, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 29 de Fevereiro de 2024.

Assinatura Eletrônica

08/03/2024 16:49:51.0

MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/02/2024 13:32:27.0

JANAÍNA MENEZES ZANVELI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/02/2024 12:27:31.0

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



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 Dissertação de Mestrado de **ALEXSANDER DA SILVA DINIZ** intitulada: **EFEITOS OLFATÓRIOS SOBRE A PROLE DE RATAS PRENHES EM MODELO DA DOENÇA DA PARKINSON**, sob orientação do Prof. Dr. **MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre 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, 29 de Fevereiro de 2024.

Assinatura Eletrônica

08/03/2024 16:49:51.0

MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/02/2024 13:32:27.0

JANAÍNA MENEZES ZANOVELI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/02/2024 12:27:31.0

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que permitiu e possibilitou esse momento, pela vida e pela sua graça.

Agradeço aos meus pais pelo apoio e paciência, com sua presença e motivações constantes, além do amor incondicional.

Sou grato pela confiança depositada em meu trabalho pelo orientador, o Prof. Dr. Marcelo M. S. Lima, que, em momentos-chave, encontrou a palavra certa de incentivo e direcionamento para o melhor resultado possível.

Tenho grande gratidão pela coorientadora do trabalho, a Prof. Dra. Laís S. Rodrigues, que sempre teve prontidão em ensinar as metodologias e técnicas, com paciência e didática; sem isso, eu não conseguiria desenvolver o trabalho.

Aos companheiros de estudos, Sofia, Evellyn, Anderson, Franco e Gabriel, grandes cientistas que me ensinaram e me deram o prazer de sua amizade.

E, finalmente, à Universidade Federal do Paraná, à equipe pedagógica e à equipe de docentes, todos aqueles que constituem a instituição e o Programa de Pós-graduação e que me auxiliaram a crescer em conhecimento, dando as ferramentas para o meu desenvolvimento intelectual e acadêmico.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença degenerativa e progressiva, como principal característica a degeneração de neurônios dopaminérgicos, associados ao controle motor. Além dos sintomas motores característicos, como a bradicinesia e o tremor em repouso, os pacientes apresentam sintomas não motores, que podem surgir décadas antes dos sintomas motores se manifestarem. Entre esses sintomas, destaca-se o distúrbio olfatório, que afeta até 90% dos pacientes. Curiosamente, a doença apresenta diferenças na incidência entre homens e mulheres, com uma prevalência 1,5 a 2 vezes maior em homens. Neurotoxinas de exposição ambiental, como a rotenona, são classicamente utilizadas para mimetizar a DP em modelo animal, porém, poucos estudos investigam alterações associadas à DP com uma comparação entre os sexos. Além disso, é importante analisar se a exposição a esses agentes poderia causar alterações no período fetal com consequência no período pós-natal. Para verificar as possíveis alterações, realizamos nosso experimento em ambiente pré-natal, expondo as ratas progenitoras via subcutânea a neurotoxina rotenona durante a janela embriológica da formação do sistema olfatório e assim, comparando grupos que foram expostos a neurotoxina em ambiente pré-natal, pós-natal e em ambos os casos nos parâmetros motores e olfatório. Nesse sentido, nossos resultados apontam que a exposição em período fetal a neurotoxina rotenona causa diferentes efeitos no sistema motor e olfatório entre animais machos e fêmeas, sendo que fêmeas apresentam maior déficit motor, percorrendo uma menor distância no Campo Aberto. Diferentemente, onde machos apresentaram déficit olfatório, enquanto fêmeas continuam discriminando os odores familiar e não familiar. Em contrapartida, não foram observadas diferenças entre os sexos no teste de discriminação olfatória não social. Estes resultados apontam para um possível efeito neuroprotetor do estrogênio e apresenta importante caminho para novos estudos comparando machos e fêmeas e as vias olfatórias no modelo de DP. Com o nosso trabalho, podemos concluir que a exposição à neurotoxina rotenona em ambiente fetal demonstrou capacidade de gerar prejuízos sexo-dependentes em âmbito de discriminação olfatória na prole de ratas expostas em período pré-natal.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Rotenona; Distúrbio Olfatório; Diferenças sexuais.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a degenerative and progressive disease, primarily characterized by the degeneration of dopaminergic neurons associated with motor control. In addition to the characteristic motor symptoms, such as bradykinesia and resting tremor, patients present non-motor symptoms that can arise decades before the motor symptoms manifest. Among these symptoms, olfactory disturbance stands out, affecting up to 90% of patients. Interestingly, the disease shows differences in incidence between men and women, with a prevalence 1.5 to 2 times higher in men. Environmental neurotoxins, such as rotenone, are classically used to mimic PD in animal models; however, few studies investigate PD-associated alterations with a comparison between sexes. Furthermore, it is important to analyze whether exposure to these agents could cause changes during the fetal period with consequences in the postnatal period. To verify the possible alterations, we conducted our experiment in a prenatal environment, exposing the pregnant rats subcutaneously to the neurotoxin rotenone during the embryological window of olfactory system formation. We then compared groups exposed to the neurotoxin in prenatal, postnatal environments, and both cases in motor and olfactory parameters. In this regard, our results indicate that fetal exposure to the neurotoxin rotenone causes different effects on the motor and olfactory systems between male and female animals, with females showing greater motor deficits, traveling a shorter distance in the Open Field test. Conversely, males exhibited olfactory deficits, while females continued to discriminate between familiar and unfamiliar odors. On the other hand, no differences were observed between sexes in the non-social olfactory discrimination test. These results suggest a possible neuroprotective effect of estrogen and present an important pathway for new studies comparing males and females and the olfactory pathways in the PD model. With our work, we can conclude that fetal exposure to the neurotoxin rotenone demonstrated the capacity to generate sex-dependent impairments in olfactory discrimination in the offspring of rats exposed during the prenatal period.

Keywords: Parkinson's Disease; Rotenone; Olfactory Disturbance; Sexual Differences.

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| ATP | - Adenosina trifosfato |
| BO | - Bulbo olfatório |
| CA | - Campo aberto |
| CL | - Corpos de Lewy |
| DA | - Dopamina |
| DNA | - Ácido Desoxirribonucleico |
| DP | - Doença de Parkinson |
| EO | - Epitélio olfatório |
| ETC | - Cadeia de transporte de elétrons |
| LOT | - Trato olfatório lateral |
| MCU | - Complexo uniportador de Ca ²⁺ mitocondrial |
| MPTP | - 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine |
| NCLX | - Na ⁺ /Ca ²⁺ trocador mitocondrial |
| NO | - Nervo olfatório |
| OXPHOS | - Fosforilação oxidativa mitocondrial |
| ROS | - Espécies reativas de oxigênio |
| SNC | - Sistema nervoso central |
| SNpc | - Substância negra <i>pars compacta</i> |
| SUS | - Sistema Único de Saúde |
| SZV | - Zona subventricular |
| TDO | - Teste de discriminação olfatória |
| TRO | - Teste de Reconhecimento olfatório |
| TH-ir | - Neurônios tirosina hidroxilase imunorreativos |
| VDAC | - Canal aniônico dependente de voltagem |
| α -syn | - α -sinucleína |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1.1 | DOENÇA DE PARKINSON | 10 |
| 1.2 | FATORES GENÉTICOS DA DOENÇA DE PARKINSON..... | 11 |
| 1.3 | RELAÇÃO ENTRE DP E DANO MITOCONDRIAL | 12 |
| 1.4 | DIFERENÇAS SEXUAIS NA DOENÇA DE PARKINSON..... | 16 |
| 1.5 | DISTÚRBO OLFATÓRIO NA DOENÇA DE PARKINSON..... | 17 |
| 1.6 | EXPOSIÇÃO AMBIENTAL EM PERÍODO GESTACIONAL | 19 |
| 1.7 | EMBRIOLOGIA - FORMAÇÃO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO..... | 20 |
| 1.8 | MODELO DE ROTENONA PARA ESTUDOS DA DP | 22 |
| 1.9 | USOS CULTURAIS DA ROTENONA | 24 |
| 1.10 | RELAÇÃO DOENÇA DE PARKINSON E EXPOSSOMA ESPECÍFICO..... | 25 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 26 |
| 3 | OBJETIVOS | 27 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 27 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 4 | METODOLOGIA..... | 28 |
| 4.1 | ANIMAIS | 28 |
| 4.2 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL – EXPERIMENTO PARTE 1 | 29 |
| 4.3 | TESTE DO CAMPO ABERTO..... | 29 |
| 4.4 | DESAFIO NEUROTÓXICO - EXPERIMENTO PARTE 2 | 30 |
| 4.5 | TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA (TDO) | 31 |
| 4.6 | TESTE DE RECONHECIMENTO OLFATÓRIO (TRO) – ODOR NÃO SOCIAL..... | 32 |
| 4.7 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 33 |
| 5 | RESULTADOS | 33 |
| 5.1 | CAMPO ABERTO | 33 |
| 5.2 | TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA - ODOR SOCIAL..... | 36 |
| 5.3 | TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA - ODOR NÃO SOCIAL | 42 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 46 |
| 7 | CONCLUSÕES..... | 52 |
| | REFERÊNCIAS..... | 53 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma doença degenerativa e progressiva, caracterizada pela morte de células nervosas dopaminérgicas e está intimamente ligada a idade avançada. A DP é a segunda doença neurodegenerativa com maior incidência na população idosa, ficando atrás somente da Doença de Alzheimer (SHARMA *et al.*, 2021; KASDAGLI *et al.*, 2019).

Segundo o levantamento da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2022) em 2019, cerca de 8,5 milhões de pessoas apresentavam diagnóstico da doença em todo o mundo, porém, a incidência tem aumentado substancialmente nas últimas décadas e, a previsão epidemiológica é que a doença possa chegar a 12 milhões de casos até 2040. Isso implica em uma carga econômica que pode ultrapassar 79 bilhões de dólares à saúde pública (BLOEM *et al.*, 2021; MARTINEZ-MARTIN *et al.*, 2023). Tais fatos demonstram que a DP se apresenta como um problema de saúde, econômico e social cada vez maior.

Originalmente, a DP foi descrita por James Parkinson em 1817 em sua monografia com título *An essay on the shaking palsy* (Um ensaio sobre a paralisia agitante) onde a descreve como um distúrbio neurológico e faz as primeiras observações sobre a doença (PARKINSON, 2002) (versão digital). A partir disso, muitos estudos foram desenvolvidos e compreendeu-se que a principal característica da fisiopatologia da DP é a degeneração de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal do mesencéfalo, mais especificamente, na região ventrolateral da substância negra *pars compacta* (SNpc), que se projeta para o putâmen posterior, ligado a controle motor (BLESA *et al.*, 2022). Esta via é relacionada ao controle de tônus muscular e movimentos coordenados, nesse sentido, a degeneração das células dopaminérgicas causa um desequilíbrio entre a concentração de dopamina (DA) e de acetilcolina o que impacta na transmissão sináptica da via motora (SHARMA *et al.*, 2021). Ao passo que ocorre a degeneração de células dopaminérgicas, também ocorre a superexpressão e acúmulo de proteínas α -sinucleína (α -syn), gerando os Corpos de Lewy (CL) nas células restantes. Estima-se que os CL estejam ligados aos sintomas não motores e prodrômicos da doença (sintomas anteriores aos distúrbios motores, como a hiposmia) (BABATUNDE *et al.*, 2023). Tal informação foi confirmada por observações histológicas *post-mortem* do encéfalo de pacientes diagnosticados

com a DP, onde foi encontrada a presença de CL (MAGALHÃES E CARDOSO, 2023). O tremor em repouso está presente em aproximadamente 70 a 80% dos pacientes, chegando a 100% com o avanço da fisiopatologia, sendo que se inicia unilateralmente e, depois, se espalha contra lateralmente, podendo envolver as pernas, lábios, mandíbula e língua, mas raramente envolve a cabeça (SILVA, 2021).

Clinicamente, a DP é caracterizada por manifestações de sintomas motores e não motores, e em geral, manifestações prodrômicas são frequentemente de cunho não-motor, como a hiposmia, distúrbios de sono e constipação (Blesa, et al, 2022). Segundo Braak e colaboradores, (2003) os sintomas não motores podem ter origem em agregados proteicos de α -syn que se espalham e interrompem circuitos dopaminérgicos em áreas cerebrais como tronco e bulbo olfatório, décadas antes de aparecerem os sintomas motores. As características cardinais incluem tremor de repouso, bradicinesia, marcha alterada, instabilidade postural e rigidez. Tais condições além de aumentar o risco de quedas do paciente, impacta na qualidade de vida e pode levar ao isolamento social com sua progressão inibindo interações sociais (RADDER *et al.*, 2020). Sabe-se que os sintomas motores iniciam quando as células dopaminérgicas reduzem cerca de 70-80% na via nigroestriatal, mas os sintomas pré-motores como a hiposmia, podem estar evidentes anteriormente a este momento (CHUPROSKI *et al.*, 2023).

No Brasil, estima-se que haja em torno de 200 mil pessoas com a DP (SILVA *et al.*, 2021), porém, como a notificação sobre a doença não é obrigatória no Sistema Único de Saúde (SUS), não há como determinar oficialmente o tamanho da população atingida. De certo modo, faltam estudos epidemiológicos robustos no Brasil, visto que, por se tratar de um país etnicamente misto, pode existir diferentes padrões da doença na população, diferindo pela região, o padrão genético e o expossoma (padrão de exposição ambiental a neurotoxinas) (SANTOS-LOBATO *et al.*, 2021).

1.2 FATORES GENÉTICOS DA DOENÇA DE PARKINSON

As mutações do gene *LRKK2* são as causas mais comuns da DP genética. Essa mutação apresenta padrão de herança autossômica de penetrância incompleta, e

demonstra maior prevalência em mulheres (MEONI *et al.*, 2020). Estudos de genoma identificaram mais de 90 variantes de risco associados a DP, e dentre elas, 20 identificadas como mutações que causam formas monogênicas da DP, das quais podemos identificar os genes dominantes *SNCA*, *LRRK2*, *GBA* e *VPS35*, bem como, os genes recessivos *Parkin*, *PINK1*, *DJ1*. Em DP de início precoce (3-5% dos casos) os sintomas se iniciam antes dos 40 anos e está associado principalmente com o gene *PARK* mutante (POST *et al.*, 2020).

O genoma sozinho não é capaz de explicar a prevalência da DP, visto que, achados genéticos estão relacionados apenas com 3 – 10% dos casos esporádicos e 30% dos casos familiares (com a hereditariedade variando entre 0,23 e 0,79) (PRUNELL E OLIVERA-BRAVO, 2022; TANSEY *et al.*, 2022; BOYD *et al.*, 2022), dessa forma outras variáveis podem contribuir para o desenvolvimento da DP, a exemplo os fatores ambientais, como exposição a pesticidas, solvente, metais e subprodutos industriais (PRUNELL E OLIVERA-BRAVO, 2022; FRANCO *et al.*, 2022; PATEL E SANGEETA, 2019). De certa forma, pouco se sabe sobre a etiologia da DP, no entanto, evidências indicam que o aparecimento da DP esporádica tem relação com um conjunto complexo de interações, dentre os quais estão a predisposição genética e, ao longo de décadas, interações com influências ambientais (GAO *et al.*, 2003).

1.3 RELAÇÃO ENTRE DP E DANO MITOCONDRIAL

As mitocôndrias são organelas de membrana dupla, que contém seu próprio material genético e que se replicam independentemente do DNA nuclear da célula hospedeira (JAIN *et al.*, 2023b), essa organela citoplasmática é crítica para função e disfunção neuronal uma vez que desempenha papel chave na geração de energia celular em forma de ATP (adenosina trifosfato). A energia em forma de ATP gerada na organela é utilizada para realizar a sinapse, e assim, células nervosas necessitam de um grande aporte mitocondrial para preservar e restaurar os gradientes iônicos, bem como para a captação e ciclagem de neurotransmissores (MAGALHÃES E CARDOSO, 2023; TASSONE *et al.*, 2023). Como alterações oxidativas estão ligadas

a DP, é sugestivo que as mitocôndrias possam estar ligadas tanto à gênese quanto à modulação e desenvolvimento dessa doença (LIU *et al.*, 2023).

A mitocôndria tem sido estudada e associada com a DP em modelos animais expostos cronicamente a químicos que resultam em sintomas que mimetizam a “síndrome do complexo I”, dita como envolvida na sintomática da doença, esse modelo se baseia em alteração mitocondrial no primeiro complexo, ocasionando estresse oxidativo celular e falha na função energética (VALDEZ *et al.*, 2019).

A disfunção mitocondrial e a consequente alteração energética podem representar um gatilho neurodegenerativo. A α -syn também contribui para a disfunção mitocondrial, pois se liga ao complexo 1 e seus oligômeros podem afetar o tamanho da mitocôndria, além da dinâmica de sinalização (JAIN *et al.*, 2023b). O complexo mitocondrial I (NADH-ubiquinona redutase) é um grande complexo proteico que transfere elétrons do NADH para a ubiquinona com o bombeamento simultâneo de H⁺ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (VALDEZ *et al.*, 2019). Células nervosas que exibem deficiências no complexo 1 da cadeia mitocondrial são mais propensas a deposição de α -syn e a formação de CL, sendo crucial para a evolução da patologia no paciente (MAGALHAES E CARDOSO, 2023).

Em condições normais, a α -syn é uma proteína que está associada na regulação da excitose e na liberação de neurotransmissor mediado por vesículas, e pode estar presente no lúmen mitocondrial (MAGALHÃES E CARDOSO, 2023; KOPRICH *et al.*, 2017). A α -syn também é expressa fora do Sistema Nervoso Central (SNC), onde pode estar associada com o sistema hematopoiético, contudo, as protofibrilas, oligômeros, fitas e fibrilas podem se apresentar como formas tóxicas de α -syn na DP e outras patologias, e os CL estariam presentes como reservatório celular de α -syn mal dobradas (KOPRICH *et al.*, 2017). Evidências apontam que o acúmulo de α -syn promove disfunção mitocondrial, que, por sua vez, pode levar a apoptose (processo demonstrado na figura 1) (MAGALHÃES E CARDOSO, 2023). Ainda, mitocôndrias estão diretamente conectadas à conversão da α -syn de estados monoméricos para oligoméricos em neurônios, dessa forma, permite que a ação mitocondrial desencadeie a oligomerização da α -syn mutada. Em contrapartida, alterações mitocondriais não necessariamente formam os CL, havendo exceções (MÜLLER-NEDEBOCK *et al.*, 2023).

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a redução do sistema antioxidante contribuem ativamente para a apoptose celular (KRISHNA *et al.*, 2018). A mitocôndria é a fonte celular primária de ROS, que pode se formar pela transferência incompleta de elétrons para o oxigênio na cadeia respiratória, isso coloca a mitocôndria no centro de desregulações oxidativas (HEINZ *et al.*, 2017). ROS na forma de superóxidos são subprodutos naturais derivados do metabolismo mitocondrial que formam H₂O₂ e posteriormente são catalisados formando água (TASSONE *et al.*, 2023). A formação de radicais livres é um dos indutores mais potentes da peroxidação lipídica, e pode introduzir grupos carbonila nas proteínas, seja através do malondialdeído ou indiretamente através da oxidação de aminoácidos para promover a formação da carbonila proteica. Essas ações têm implicações importantes para a perda de função de componentes enzimáticos metabólicos e redutases celulares necessários para redox homeostática e estabelecer vias de sinalizações (KRISHNA *et al.*, 2018). Em condições normais, a mitocôndria consegue manter as ROS em níveis homeostáticos, podendo utilizar ROS em baixos níveis para sinalização de proteínas quinases e respostas imunes (TASSONE *et al.*, 2023).

Contudo, em patologias como a DP, os processos de estresse oxidativo, neuroinflamação e acúmulo de α -syn podem causar a disfunção mitocondrial, resultando em neurodegeneração, ou seja, apoptose da célula nervosa. Várias doenças neurodegenerativas, como a DP, demência com CL e atrofia de múltiplos sistemas estão associadas com o acúmulo anormal de α -syn, sendo assim denominadas de α -sinucleinopatias (KOPRICH *et al.*, 2017). A progressão da DP é acelerada pela disfunção mitocondrial, aumento de estresse oxidativo e baixa sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (JAIN *et al.*, 2023b).

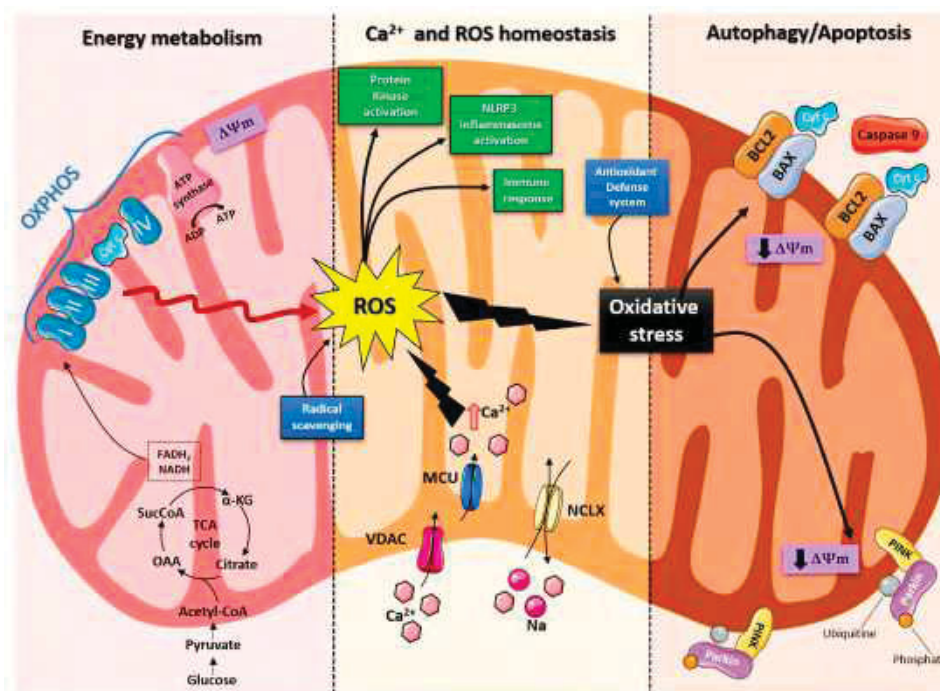


Figura 1. Representação esquemática das funções mitocondriais. A partir da esquerda: Em condições fisiológicas, as mitocôndrias fornecem ATP através de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS). As enzimas do ciclo de Krebs usam acetil-coenzima A para reduzir NADH e FADH₂, que são usados para transferência de energia para a cadeia de transporte de elétrons (ETC) embutida na membrana mitocondrial interna. OXPHOS também é uma importante fonte de ROS, cujos níveis basais são mantidos pela rede de eliminação de radicais. As mitocôndrias também desempenham um papel crucial na homeostase do cálcio. O canal aniônico dependente de voltagem (VDAC) e o complexo uniportador de Ca²⁺ mitocondrial (MCU) controlam finamente a passagem de Ca²⁺ através das membranas mitocondriais, enquanto o Na⁺/Ca²⁺ trocador mitocondrial (NCLX) é uma das unidades centrais envolvidas na extrusão de Ca²⁺. Em condições normais, por meio da geração de ROS e sinalização redox, as mitocôndrias podem controlar o metabolismo celular, a fisiologia, a resposta inflamatória e a função imunológica e atuar como importantes moléculas de sinalização na célula, ativando várias proteínas quinases. Em contraste, a superprodução de ROS e a desregulação do sistema de sinalização redox resultam em estresse oxidativo que pode levar a danos mitocondriais. As mitocôndrias com mau funcionamento podem ser seletivamente removidas por meio da mitofagia ou, quando todos os outros mecanismos de defesa falham, o neurônio pode orquestrar sua própria destruição ativando o programa intrínseco de apoptose (TASSONE *et al.*, 2023).

Para construir uma rede contínua, as mitocôndrias sofrem constantes mudanças morfológicas por meio de fusão e fissão. Ciclos de fissão e fusão promovem a mistura contínua e homogeneização de proteínas mitocondriais, lipídios e DNA entre diversas mitocôndrias dentro de uma única célula (JAIN *et al.*, 2023b). As mitocôndrias são transportadas anterogradamente do corpo celular para os terminais axonais para atender aos requisitos de energia na sinapse e retrogradamente de volta ao corpo celular nos neurônios, isso permite a remoção de mitocôndrias com excesso de acúmulo de α -syn e reposição de mitocôndrias saudáveis, bem como a dinâmica sináptica celular (SHANMUGHAPRIYA *et al.*, 2020). Diante disso, como a

fragmentação mitocondrial é uma das características do encéfalo de pacientes com DP, é concebível que os neurônios dopaminérgicos entrem em um ciclo no qual as mitocôndrias danificadas se acumulam e não podem ser adequadamente degradadas (MAGALHÃES E CARDOSO, 2023). Há fortes indícios que existem trocas de mitocôndrias intercelulares, o que permite de um lado uma terapia mitocondrial ao transportar mitocôndrias novas a células com mitocôndrias disfuncionais, como possivelmente também possam trafegar mitocôndrias disfuncionais, espalhando patologias, como descrito por BRAAK e colaboradores (JAIN *et al.*, 2023b; BRAAK *et al.*, 2003).

1.4 DIFERENÇAS SEXUAIS NA DOENÇA DE PARKINSON

É importante salientar que diferenças em domínios cognitivos em homens e mulheres foram descritas em envelhecimento saudável, sendo que homens superam mulheres em tarefas de funcionamento viso espacial, enquanto mulheres superam homens em tarefas cognitivas (REEKES *et al.*, 2020), desta forma, é presumível aceitar que, em patologias como a DP, pacientes homens e mulheres apresentem sinais e sintomas diferentes. Alterações em sentidos químicos, gustação e olfação são documentadas tanto em pacientes homens, quanto em mulheres com DP, embora em homens apresente maior prevalência (MEONI *et al.*, 2020). Estimativas indicam que a incidência é 1.5 a 2 vezes mais comum em homens do que em mulheres (variação decorrente de etnias e hábitos populacionais) na DP, tendo um avanço de menor intensidade em mulheres em fases prodrômicas (REEKS *et al.*, 2020; YUAN *et al.*, 2023). Diferentemente, na Ásia, a proporção entre pacientes com DP é maior entre mulheres do que entre homens (0,95 – 1,20) o que pode apontar uma diferença metodológica, genética, étnica ou comportamental entre os sexos, sendo uma exceção aos demais países (MEONI *et al.*, 2020). No entanto, ainda são escassos estudos que investigam diferenças entre os sexos no avanço da doença, bem como a discriminação de possível neuroproteção que estejam atuando em algum dos casos.

Em se tratando de neuroproteção, um possível importante agente neuroprotetor é o estrogênio, este hormônio pode estar ligado com a incidência menor de DP em mulheres, pela ação antioxidantes, anti-inflamatória e antiapoptóticas (OLIVOLA *et al.*,

2020). Embora a literatura demonstre que ocorra aumento do risco de desenvolvimento da DP após a menopausa, e determine uma relação inversamente proporcional entre estrogênio e risco de DP, a terapia de reposição hormonal não demonstra alteração no desenvolvimento da doença, mesmo podendo estar associado no início (MEONI *et al.*, 2020). Os sintomas da DP nas mulheres costumam apresentar uma progressão mais lenta quando comparada aos homens, e em fases clínicas, as mulheres apresentam maior tendência a tremores, enquanto homens apresentam pior desempenho motor facial, no pescoço e braços (YUAN *et al.*, 2023). Essas diferenças podem estar ligadas a um nível dopaminérgico basal conservado em mulheres e um possível efeito protagonista do estrogênio, assim, gerando uma progressão da doença mais rápida em homens, o que deixa homens com um desempenho menor em vários domínios cognitivos (MEONI *et al.*, 2020; REEKS *et al.*, 2020). Em sintomas pré-clínicos, homens apresentam maior tendência a ter a cognição prejudicada, em contraste, sintomas como distúrbios de sono, depressão e ansiedade são mais frequentes em mulheres. Em estudos clínicos, os pacientes homens com DP apresentam com frequência maior comprometimento na discriminação de odores, refletido em baixas pontuações em teste olfatório (relacionado ao sistema olfatório primário). Esse resultado indica que diferenças dependentes do sexo no desenvolvimento da doença também podem afetar órgãos olfatórios (SOLLA *et al.*, 2020; HONG *et al.*, 2015). Apesar disso, ainda são necessários mais estudos para demonstrar as diferenças no desenvolvimento da DP entre os sexos e ainda não está clara as causas das diferenças entre os pacientes.

1.5 DISTÚRBO OLFATÓRIO NA DOENÇA DE PARKINSON

A DP apresenta uma série de sintomas prodrômicos, ou seja, sintomas que aparecem antes dos sintomas motores característicos da doença e, por sua vez, anteriores ao diagnóstico clínico. Dentre os esses sintomas, o distúrbio olfatório, juntamente com comprometimento cognitivo (ou demência), dor, seborreia, constipação, ainda necessitam de estudos para esclarecer sua relação com a doença (BLESSA *et al.*, 2022). Dentre estes, a disfunção olfativa na DP é um dos sintomas mais prevalentes e se apresenta como sintoma anterior aos motores em vários anos,

além disso, chega a afetar 90% dos pacientes com a DP estabelecida (TREMBLAY *et al.*, 2020).

Os mecanismos etiológicos contidos à apresentação variável dos sintomas motores da DP e da disfunção olfatória ainda não estão totalmente claros. Mesmo quando o epitélio olfatório se apresenta normal, não se sabe se a DP afeta seu nicho neurogênico, a integração funcional dos axônios dos neurônios receptores olfativos diferenciados no bulbo olfatório (BO), e como qualquer processo afeta a capacidade olfativa (CHASE E MARKOPOULOU, 2020).

Apesar de haver indícios apontando que o distúrbio olfatório na DP é robusto, ou seja, atua em percepção, limiar, discriminação e identificação; não há aparente relação entre a gravidade e duração dos sintomas motores com a intensidade do distúrbio olfatório (TREMBLAY E FRASNELLI, 2021). Entretanto, pesquisas realizadas por Doty (2012) indicam que pacientes com baixas pontuações em testes olfatórios detêm maior possibilidade de relatar outros sintomas associado a formas de parkinsonismo, quando comparado aos pacientes com altas pontuações nos testes, em pessoas que tem parentesco com pacientes com parkinsonismo. Junto a isso, achados neuropatológicos demonstram presença de CL no BO, trato olfatório e núcleo olfatório anterior em estágios pré-clínicos anteriores a degeneração nigroestriatal (AURICH *et al.*, 2017).

Curiosamente, relata-se à associação entre a hiposmia e comportamento tipo depressivo em modelos animais, ou seja, animais com lesão bulbar apresentam comportamento anedônico (ILKIW *et al.*, 2008). Inicialmente a hiposmia em modelo animal de DP está relacionada a sobrecarga de células dopaminérgicas periglomerulares na camada glomerular olfativa (RODRIGUES *et al.*, 2014). Na camada glomerular do BO existem interneurônios dopaminérgicos (neurônios tirosina hidroxilase imunorreativos – TH-ir, conhecidos como interneurônios periglomerulares) que desempenham ação inibitória sobre neurônios receptores olfatórios e células mitrais/tufosas (HUISMAN *et al.*, 2004; MUNDIÑANO *et al.*, 2011), modulando a transmissão do estímulo olfatório (LAZARINI *et al.*, 2014). Sabe-se que na DP há um aumento significativo do número destes interneurônios (HUISMAN *et al.*, 2004; MUNDIÑANO *et al.*, 2011). O que leva à hipótese deste aumento ser uma resposta compensatória à perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc e isso pode ser

relacionado ao prejuízo olfatório observado em tal condição (DOTY, 2012). Tendo isso em vista, a hiposmia pode estar indicando uma atividade dopaminérgica aumentada, e resulta em inibição da transmissão de informação olfatória às regiões corticais (HUISMAN, *et al.*, 2004). Desta forma, a sobrecarga de células dopaminérgicas estaria diretamente ligada aos sintomas de hiposmia relacionados a DP, o que explica também o motivo da reposição dopaminérgica não amenizar os sintomas olfatórios em pacientes clínicos (DOTY 2012). Vários sinais intrínsecos, extrínsecos e parácrinos afetam a atividade das células do epitélio olfatório (EO), como neuromoduladores, e hormônios. Mas pouco se sabe sobre a capacidade de hormônios esteróideais sexuais de atuar nos neurônios sensoriais olfatórios. Estudos apontam que hormônios sexuais circulantes têm efeitos positivos no desenvolvimento, maturação e morfologia geral dos neurônios sensoriais olfatórios (ABAFFY *et al.*, 2023). Entender como ocorrem as alterações olfatórias e como isso afeta pacientes homens e mulheres, bem como, entender como ocorre a hiposmia nos pacientes com DP, possibilita que a presença do sintoma possa ser utilizada para um possível diagnóstico precoce e melhor acompanhamento de pacientes.

1.6 EXPOSIÇÃO AMBIENTAL EM PERÍODO GESTACIONAL

Uma grande preocupação para a neurotoxicidade do desenvolvimento é a exposição de mulheres grávidas e fetos em desenvolvimento às toxinas ambientais (KRISHNA *et al.*, 2018). Diariamente, mulheres grávidas são expostas a muitos produtos químicos ambientais, por ingestão, inalação ou absorção dérmica (RANGER *et al.*, 2020). O estresse a partir de um estímulo ambiental pode alterar múltiplos aspectos fisiológicos, e, quando ocorre em um período gestacional, pode causar alterações moleculares no desenvolvimento neural do feto, gerando riscos de aparecimento de patologias psiquiátricas na adolescência, o que pode aumentar as chances de desenvolver patologias em vida adulta (MARKHAM E KOENIG, 2012; BITTLE *et al.*, 2019; KRISHNA *et al.*, 2018). A exposição a agentes tóxicos durante a gestação se apresenta de maneira complexa e muitos produtos da circulação sanguínea materna podem chegar ao feto, e alguns podem atravessar a barreira placentária. Como exemplo, podemos citar os retardantes de chama (produtos que

inibem ou retardam a combustão), metais, pesticidas e herbicidas, substâncias per-e-polifluoroalquil (como exemplos podemos citar 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine [MPTP], rotenona, paraquat) (RANGER *et al.*, 2020). O desenvolvimento anormal do SNC, durante a embriogênese, desenvolvimento fetal ou primeiros dias pós-natal pode gerar disfunção cognitiva, distúrbios comportamentais, neurológicos e emocionais (PAMIES, 2018).

Está descrito que peixes expostos a rotenona em período embrionário detêm alterações morfológicas e fisiológicas danosas ao seu desenvolvimento (MELO *et al.*, 2015), assim como em camundongos, que podem apresentar atrasos no desenvolvimento neural (JAIN *et al.*, 2023a). A literatura relata alterações gestacionais derivadas de neurotoxinas como a rotenona, em ratos, peixes e aves, dando pistas de uma possível atuação não só em células neurais formadas, mas também em células neuronais do feto em formação (PAMIES *et al.*, 2018; ISHIDO E SUZUKI, 2010). Entretanto, pouco se sabe se há efeito interativo da exposição pré-natal e uma reexposição à neurotoxina em período pós-natal, tampouco se existem diferenças entre os sexos expostos à mesma toxina.

1.7 EMBRIOLOGIA - FORMAÇÃO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO

A circuitaria básica dos sistemas sensoriais em mamíferos é formada em ambiente pré-natal, inicialmente baseada em expressão gênica, em um segundo momento após o nascimento, pistas ambientais podem modular as expressões do epitélio olfatório, como exemplo destas pistas podemos citar os odores de alimentos e odores maternos. Essa plasticidade é importante para a formação da circuitaria madura e torna-se irreversível com o tempo (SAKANO *et al.*, 2020).

Durante o desenvolvimento embrionário, na parte anterior do embrião de vertebrados, dois espessamentos epiteliais se desenvolvem enquanto ocorre o fechamento do tubo neural, formando os placódios olfativos (VALVERDE *et al.*, 1993). O estabelecimento do circuito básico no sistema olfativo começa com os neurônios olfativos derivados dos placódios olfativos. Os placódios neurogênicos são regiões de ectoderma condensada que dão origem a estruturas neurais, principalmente de

função olfatória (SCHLOSSER, 2010). Tanto os placódios olfatórios quanto os auditivos originam as estruturas neurais e não-neurais, tanto no EO quanto na orelha interna, respectivamente. Este tipo de desenvolvimento é fundamental para garantir uma série de arranjos celulares que permitem as corretas projeções espaciais, portanto anatômicas, a partir dos diversos tipos celulares gerados (Figura 2). Os axônios dos neurônios olfatórios se projetam para o bulbo olfatório onde formam as sinapses nos dendritos e células mitrais/tufosas e formam os glomérulos (LOPEZ-MASCARAQUE E DE CASTRO, 2002).

Segundo Kim e colaboradores (2023), a diferenciação de neurônios em período embrionário em roedores se inicia no dia E10-E10,5 de gestação. A axogênese acontece a partir do dia E11, sendo que no próprio dia E11,5 ocorre a formação de células da glia e proteínas de junção. Esse período aparenta ser crítico para a formação correta da circuitaria olfativa. Entre os dias E13-15 há proliferação e amadurecimento de neurônios, enquanto as células mitrais se estabelecem entre os dias E10-12, as tufosas entre os dias E13-18, e as granulares entre os dias E12-E18. Em resumo, os dias de formação desses conjuntos celulares se sobrepõe, como demonstrado na figura 2. De forma inicial, podemos dizer que o desenvolvimento de células do BO e do EO sobrevivem de maneira independente e amadurecem posteriormente de com influências mútuas (LOPEZ-MASCARAQUE E DE CASTRO, 2002).

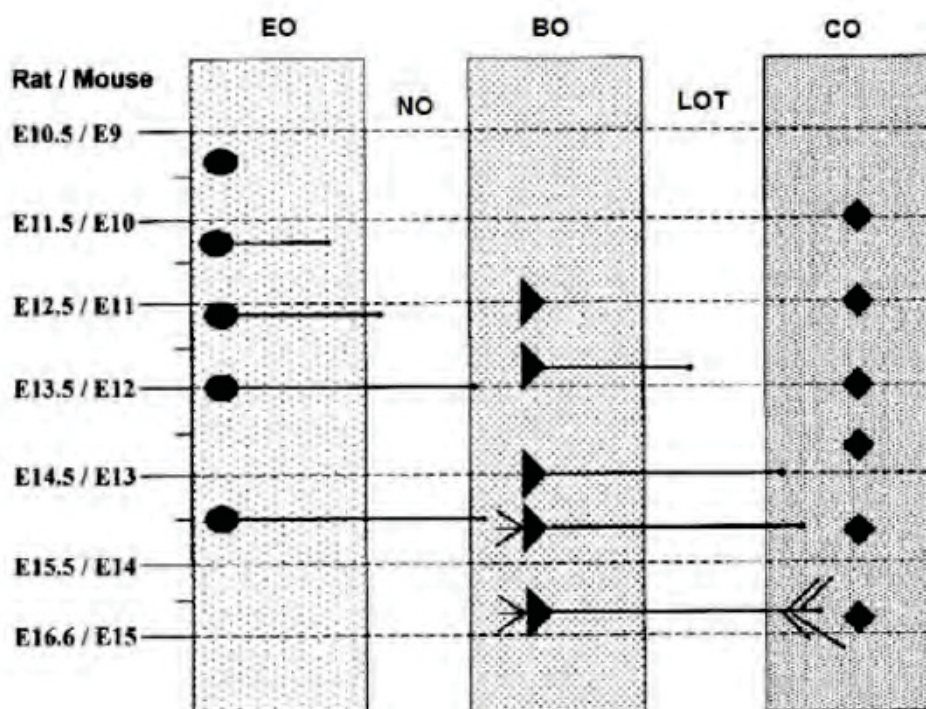


Figura 2: Representação esquemática da neurogênese e axogênese no sistema olfatório, durante o período embrionário. A formação dos neurônios olfatórios sensoriais (ovais) inicia-se entre E9-9,5, a partir do epitélio olfatório (EO). Já a formação das células mitrais (triângulos) acontece em E11,5, portanto, ocorrendo antes da chegada dos axônios do nervo olfatório (NO) à superfície do telencéfalo (E12). As células mitrais apresentam seus dendritos (E13,5) quando os primeiros axônios do nervo olfatório (NO) adentram o bulbo olfatório (BO). Os axônios do trato olfatório lateral (LOT) colateralizam para invadir seus alvos corticais (córtex olfatório - CO) entre E14,5-15. A neurogênese das células das três camadas do bulbo olfatório (BO) acontece de maneira independente, presumivelmente devido a mecanismos de controle intrínseco. A data de detecção do plug vaginal, nas fêmeas, foi considerada o dia E0. (Retirado e adaptado de: LOPEZ-MASCARAQUE E DE CASTRO, 2002).

1.8 MODELO DE ROTENONA PARA ESTUDOS DA DP

Para realizar a pesquisa básica sobre a DP, são utilizados modelos animais que mimetizam os sintomas encontrados nos pacientes com a patologia e permitem melhor entendimento dos mecanismos moleculares da doença. Dentre os modelos utilizados em nosso laboratório podemos citar os modelos a partir de neurotoxinas como a 6-hidroxidopamina (NOSEDA *et al.*, 2021) e a neurotoxina rotenona (FAGOTTI *et al.*, 2019; AURICH *et al.*, 2017; ILKIW E LIMA, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019).

A rotenona, conhecida também como Nicolina, Dactinol ou Tubatoxina é um composto lipofílico de ocorrência natural, derivado principalmente das raízes e caules dos gêneros *Lonchocarpus* e *Derris*, a substância foi amplamente usada como pesticida e piscicida, mas tem sido retirado do mercado em vários países pela sua toxicidade (PHAIROH *et al.*, 2021; HEINZ *et al.*, 2017). Atua como forte inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, mais especificamente inibindo a transferência de elétrons dos centros ferro-enzofre do complexo I para a ubiquinona, bloqueando a fosforilação oxidativa e limitando a síntese de ATP (HEINZ *et al.*, 2017). Esta transferência incompleta gera ROS que causa danos celulares e eventualmente apoptose.

Estudos de Melo e colaboradores (2015) demonstram a capacidade citotóxica da rotenona em concentrações sub-letais em peixes, o que resultou em alterações comportamentais, morfológicas e chegando a causar alterações embriológicas, como máis formações em peixes. Apesar da alta sensibilidade de fotólise na camada superficial da coluna d'água, (meia vida de 21 h no primeiro 1cm de profundidade), a 2 metros de profundidade a toxina pode persistir por 191 dias, o que pode contribuir para a intoxicação de peixes em exposição crônica (MELO *et al.*, 2015).

Junto com a ação neurotóxica, há outros estudos demonstrando a ação hepatotóxica, além da atuação no comprometimento da formação de fusos mitóticos celulares, inibindo uma importante fase do ciclo celular e manutenção de ciclagem celular dos tecidos (INTARARUCHIKUL *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2015). Dessa forma, a rotenona atua tanto via SNC como em outros tipos celulares periféricos. Pamies e colaboradores (2018) qualificam a rotenona como um dos principais fatores ambientais que determinam risco para o desenvolvimento da DP, e sugere, a partir de seu experimento, os neurônios dopaminérgicos como principal célula alvo de atuação citotóxica. Já Ishido e colaboradores (2017) demonstraram que a exposição a rotenona em período neonatal (em torno de 5 dias de vida) causa sintomas associados a transtorno de ansiedade e hiperatividade tardia, quando o animal chega em idade juvenil e idade adulta. Dessa forma, a exposição à neurotoxina durante o período perinatal pode ocasionar alterações permanentes nas células nervosas, resultando em impactos no sistema nervoso ao longo da vida adulta.

Além disso, este modelo possui uma notável validade preditiva, uma vez que estudos epidemiológicos têm demonstrado que a incidência da DP em indivíduos cronicamente expostos à rotenona é maior do que na população geral (DE LAZZARI *et al.*, 2018). Outros estudos já demonstraram a capacidade da rotenona aplicada em via subcutânea (doses de 2; 2,5 e 3,5 mg/kg/dia) de causar a apoptose de células TH-IR reativas, além de causar alteração de peso nos ratos estudados (FLEMING *et al.*, 2004). Devido a esse mecanismo de ação e por atravessar membranas biológicas, a rotenona se apresenta como uma ótima neurotoxina para estudar sintomas de Parkinsonismo. A relativa facilidade de acesso ao sistema nervoso central onde, ao atingir seletivamente os neurônios dopaminérgicos (BISBAL E SANCHES, 2019), desencadeia um mecanismo específico de inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (BETARBET *et al.*, 2000).

1.9 USOS CULTURAIS DA ROTENONA

Populações indígenas da região amazônica usam a séculos as raízes de timbó (*Derris spp*) para prática de pesca. Em momentos de escassez de alimentos, onde se faz necessário o aumento do volume do pescado, populações indígenas utilizam a raiz induzindo os peixes a narcose, deixando o animal imóvel e assim facilita a captura (COSTA *et al.*, 1999; MELO *et al.*, 2015; TENCATT *et al.*, 2023). Está documentado que este gênero de plantas utilizado por povos indígenas contém rotenona em sua raiz, representando cerca de 5% da sua massa seca, conferindo-lhes a propriedade de agente imobilizante (OTHMAN *et al.*, 2015). A utilização da raiz do gênero *Derris spp* foi disseminado entre a comunidade pesqueira, sendo citada na música “Canoeiro” composta por Zé Carreiro e interpretada pelos renomados cantores Tonico e Tinoco. Na canção, o autor descreve o uso da neurotoxina como ferramenta tradicional de pesca, isso fica claro nos seguintes versos:

“Pra pegar peixe dos bons dá trabalho e a gente soa
Eu joga timbó na água com isso o peixe atordoa
Joga a rede e dou um grito
ai, ai, os dourados amontoa”

Tonico e Tinoco – 1950 – álbum: Canoeiro, Gravadora Continental

O autor descreve o uso do Timbó, nome popular de *Derris spp*, e pontua como a planta é utilizada, evidenciando uma certa negligência em relação aos potenciais efeitos prejudiciais à saúde humana. Porém, existem poucos estudos sobre a toxicidade da rotenona na biota aquática, principalmente em níveis subletais (MELO *et al.*, 2015). Também, não é discutido se o consumo de peixes expostos a toxina é potencial carreador da neurotoxina a animais consumidores da sua carne, incluindo humanos.

1.10 RELAÇÃO DOENÇA DE PARKINSON E EXPOSSOMA ESPECÍFICO

Com o contínuo crescimento da população mundial e a alta demanda de alimentos, o uso de adubos e agroquímicos tem sido a alternativa para aumentar a produtividade de alimentos derivadas de produção agrícola e evitar perdas de cultivo por pragas. Neste cenário, diversos agroquímicos são utilizados, a depender da praga a ser combatida e ao tipo de plantio realizado (VASCONCELLOS *et al.*, 2020a). O uso de agroquímicos é difundida por todos os tipos de agricultores, desde o grande exportador de produtos agrícolas, até o fazendeiro com produção para consumo próprio, até mesmo em fazendas de populações de aldeias remotas (PATEL E SANGEETA, 2019). A partir disso, há um padrão de expossoma (qualquer fator não genético que aumente as chances de desenvolvimento de uma doença) específico de agroquímicos que pode chegar à toda a população, estes produtos podem contribuir com a carga global de doenças como a DP (RAGER *et al.*, 2020).

A poluição atmosférica e a exposição aos defensivos agrícolas têm se apresentado como um possível agravante potencializador de doenças neurológicas (FRANCO *et al.*, 2022; DHIMAN *et al.*, 2022; PATEL E SANGEETA, 2019). Os efeitos da exposição aos agrotóxicos dependem das características químicas, da quantidade absorvida ou ingerida, tempo de exposição, e das debilitações relativas à saúde da pessoa exposta (VASCONCELLOS *et al.*, 2020a). A relação entre a exposição a agrotóxicos e DP foi relatada pela primeira vez em 1976, quando a MPTP (que é semelhante ao agroquímico paraquat) chamou atenção ao promover efeitos tóxicos causando apoptose de neurônios dopaminérgicos de forma permanente (VASCONCELLOS *et al.*, 2020b).

Trabalhadores rurais são especialmente expostos a agroquímicos durante sua aplicação, os pesticidas podem entrar no corpo pela inalação, ingestão, ou exposição dérmica, podendo estar associada com patologias ligadas ao sistema nervoso nessas populações agricultoras e afastadas dos grandes centros, onde não há fiscalização adequada e o uso de equipamento de proteção individual não é comum. Mesmo em doses consideradas baixas (pico ou nano molar), de maneira crônica, pode causar alterações dramáticas na sinalização imunológica e hormonal (PASTEL E SANGEETA, 2019).

A DP envolve a transformação de um processo homeostático “normal” após um ponto de inflexão em direção a uma espiral patológica em degeneração celular; uma cascata de sequelas secundárias e auto-reforçadas, como neuroinflamação, agregação anormal de proteínas e desequilíbrio metabólico. Onde exatamente isso é iniciado permanece indefinido e pode diferir de pessoa para pessoa (MÜLLER-NEDEBOCK *et al.*, 2023). Uma questão crítica à saúde e que permanece pouco estudada é o impacto da exposição ambiental pré-natal nos resultados da saúde materna e fetal, pois gestantes são particularmente suscetíveis a efeitos de fatores ambientais e mudanças metabólicas maternas podem alterar a saúde dos fetos (RANGER *et al.*, 2020). Desta forma, o presente estudo pode trazer informações importantes sobre como influências ambientais podem alterar a vida pós-natal de animais previamente expostos em período fetal em contexto de sintomas Parkinsonianos.

2 JUSTIFICATIVA

O ambiente gestacional é, em grande parte, sensível a alterações metabólicas e, associado à exposição neurotóxica por rotenona (capaz de atravessar a barreira placentária) pode ocasionar alterações no desenvolvimento do feto, em vias dopaminérgicas e, sintomas relacionados à DP, como hiposmia. Neste sentido, a investigação da exposição pré-natal à neurotoxina rotenona é necessária, avaliando sua capacidade de causar alterações olfatórias significativas nos animais em vida adulta, permitindo verificar as implicações da exposição no período crucial para a formação do epitélio olfatório do indivíduo. Considerando o conjunto de evidências apresentadas, o presente projeto se propôs a investigação dos efeitos, sobre a prole,

na formação do sistema olfatório, a partir do tratamento com rotenona administrada por via subcutânea em ratas prenhas. Administramos a rotenona, diariamente, durante toda a fase embrionária de formação e maturação da circuitaria do sistema olfatório. Além disso, numa segunda etapa do experimento, realizamos a avaliação comportamental da prole mediante o seu desempenho em uma tarefa olfatória de duas etapas, bem como seu desempenho motor. Por fim, foi realizado um desafio neurotóxico com rotenona, ao ser administrada por 10 dias consecutivos, a fim de produzir uma reexposição que difundiria uma degeneração parcial dos neurônios da via nigroestriatal e possível impacto de aumento da neurogênese, em adultos, no BO. Nossa hipótese prevê que a rotenona possa desencadear, na prole, e adicionalmente na prole adulta (mediante reexposição à rotenona - desafio neurotóxico) um aumento da neurogênese na camada glomerular, onde se encontra a maior densidade de neurônios periglomerulares oriundos da SZV verificadas por BDNF. O resultado dessa modulação poderia se manifestar num prejuízo olfatório na prole, potencialmente amplificado mediante o desafio neurotóxico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos sobre a prole na formação do sistema olfatório, a partir do tratamento com rotenona administrada subcutaneamente em ratas prenhas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detecção de possíveis prejuízos na discriminação olfatória da prole;
2. Verificar diferenças entre machos e fêmeas quanto a discriminação olfatória;
3. Avaliar os efeitos da reexposição da prole à rotenona nos parâmetros olfatórios e motores.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Todos os experimentos foram realizados após aprovação da Comissão de ética em pesquisa do setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEUA/BIO) pelo Certificado Nº 1453, em conformidade com as diretrizes estabelecidas, visando princípios éticos em relação ao uso de animais de experimentação. Foram utilizadas 30 ratas Wistar fêmeas e 10 ratos Wistar machos, de 3 meses de idade, oriundas do processo de acasalamento padrão do Complexo Biotério da UFPR. Os animais foram mantidos em sala com umidade e temperatura (22 ± 2 °C) controlados, em ciclo claro/escuro de 12/12h, com água e comida *ad libitum*. Os animais foram dispostos para acasalamento durante 24 horas, na proporção 3 fêmeas para um macho e 2 fêmeas para um macho, segundo determinado em cronograma de acasalamentos. Uma vez obtidas as ninhadas, portanto, estas foram mantidas nas condições padrão de desmame (20 dias), sendo posteriormente os indivíduos (machos e fêmeas) devidamente separados em gaiolas ($n = 4-5/\text{caixa}$), obedecendo ao padrão de sexagem e exposição pré-natal.

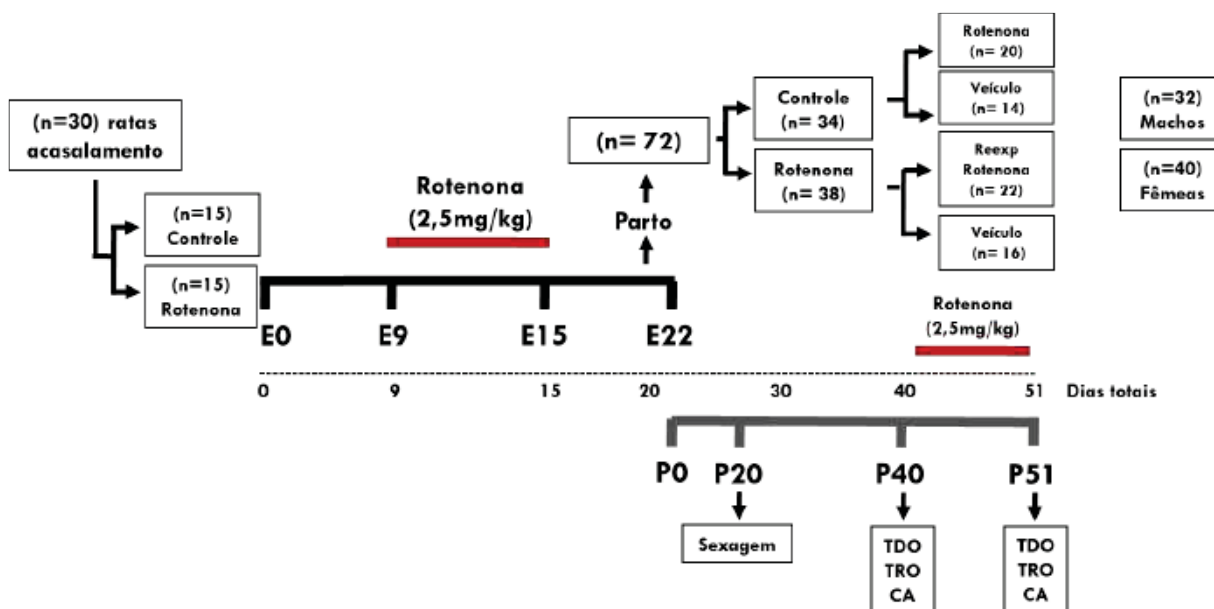


Figura 3: Delineamento experimentais tendo os dias Estrais (E) que identifica o período de prenhes e os dias Pós-natais (P) que indica os dias seguintes ao nascimento da prole. O teste de discriminação olfatória. O dia P0 simboliza o dia do nascimento da prole. Ao dia 20 pós-natal foram realizadas as sexagens e separados os animais machos e fêmeas. O teste de discriminação olfatório foi realizado nos dias P40 e P51 após o nascimento. A janela P40 e P51 também corresponde ao momento do desafio neurotóxico.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL – EXPERIMENTO PARTE 1

Para a obtenção das progenitoras, fêmeas em idade reprodutiva, de 90 dias foram acondicionadas com ratos adultos na razão 3:1 e/ou 2:1, aproximadamente às 10h da manhã, e mantidos na mesma caixa por 24 horas. Os acasalamentos foram repetidos até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para a realização dos experimentos (7 ratas prenhas em controle e 9 ratas prenhas em grupo exposto a rotenona). Passadas as 24 horas, foram realizadas as detecções do plug vaginal e/ou espermatozoides em lavagens vaginais e análise por microscopia. Fêmeas consideradas fertilizadas foram separadas em caixas distintas e consideramos como dia zero da gestação (E0). Ao passar dos dias, as ratas prenhas foram expostas via subcutânea ao veículo (óleo de girassol ml/kg), ou veículo somado à neurotoxina rotenona (Sigma-Aldrich®, United States) em doses de 2,5 mg/ml/kg de rotenona (FLEMING *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2017), entre os dias E9 e o dia E15 correspondente aos dias de formação embrionária do sistema olfativo em roedores. Os grupos foram: V (grupo que recebeu somente veículo) e o grupo R (grupo que recebeu veículo somado a neurotoxina).

4.3 TESTE DO CAMPO ABERTO

O campo aberto (CA) foi realizado nos dias 40 e 50 pós-natal, e consiste em uma arena circular de 1 metro de diâmetro e 50 centímetros de altura, a base do aparato é preta, dando contraste com a pelagem branca característica dos animais. O teste teve seu início quando os animais foram colocados sobre o centro da arena, neste momento, é iniciada a contagem de um período pré-determinado de 5 minutos (BROADUST *et al.*, 1960). Todas as análises foram gravadas e realizadas por meio de câmera digital e posteriormente analisadas pelo software ToxTrac v2.61 (RODRIGUEZ *et al.*, 2017) verificando a distância percorrida pelo animal, bem como, a exploração que ele fez do ambiente. Neste teste, espera-se que o animal com danos em áreas encefálicas motoras percorra menor distância no teste, quando comparado a animais que não apresentam tal dano.



Figura 6: Aparato do Campo Aberto. Arena circular com 1 metro de diâmetro. O animal permanece durante 5 minutos e a filmagem é analisada pelo software.

4.4 DESAFIO NEUROTÓXICO - EXPERIMENTO PARTE 2

Os animais encaminhados para o experimento 2 foram separados em caixas de acordo com o sexo e seu grupo, dispostos no máximo 4 animais por caixas e foram separados em 4 grupos. Os grupos tratados com veículo foram expostos ao veículo novamente (grupo VV) ou à rotenona (grupo VR), e os grupos já expostos a rotenona em período pré-natal, foram reexpostos a rotenona por administração subcutânea (2,5 mg/ml/kg) (grupo RR) ou sendo administrado veículo subcutaneamente (grupo RV). Tal administração que chamamos de “Desafio neurotóxico” foram realizadas entre os dias pós-natal 40 ao dia 50 (P40 à P50), sendo que ao fim deste período os animais foram eutanasiados e tiveram estruturas como BO e SN coletadas para posteriores análises.

Assim que as fêmeas foram identificadas prenhas pela presença do plug vaginal mediante esfregaço vaginal, (dia E0) estas foram pesadas diariamente e acompanhadas em suas prenhez. No dia E9 se iniciou a administração de rotenona, por via subcutânea (dose diária única de 2,5 mg/kg) (ZHANG *et al.*, 2017), sendo que

a última administração ocorreu no dia E15, totalizando, portanto, 7 doses consecutivas. As ratas prenhas foram separadas em caixas únicas em período perinatal e após o nascimento metade da prole foi eutanasiada e metade foi encaminhada para a segunda parte do experimento.

4.5 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA (TDO)

O teste de discriminação olfatória (TDO) foi realizado a partir da versão modificada de Prediger e colaboradores (2005) e padronizada por nosso laboratório (RODRIGUES *et al.*, 2014). O aparato consiste em uma caixa (60 x 40 x 50 cm) dividida igualmente em dois ambientes, conectados por uma porta que dá livre acesso ao animal de um ambiente para o outro (figura 4). Antes do teste, é realizado um período de habituação de 2 min dentro do aparato, nos dois compartimentos, com cepilho limpo. Depois disso, o cepilho limpo é adicionado em um dos lados da caixa (odor não familiar). Do outro lado da caixa, é adicionado cepilho no qual os animais foram mantidos isolados durante 48hrs antes do teste (odor familiar). O TDO consiste em posicionar o rato no meio do aparato de discriminação olfatória, entre a abertura da porta, e filmar, por 3 min a exploração de cada compartimento. Espera-se que o animal que apresenta prejuízo olfatório tenda a explorar os dois compartimentos em tempos semelhantes, indicando ausência de discriminação.



Figura 4: Aparato da TDO com dois compartimentos e abertura entre eles. Em um dos lados é estabelecido o odor familiar por maravalha a qual o animal ficou isolado durante 48 horas e no outro compartimento é estabelecido o odor não familiar por maravalha nova.

4.6 TESTE DE RECONHECIMENTO OLFATÓRIO (TRO) – ODOR NÃO SOCIAL.

O Teste de Reconhecimento Olfatório (TRO) não social foi realizado a partir protocolo estabelecido em nosso laboratório, onde ratos foram colocados individualmente, em uma caixa sem cepilho, composta apenas por 2 tubos Falcon com cerca de 20 pequenos furos ao longo da sua superfície, colados um em cada extremidade da mesma. O teste foi realizado em duas etapas, a primeira com o objetivo de permitir que o animal se habitue a nova caixa e a presença dos tubos Falcon, para isto o animal é colocado na caixa contendo dois tubos Falcon contendo papel filtro seco e permanece durante 2 minutos. Na segunda etapa, com duração de 3 minutos, os tubos são trocados por um tubo composto por papel de filtro (5 x 5 cm) com o odor neutro (100 µl de água destilada). E no outro tubo é adicionado um pedaço de papel filtro (5 x 5 cm) embebido com 200 µL de solução 5% de acetato de amila (Aldrich Chemical, St. Louis, EUA), este sendo um odor não social, onde o animal pode apresentar aversão ou preferência pelo odor, de tal modo a explorar mais ou menos tempo cada Falcon. Os testes foram filmados e por sequência analisados. A cada teste (entre treino e teste também) o ambiente foi limpo com álcool 10%, e a localização dos Falcons foi trocada a fim de evitar alteração comportamental devido à presença do odor residual de outros ratos. Era esperada a maior exploração do animal a um dos tubos, indicando a capacidade de diferenciar tais odores apresentados.



Figura 5: Aparato da TRO com dois falcons dispostos nas extremidades do aparato. Em um dos lados é depositado papel filtro com acetato de amila 5%. O outro lado é depositado papel filtro com água. O a ambientação dura 2 minutos e o teste dura 3 minutos.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados com distribuição normal (teste Shapiro-Wilk) foi realizada através do software GraphPad Prism (versão 8.0.2), por análise de variância (ANOVA) de duas vias, com teste post hoc de Bonferroni, conforme os fatores analisados tempo (pré-natal P40 e pós-natal P51) e exposição à neurotoxina. Todos os resultados foram expressos como média \pm S.E.M. Para os grupos analisados foi realizado o d_z de Cohen para verificar o tamanho do efeito e o g_z de Hedges como correção para evitar tendências a partir do Microsoft Excel 365.

5 RESULTADOS

5.1 CAMPO ABERTO

O Campo aberto foi realizado no dia P40 e dia no dia P51, antes do desafio neurotóxico e depois do desafio neurotóxico, como indicado pela figura 7. O tratamento não apresentou diferença significativa entre os grupos ($P=0,3980$). Já o

fator tempo se mostrou significativo entre os grupos ($P < 0,0001$), visto a diminuição da distância percorrida pelos animais. A interação entre os fatores também se mostrou significativa ($P = 0,0082$). Dentre a exposição fetal e a exposição pós-natal, considerando todos os grupos, o tamanho do efeito foi considerado grande ($d_z = 0,96$ e $g_z = 0,95$), segundo classificação de Sawilowsky (2009).

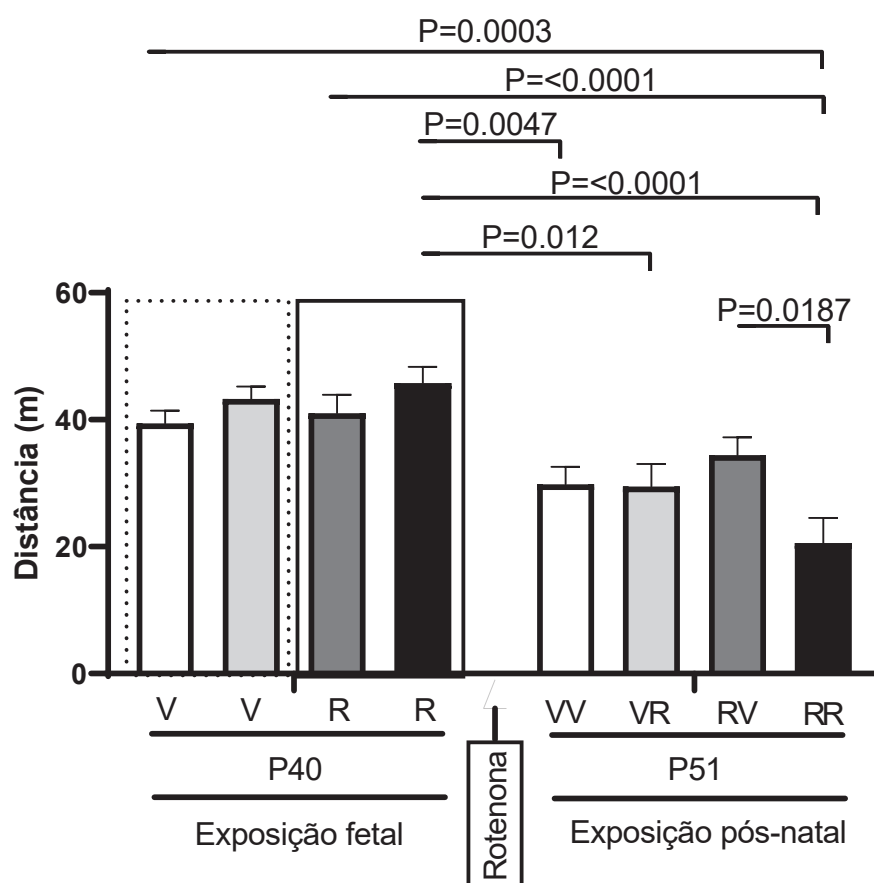


Figura 7: Campo aberto da prole (machos e fêmeas) nos tempos de 40 (P40) e 51 (P51) dias após o nascimento. Entre P40 e P51 ocorreu o desafio neurotóxico mediante a exposição, pós-natal, à uma dose de 2,5 mg/kg/dia de rotenona por via intraperitoneal. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona; VV - veículo (fetal e pós-natal); VR - veículo (fetal) e rotenona (pós-natal); RV - rotenona (fetal) e veículo (pós-natal); RR - rotenona (fetal) e rotenona (pós-natal). O retângulo tracejado indica os grupos veículo (fetal) e o retângulo sólido mostra os grupos rotenona (fetal). Os valores de P encontram-se indicados na figura. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. O total de 54 animais foram utilizados no experimento.

Ao isolarmos os dados dos machos, como representado na figura 8, verificamos que a exposição à neurotoxina não apresentou diferença significativa ($P = 0,8676$). Enquanto o fator tempo se apresentou como significativo entre os grupos ($P < 0,0001$).

A interação entre os fatores não se mostrou significativa ($P=0,2380$). O tamanho do efeito foi considerado grande ($d_z=1,21$ e $g_z=1,17$), quando consideramos a exposição fetal e a exposição pós-natal para os grupos, segundo classificação de Sawilowsky (2009).

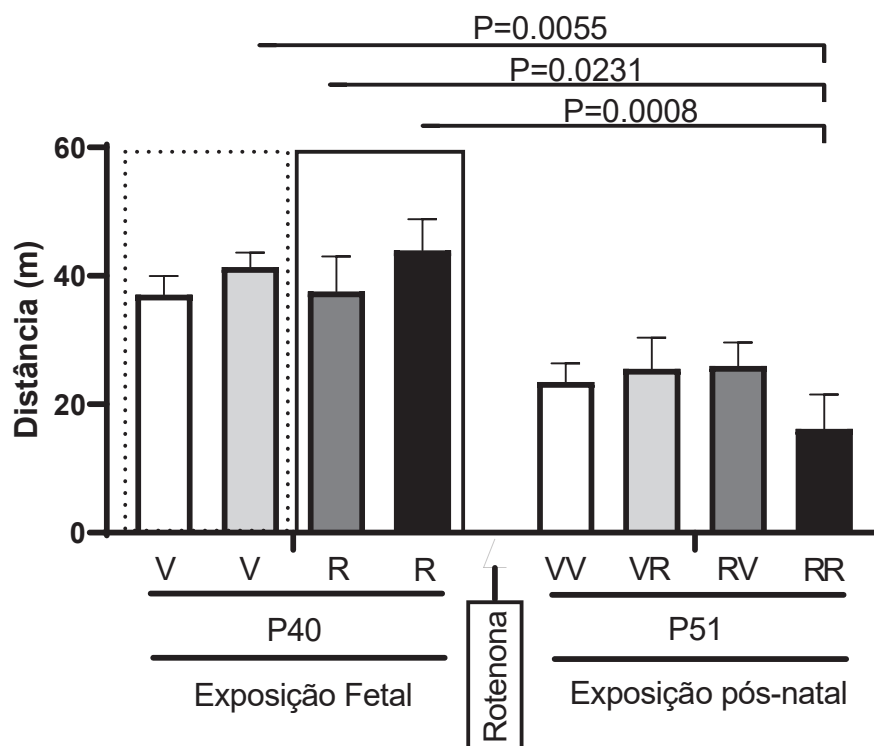


Figura 8: Campo aberto da prole (machos) nos tempos de 40 (P40) e 51 (P51) dias após o nascimento. Entre P40 e P51 ocorreu o desafio neurotóxico mediante a exposição, pós-natal, à uma dose de 2,5 mg/kg/dia de rotenona por via intraperitoneal. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona; VV - veículo (fetal e pós-natal); VR - veículo (fetal) e rotenona (pós-natal); RV - rotenona (fetal) e veículo (pós-natal); RR - rotenona (fetal) e rotenona (pós-natal). O retângulo tracejado indica os grupos veículo (fetal) e o retângulo sólido mostra os grupos rotenona (fetal). Os valores de P encontram-se indicados na figura. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. O total de 25 animais foram utilizados no experimento.

Isolando os dados das fêmeas como representado na figura 9, verificamos que o tratamento não apresentou diferença significativa ($P=0,2263$). Enquanto o fator tempo se apresentou como significativo entre os grupos ($P<0,0001$). A interação entre os fatores se mostrou significativa ($P=0,0362$). Dentre a exposição fetal e a exposição

pós-natal, o tamanho do efeito foi considerado médio ($d_z=0,78$ e $g_z=0,75$), segundo classificação de Sawilowsky (2009).

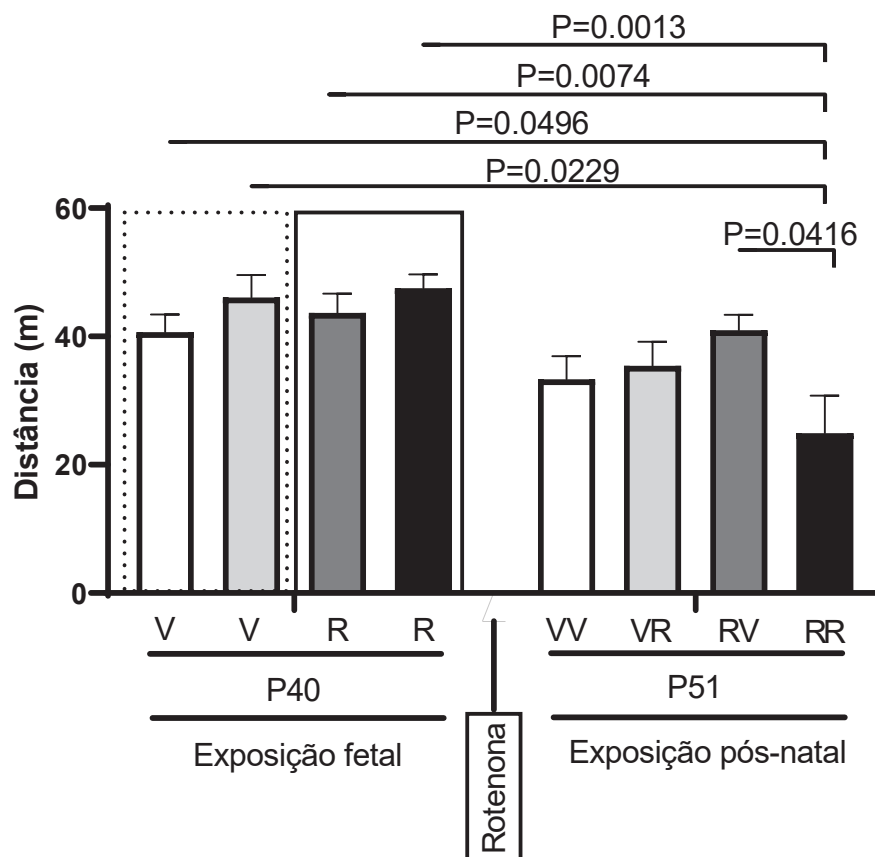


Figura 9: Campo aberto da prole (fêmeas) nos tempos de 40 (P40) e 51 (P51) dias após o nascimento. Entre P40 e P51 ocorreu o desafio neurotóxico mediante a exposição, pós-natal, à uma dose de 2,5 mg/kg/dia de rotenona por via intraperitoneal. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona; VV - veículo (fetal e pós-natal); VR - veículo (fetal) e rotenona (pós-natal); RV - rotenona (fetal) e veículo (pós-natal); RR - rotenona (fetal) e rotenona (pós-natal). O retângulo tracejado indica os grupos veículo (fetal) e o retângulo sólido mostra os grupos rotenona (fetal). Os valores de P encontram-se indicados na figura. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. O total de 29 animais foram utilizados no experimento.

5.2 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA - ODOR SOCIAL

O teste de discriminação olfatória foi realizado com o intuito de verificar a capacidade de diferenciação entre odores familiares e não familiares, como podemos verificar na figura 10. O teste foi realizado nos dias P40 e P51. No dia P40, o fator

preferência de lado se mostrou significativo ($P < 0,0001$), já o fator tratamento não se demonstrou significativo ($P = 0,9973$), bem como a interação entre os fatores ($P = 0,2772$). Entretanto, o grupo que recebeu somente o veículo demonstrou capacidade de diferenciar os lados e preferência para com o lado familiar, enquanto o grupo que teve exposição a neurotoxina em período fetal não foi capaz de diferenciar os lados. A discriminação entre os lados por grupo obteve o tamanho do efeito foi considerado pequeno ($d_z = 0,39$ e $g_z = 0,39$), segundo classificação de Sawilowsky (2009). Para o grupo veículo, houve um efeito tamanho de efeito médio ($d_z = 0,6$ e $g_z = 0,58$) entre a exploração de lados familiar e não familiar.

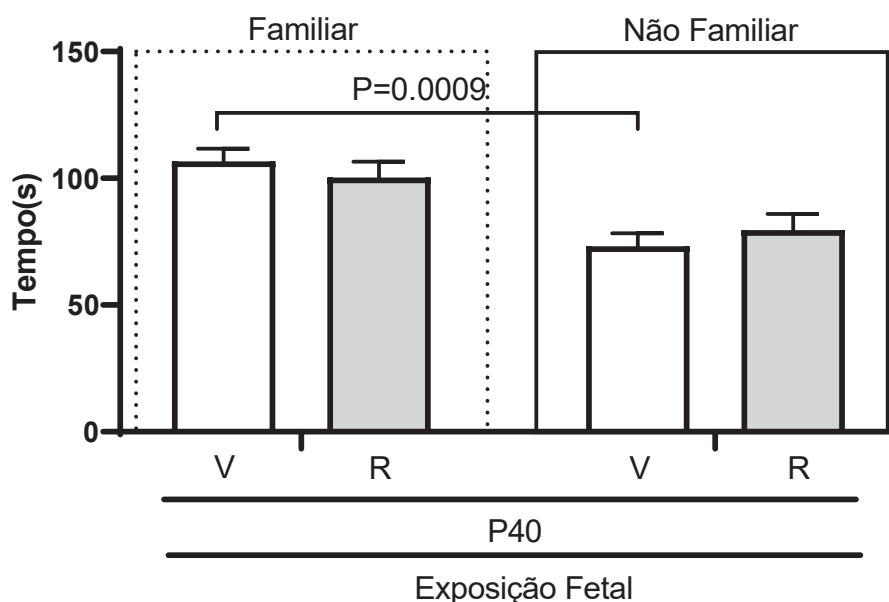


Figura 10: Teste de discriminação olfatória social (machos e fêmeas) no tempo de 40 (P40) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona. O retângulo tracejado indica a exploração do odor familiar e o retângulo sólido mostra a exploração do odor não-familiar. Os valores de P encontram-se indicados na figura. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. O total de 67 animais foram utilizados em experimento.

Ao dividirmos os subgrupos entre machos e fêmeas, ainda no P40, o fator preferência de compartimento se mostrou significativo ($P = 0,0089$) para machos, demonstrado pela figura 11, já o fator tratamento não se demonstrou significativo ($P = 0,9839$), bem como a interação entre os fatores ($P = 0,1967$). É possível verificar que o grupo que recebeu neurotoxina em período fetal não demonstrou preferência entre os compartimentos. A distinção entre os lados por grupo obteve o tamanho do

efeito foi considerado pequeno ($d_z=0,35$ e $g_z=0,34$), segundo classificação de Sawilowsky (2009). Para o grupo veículo, o tamanho de efeito foi considerado médio ($d_z=0,71$ e $g_z=0,66$) entre a exploração de lados familiar e não familiar.

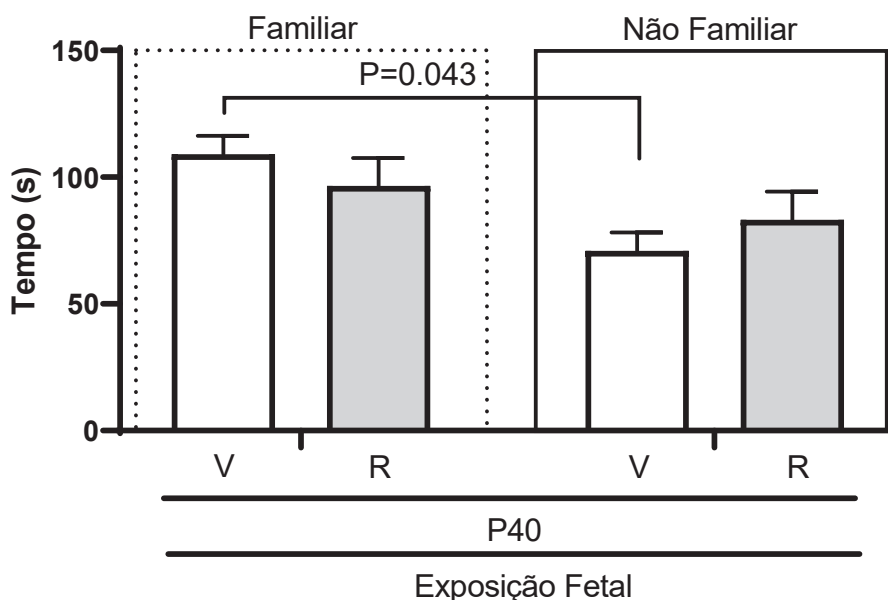


Figura 11: Teste de discriminação olfatória social (machos) no tempo de 40 (P40) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona. O retângulo tracejado indica a exploração do odor familiar e o retângulo sólido mostra a exploração do odor não-familiar. Os valores de P encontram-se indicados na figura. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. O total de 30 animais foram utilizados em experimento.

Para as fêmeas, novamente o fator preferência de compartimento com odor familiar se mostrou significativo ($P<0,0001$), já o fator tratamento não se mostrou significativo ($P=0,9913$) e não houve interação significativa ($P=0,4544$). Diferente dos machos, as fêmeas demonstraram preferência pelo compartimento familiar tanto no grupo que recebeu a neurotoxina em período fetal, quanto no grupo que recebeu apenas o veículo, como demonstrado na figura 12. A distinção entre os lados para todos os grupo teve tamanho do efeito médio ($d_z=0,39$ e $g_z=0,39$), para o grupo controle o tamanho do efeito foi considerado pequeno ($d_z=0,52$ e $g_z=0,5$), já em relação ao grupo exposto a neurotoxina em ambiente fetal, o tamanho da diferença é considerado médio ($d_z=0,76$ e $g_z=0,73$) segundo classificação de Sawilowsky (2009).

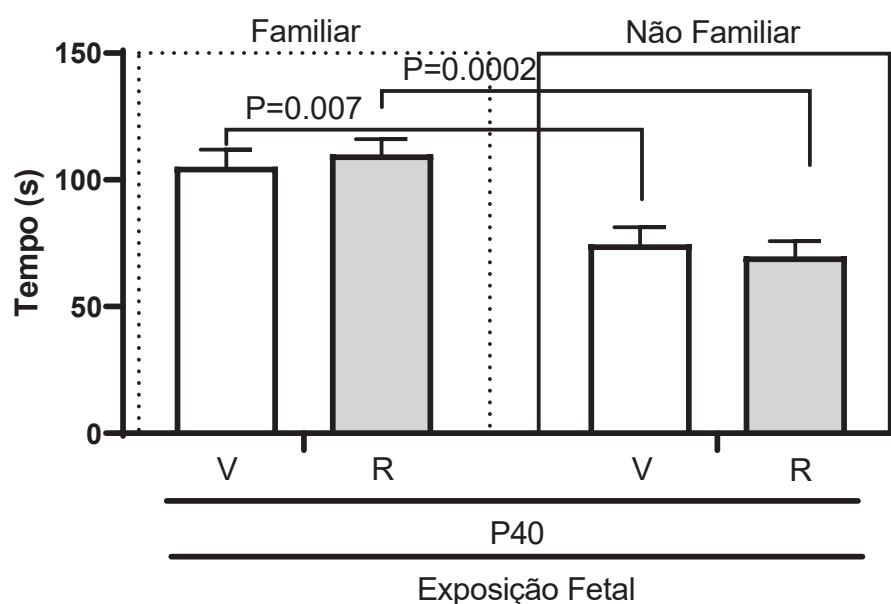


Figura 12: Teste de discriminação olfatória social (fêmeas) no tempo de 40 (P40) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona. O retângulo tracejado indica a exploração do odor familiar e o retângulo sólido mostra a exploração do odor não-familiar. Os valores de P encontram-se indicados na figura. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. O total de 36 animais foram utilizados em experimento.

Após o período do desafio neurotóxico, o fator preferência de compartimento ainda se demonstrou significativo pelos valores de ANOVA ($P < 0,0001$), embora o fator exposição não tenha sido significativo ($P = 0,9997$), a interação dos fatores exposição e preferência de compartimento se mostrou significativo ($P = 0,0346$). Assim demonstrado pela figura 13. O tamanho do efeito foi considerado médio ($d_z = 0,55$ e $g_z = 0,54$); para o grupo VV, o tamanho do efeito foi ($d_z = 0,61$ e $g_z = 0,57$); para o grupo RV o tamanho do efeito foi considerado grande ($d_z = 0,61$ e $g_z = 0,57$), segundo a classificação de classificação de Sawilowsky (2009).

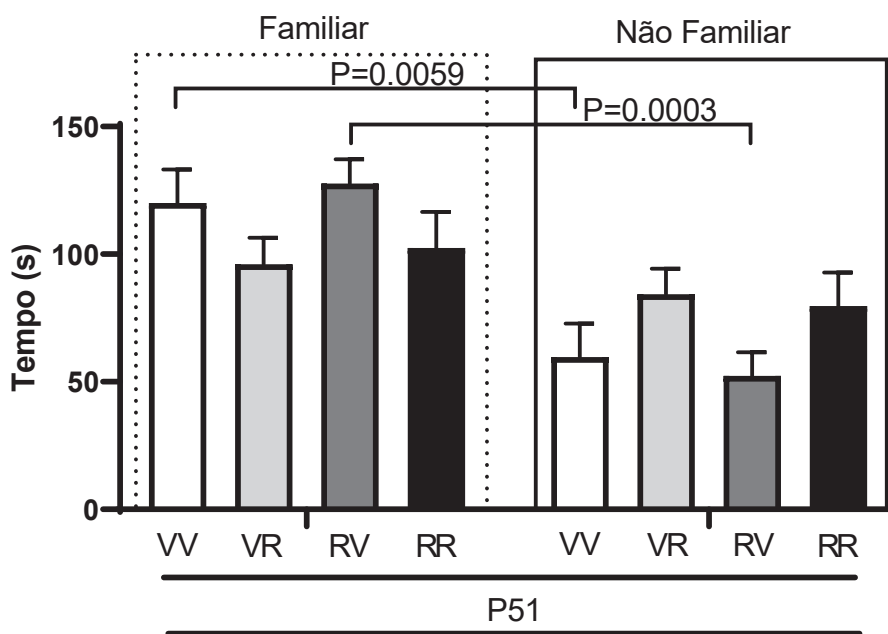


Figura 13: Teste de discriminação olfatória social (machos e fêmeas) no tempo de 51 (P51) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona; VV - veículo (fetal e pós-natal); VR - veículo (fetal) e rotenona (pós-natal); RV - rotenona (fetal) e veículo (pós-natal); RR - rotenona (fetal) e rotenona (pós-natal). O retângulo tracejado indica a exploração do odor familiar e o retângulo sólido mostra a exploração do odor não-familiar. Os valores de P encontram-se indicados na figura. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. O total de 46 animais foram utilizados em experimento.

Ao verificarmos somente os machos, assim como demonstrado pela figura 14, houve diferença entre a preferência ($P=0,034$), porém não houve diferenças significativas entre o fator exposição ($P= 0,999$) e nem a interação ($P=0,272$) em nenhum dos grupos.

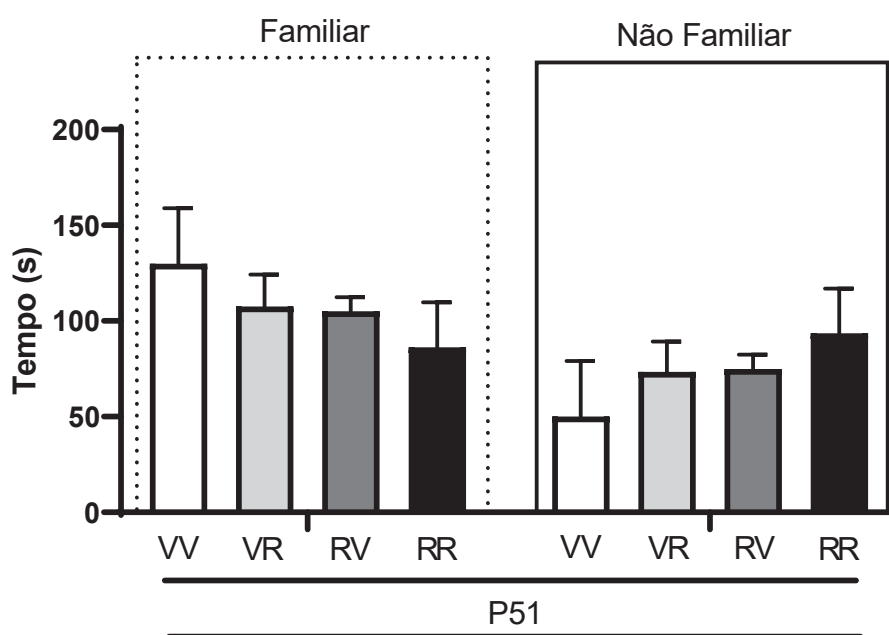


Figura 14: Teste de discriminação olfatória social (machos) no tempo de 51 (P51) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona; VV - veículo (fetal e pós-natal); VR - veículo (fetal) e rotenona (pós-natal); RV - rotenona (fetal) e veículo (pós-natal); RR - rotenona (fetal) e rotenona (pós-natal). O retângulo tracejado indica a exploração do odor familiar e o retângulo sólido mostra a exploração do odor não-familiar. Foi realizado ANOVA de duas vias. O total de 18 animais foram utilizados em experimento.

Ao verificarmos somente as fêmeas, o fator preferência de compartimento se demonstrou significativo ($P < 0,0001$), bem como a interação entre os fatores preferência de câmaras e exposição ($P = 0,0148$). O único grupo que demonstrou diferença significativa entre a preferência de câmaras foi o grupo que foi exposto a neurotoxina em período fetal e recebeu somente veículo no desafio neurotóxico (RV), como demonstrado na figura 15. O tamanho do efeito neste teste foi considerado médio ($d_z = 0,76$ e $g_z = 0,74$), para o grupo RV, o tamanho do efeito foi considerado grande ($d_z = 1,24$ e $g_z = 1,08$), segundo a classificação de Sawilowsky (2009).

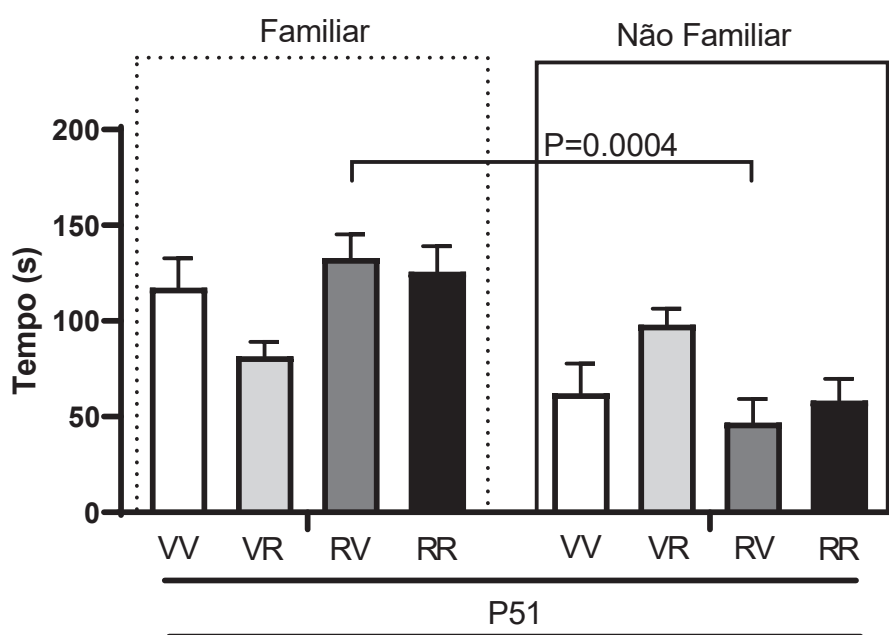


Figura 15: Teste de discriminação olfatória social (fêmeas) no tempo de 51 (P51) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona; VV - veículo (fetal e pós-natal); VR - veículo (fetal) e rotenona (pós-natal); RV - rotenona (fetal) e veículo (pós-natal); RR - rotenona (fetal) e rotenona (pós-natal). O retângulo tracejado indica a exploração do odor familiar e o retângulo sólido mostra a exploração do odor não-familiar. Os valores de P encontram-se indicados na figura. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. O total de 26 animais foram utilizados em experimento.

5.3 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA - ODOR NÃO SOCIAL

O teste de odor não social verifica a capacidade exploratória ativa do animal, referente a uma pista ambiental de odor com o qual o animal não está familiarizado. Nestes testes não houve diferença significativa entre os fatores exposição e tempo de exploração, como demonstrado pelas figuras 16.

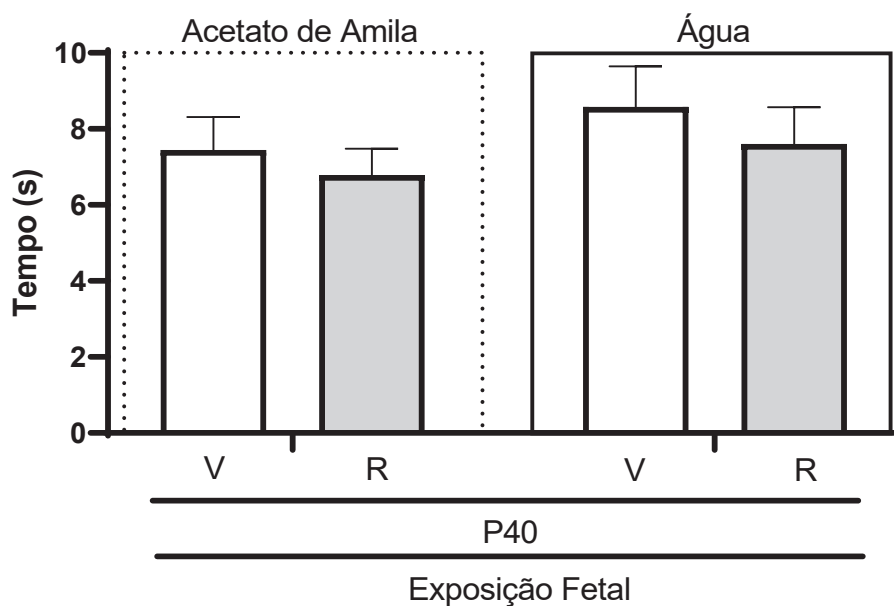


Figura 16: Teste de discriminação olfatória não social (machos e fêmeas) no tempo de 40 (P40) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona. O retângulo tracejado indica a exploração do odor não-social acetato de amila e o retângulo sólido mostra a exploração do odor neutro, ou seja, do odor de água. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias. O total de 54 animais foram utilizados em experimento.

Ao isolarmos somente os machos no dia P40, ainda não houve diferença significativa entre os fatores exposição e tempo de exploração, como demonstrado pelas figuras 17.

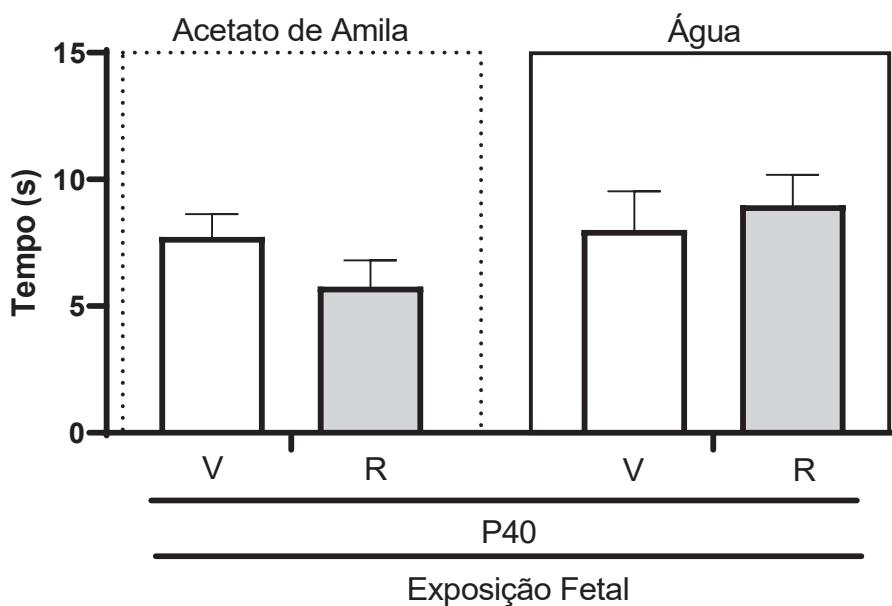


Figura 17: Teste de discriminação olfatória não social (machos) no tempo de 40 (P40) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona. O retângulo tracejado indica a exploração do odor não-social acetato de amila e o retângulo sólido mostra a exploração do odor neutro, ou seja, do odor de água. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias. O total de 27 animais foram utilizados em experimento.

Ao isolarmos somente as fêmeas no dia P40, ainda não houve diferença significativa entre os fatores exposição e tempo de exploração, como demonstrado pelas figuras 18.

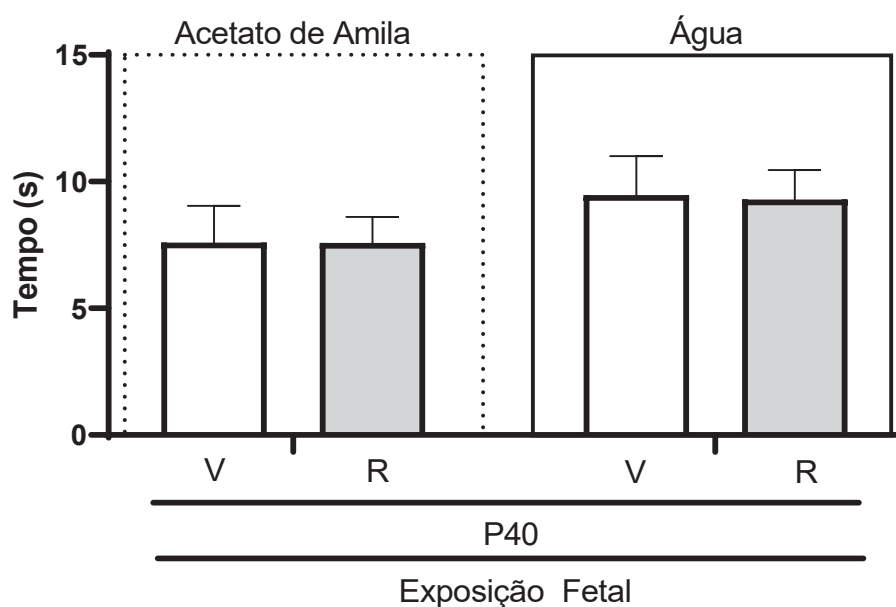


Figura 18: Teste de discriminação olfatória não social (Fêmeas) no tempo de 40 (P40) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona. O retângulo tracejado indica a exploração do odor não-social acetato de amila e o retângulo sólido mostra a exploração do odor neutro, ou seja, do odor de água. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias. O total de 27 animais foram utilizados em experimento.

Ao verificarmos os animais pós reexposição, ainda não houve diferença significativa entre os fatores exposição e tempo de exploração, como demonstrado pelas figuras 19.

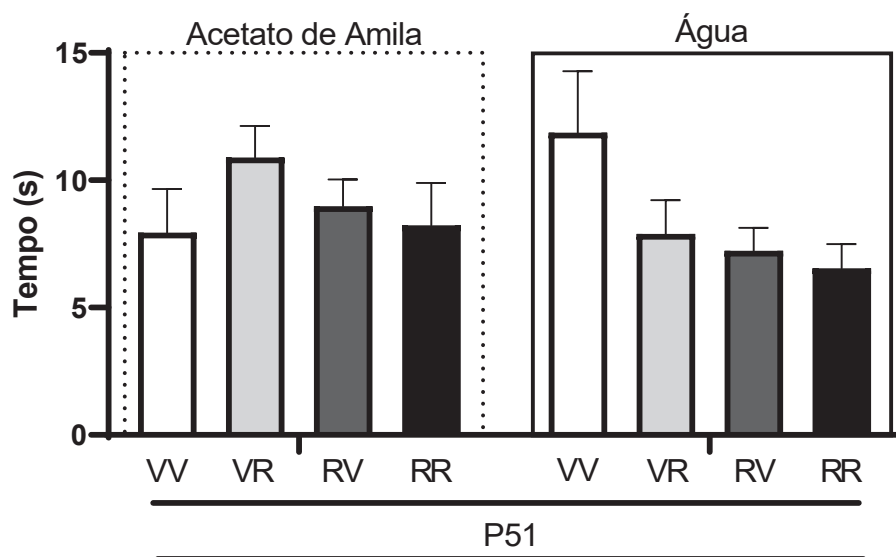


Figura 19: Teste de discriminação olfatória não-social (machos e fêmeas) no tempo de 51 (P51) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona; VV - veículo (fetal e pós-natal); VR - veículo (fetal) e rotenona (pós-natal); RV - rotenona (fetal) e veículo (pós-natal); RR - rotenona (fetal) e rotenona (pós-natal). O retângulo tracejado indica a exploração do odor não-social Acetato de Amila e o retângulo sólido mostra a exploração do odor neutro, ou seja, odor de água. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias. O total de 32 animais foram utilizados em experimento.

Isolando os animais machos pós reexposição, não houve diferença significativa, como demonstrado pelas figuras 20.

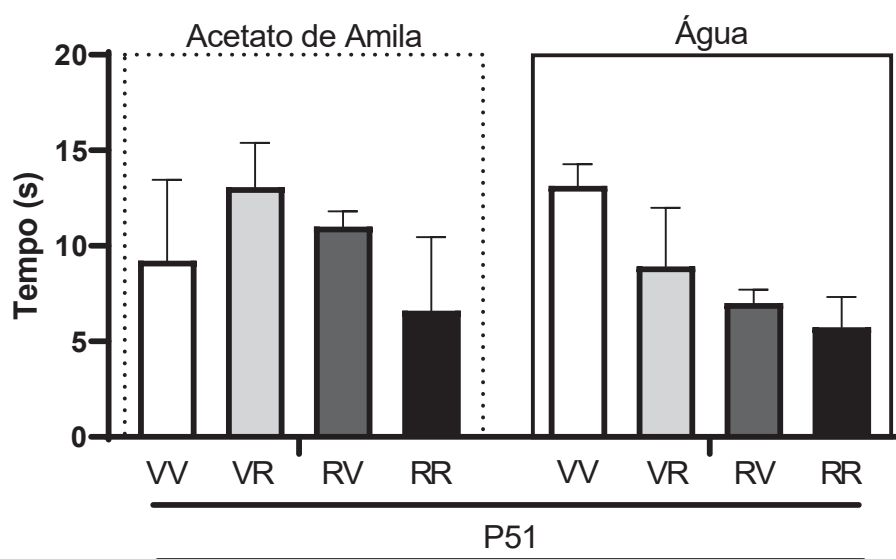


Figura 20: Teste de discriminação olfatória não-social (machos) no tempo de 51 (P51) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona; VV - veículo (fetal e pós-natal); VR - veículo (fetal) e rotenona (pós-natal); RV - rotenona (fetal) e veículo (pós-natal); RR - rotenona (fetal) e rotenona (pós-natal). O retângulo tracejado indica a exploração do odor não-social Acetato de Amila e o retângulo sólido mostra a exploração do odor neutro, ou seja, odor de água. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias. O total de 11 animais foram utilizados em experimento.

Não diferente, o isolando dos animais fêmeas pós reexposição, não houve diferença significativa, como demonstrado pelas figuras 21.

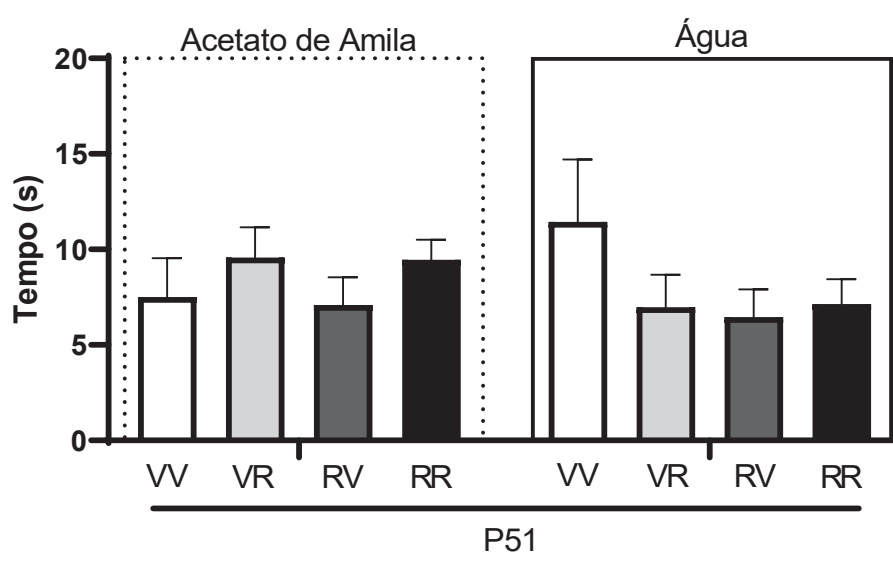


Figura 21: Teste de discriminação olfatória não-social (fêmeas) no tempo de 51 (P51) dias após o nascimento. Os grupos estão representados de acordo com a seguinte legenda: V - veículo; R - rotenona; VV - veículo (fetal e pós-natal); VR - veículo (fetal) e rotenona (pós-natal); RV - rotenona (fetal) e veículo (pós-natal); RR - rotenona (fetal) e rotenona (pós-natal). O retângulo tracejado indica a exploração do odor não-social Acetato de Amila e o retângulo sólido mostra a exploração do odor neutro, ou seja, odor de água. Foi realizado o teste ANOVA de duas vias. O total de 21 animais foram utilizados em experimento.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos resultantes da exposição à neurotoxina rotenona durante o período pré-natal, tendo como indicadores as modificações motoras e alterações no comportamento olfatório. Esperávamos a diminuição na motricidade que é tipicamente caracterizada pelo

parâmetro de distância percorrida no teste do campo aberto, refletindo os principais distúrbios associados à condição patológica da DP (tais como bradicinesia, rigidez, tremor de repouso e irregularidades no equilíbrio, postura e locomoção) (ZAITONE *et al.*, 2012).

Dentro do escopo da nossa investigação, verificamos a diminuição geral na distância percorrida por todos os grupos testados, ou seja, diminuição da distância percorrida no teste CA no dia P40 nos grupos VV, VR, RV e RR, em relação aos testes realizados no dia P51 para os mesmos grupos. Esta diminuição inicial era esperada pela habituação, no primeiro momento em P40 o animal tem o primeiro contato com o teste, no segundo momento P51, o animal é recolocado no aparato e assim, tende a diminuir a exploração.

Uma diminuição significativa foi observada apenas no grupo RR (exposto a rotenona fetal e posteriormente em período pós-natal) tanto nos grupos de ratos machos, quanto no grupo de fêmeas. Essa diminuição pode estar associada com a exposição à neurotoxina em ambiente fetal e pós-natal atuando de maneira acumulativa. Nesse sentido, a combinação de exposições, via circulação e por consequência, via metabolismo materno somado a exposição subdermal pós-natal pode estar causando uma lesão em vias motoras demonstradas no grupo RR.

De outro modo, ao analisar exclusivamente o grupo das fêmeas, verificamos uma diferença significativa entre os animais expostos somente à neurotoxina durante a exposição fetal e aqueles expostos tanto ao período fetal quanto ao período pós-natal. Segundo Pinos e colaboradores (2021) a exposição a agentes toxicológicos ambientais como pesticidas têm seu efeito dependente de muitos fatores, incluindo dosagem e via de administração, espécie, sexo e duração do tratamento (PINUS *et al.*, 2021). Isso pode ser justificado com a atividade elevada da enzima NADPH oxidase durante o ambiente uterino, possivelmente ajustando o estresse oxidativo induzido pela rotenona e, por consequência, diminuindo as chances de efeitos deletérios associados à superoxidação sobre a maturação e migração neuronal, como demonstrado por estudos *in vitro* (RAIJMAKERS *et al.*, 2004; ISHIDO E SUZUKI, 2010).

Curiosamente, a diferença entre os animais que receberam a neurotoxina somente em período fetal e que receberam a neurotoxina tanto em período pré-natal

como em período pós-natal só foi observado em fêmeas no teste CA ao dia P51, de certa forma existe a possibilidade de que as fêmeas que receberam neurotoxina em ambiente fetal tenham tido um efeito neuroprotetor devido a ação estrogênica, como visto em outros estudos, (OLIVOLA *et al.*, 2020; MEONI *et al.*, 2020; REEKES *et al.*, 2020), em contra partida, em regiões encefálicas relacionadas ao controle visuoespacial e motor, as fêmeas podem ter apresentado alterações mais intensas, causando menor pontuação em teste motor. Esta diferença da sintomática motora já tem sido descrito na literatura, tanto em modelos animais, quanto em casos clínicos (REEKES *et al.*, 2020). Os ratos machos, por sua vez, não apresentaram diferenças entre os grupos analisados neste teste, o que pode ter relação com a limitação no número amostral disponível para estes grupos.

A princípio, alterações olfatórias em pacientes com DP são associadas a uma via diferente da via motora como descrita por Braak e colaboradores (2003). Em nosso estudo é possível verificar alterações no TDO de odor social, em que os grupos expostos a rotenona exploraram igualmente ambos os compartimentos, o que indica ausência de discriminação olfatória, compatível com hiposmia. Este efeito aponta que alterações no ambiente de desenvolvimento fetal podem ter consequências na vida adulta, semelhante ao que ocorre em relação a mudanças cognitivas frente a exposições ambientais a neurotoxinas (FLORES-CUADRADO *et al.*, 2021; KRISHNA *et al.*, 2018).

Dados epidemiológicos e experimentais indicam que a exposição pré-natal a produtos químicos ambientais e medicamentos prescritos durante a gravidez pode mediar perdas embrionárias precoces, aborto espontâneo, retardo e reabsorções do crescimento fetal, diminuição do tamanho da ninhada, malformações fetais e baixo peso ao nascer (AL-GUBORY *et al.*, 2010). Em nosso estudo, os animais foram expostos a neurotoxina em período de formação do EO, dentre os dias E9 e E15 de gestação, esta janela é crucial para o desenvolvimento, maturação e migração de neurônios que participam do EO (LOPEZ-MASCARAQUE E DE CASTRO, 2002). Pelo TDO social, é possível perceber que alterações olfatórias derivadas da exposição a neurotoxina em período fetal e analisadas no dia P40 perduram em machos, mas o mesmo não ocorre em fêmeas. Assim, fêmeas continuaram reconhecendo o odor familiar, diferentemente dos machos, que não foram capazes de reconhecer o odor familiar (Figura 11 e 12). Essa diferença encontrada entre os animais machos e

fêmeas no TDO social pode indicar que o efeito neuroprotetor de hormônios estrogênicos pode estar atuando já em período fetal, diminuindo a neurotoxicidade por estresse oxidativo causada pela rotenona.

O modelo de DP com o uso da neurotoxina rotenona está bem estabelecido , e estudos com a associação de exposição pré-natal à neurotoxina promovem alterações de peso na prole (KRISHNA *et al.*, 2018). É observado na literatura que existem diferenças nos sintomas parkinsonianos entre homens e mulheres, e na avaliação olfativa não é diferente, pois mulheres tendem a ter um comprometimento olfatório menor que homens (SOLLA *et al.*, 2020). Nesse sentido, em nosso estudo, quando as ratas fêmeas foram expostas em período fetal à neurotoxina, observou-se uma manutenção da capacidade olfatória destes animais, o que corrobora com dados da literatura que apontam para uma maior resistência das fêmeas à indução de hiposmia em modelo de DP por rotenona intranigral (RODRIGUES *et al.*, 2022). Além disso, verifica-se que outros estudos que associaram o estrógeno como sendo um agente neuroprotetor, por diminuir a formação de ROS, potencialmente minimizando os sintomas de Parkinsonismo, resultando em uma razão de 1,5 homens para cada mulher com a DP (SONG *et al.*, 2020; SOLLA *et al.*, 2020). Isto se demonstra até mesmo em cultivo celular de células mesencefálicas, sendo que homens demonstram danos mais extensos nos gânglios da base e na substância negra (BAYER *et al.*, 1991). Deste modo, alterações olfatórias também seriam mais pronunciadas em indivíduos do sexo masculino. Estudos em nosso laboratório já encontraram diferenças entre a capacidade olfativa entre machos e fêmeas tratados com cafeína após infusão intranigral de rotenona (RODRIGUES *et al.*, 2022). Os ROS têm um efeito biológico em vários processos reprodutivos, como maturação e fertilidade de oócitos, fertilização, desenvolvimento embrionário e gravidez (HUSSAIN *et al.*, 2021). Na gravidez, os ROS podem causar impactos potencialmente deletérios na função placentária, como parto prematuro, alterações de embriogênese, descolamento placentário e aborto (BLOOM *et al.*, 2022), além de estar associada com doenças como restrições de crescimento intrauterino e diabetes gestacional (HUSSAIN *et al.*, 2021).

Considerando a administração de rotenona utilizada em nosso estudo, podemos verificar que a mesma dose (2,5 mg/kg/ml) já foi utilizada em estudos realizados por Khera e colaboradores (1982), onde foi analisado o efeito da neurotoxina em ambiente

pré-natal. Quando ratas prenhes foram expostas à mesma neurotoxina por gavagem, neste estudo, os pesquisadores não observaram diferenças no peso da prole, tão pouco identificaram malformações visíveis nos neonatos para essa dose específica (KHERA *et al.*, 1982). Das 30 fêmeas utilizadas em nosso estudo, 17 obtiveram prole (média de filhotes de 9,3). É possível que a ocorrência de proles abortadas e diminuição de peso da prole encontrada em nosso estudo tenha sido ampliada, quando comparada ao estudo anterior, devido à via de administração subcutânea escolhida em nosso estudo. Observamos que algumas fêmeas sofreram uma redução drástica de peso, levando, em alguns casos, ao aborto espontâneo dos fetos, além de ser observado o óbito de uma rata prena com sinais de sangramento vaginal. A ocorrência de aborto foi identificada tanto por vestígios de sangue em material cepilho no ninho do animal e na região perigonadal, quanto pela descoberta de fetos mortos na caixa em dois casos. Apesar disso, a quantificação aparenta estar subestimada, visto que não é possível afirmar que não tenha ocorrido um maior número de abortos, pois, ao dissecarmos fêmeas sem prole randomicamente pós eutanásia, as mesmas apresentaram fetos em regressão em tubo uterino. Ademais, quando a neurotoxina foi aplicada em indivíduos adultos durante o período de 10 dias (do dia P40 ao P50), cerca de 07 animais tiveram de ser descartados do experimento por terem desenvolvido caquexia. É possível que a utilização de uma dose inferior a 2,5 mg/ml/Kg de rotenona ou a administração por via gástrica, como realizado em outros estudos (KHERA *et al.*, 1982), possa evitar que esse tipo de ocorrência se repita e permitirá a elucidação dessas alterações.

Avaliando a exploração de odores não sociais, não observamos diferenças significativas no teste realizado com o acetato de amila. O acetato de amila ($C_7H_{14}O_2$) é uma substância com um odor semelhante ao da banana, e estudos indicam sua capacidade de desencadear uma resposta aversiva ou apetitiva em animais condicionados (WILLIAMS E LUPFER, 2023). Uchida e colaboradores (2019) descobriram que uma exposição de 30 segundos a este mesmo odor desencadeia um aumento significativo do fluxo sanguíneo no bulbo olfatório, indicando a manifestação do recrutamento desta área mediante a exposição a este odor não social. No entanto, o teste utilizado, propriamente, depende da ocorrência de um comportamento de busca ativa pelo odor, se tal odor apresentar uma característica aversiva, poderíamos estar diante de um comportamento de esquiva por parte dos animais testados (LABBE

et al., 2006). Jennings e colaboradores (2022) em seu estudo com camundongos observaram que o uso de ésteres de acetato em suas isomorfias, como o acetato de amila, podem desencadear aversão. Certamente, a reação aversiva pode estar ligada ao modelo utilizado (camundongos C57BL/6J), sendo assim, outros roedores podem não apresentar tal comportamento (JENNINGS *et al.*, 2022). Dessa forma, estudos com condicionamento ou utilizando outro odor podem ajudar a demonstrar o efeito da exposição a neurotoxina relacionada a via de odor primária.

Mamíferos possuem duas vias olfatórias de identificação de odores, a via principal que possibilita uma discriminação consciente entre diferentes odores de natureza volátil, e também a via olfatória acessória que é altamente especializado na detecção de um conjunto reduzido de odores não-voláteis que formam os feromônios, sendo que estes apresentam um grande valor na comunicação intra ou interespecíes (PREDIGER, 2002). A exemplo de odores não voláteis há os feromônios, esses odores são emitidos por animais para demarcar território, atrair parceiros sexuais, sendo assim, um odor relacionado a interação social do animal. Existem grandes diferenças entre os sistemas olfatórios principal e acessório, que vão desde a localização dos quimiorreceptores destinados a detectar a presença dos diferentes odores, passando a diferentes projeções para o bulbo olfatório e deste para estruturas cerebrais superiores (BRENNAN e KEVERNE, 1997; SCALIA E WINANS, 1975; PREDIGER, 2002; MUCIGNAT-CARETTA, 2010). Sabe-se que os hormônios esteroidais sexuais tem atuação na detecção e integração de informações socialmente relevantes, modulando a produção e detecção de odores, sendo que em fêmeas, estradiol, progesterona e estrogênios são liberados na urina, o que pode ativar neurônios sensoriais vomeronasais do sistema olfatório secundário (ABAFFY *et al.*, 2023). Em nosso estudo foi evidente os efeitos associados a via principal, por outro lado, a distinção do odor não social não ocorreu em nenhum dos grupos analisados no TRO não social, porém de outro lado, a via olfatória acessória pode ter tido menor impacto pela neurotoxina, assim, como foi visto em fêmeas no TDO social. Segundo MUCIGNAT-CARETTA (2010) a identificação de neurônios ligados a via olfatória acessória é possível ao dia estral 14, perto do fim da janela de exposição do experimento, o que pode ter evitado danos maiores na via acessória por estresse oxidativo.

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo lançam luz sobre as complexas interações entre as exposições ambientais, o desenvolvimento fetal e a manifestação de distúrbios olfatórios em modelo de Parkinsonismo. A escolha da via de administração subcutânea trouxe à tona possíveis repercussões relacionadas a exposições ambientais com pesticidas como, por exemplo, a rotenona.

Em nosso estudo foi observado alterações motoras em fêmeas, a qual apresentou menor distância percorrida em CA, o que não foi observado em machos. Tal resultado pode indicar diferenças na sintomáticas sobre regiões motoras, quando comparado machos e fêmeas, podendo assim, ser objeto de estudo para futuras pesquisas.

Também foi possível verificar que alterações em ambiente fetal pode causar alterações em sistema olfatório, e essas diferenças se apresentam distintamente entre machos e em fêmeas, o que ficou evidente no TDO social, onde machos demonstraram maior prejuízo olfatório (não discriminando os odores) quando comparado com as fêmeas (que discriminaram os odores). Essa diferença pode apontar para um possível caminho de estudo envolvendo vias olfatórias acessórias relacionadas ao sexo.

A ausência de prejuízos relacionados ao TRO não social sugere que a exposição à rotenona possa ter comprometido apenas os circuitos relacionados à via olfatória acessória, sem causar outras repercussões para a via olfatória principal. Portanto, embora este estudo tenha contribuído de maneira inovadora para o tema de investigação, mais estudos serão fundamentais para a elucidação dos mecanismos subjacentes às alterações olfatórias em contextos de Parkinsonismo.

REFERÊNCIAS

ABAFFY, Tatjana; LU, Hsiu-Yi; MATSUNAMI, Hiroaki. Sex steroid hormone synthesis, metabolism, and the effects on the mammalian olfactory system. **Cell and Tissue Research**, v. 391, n. 1, p. 19-42, 2023.

AL-GUBORY, Kaïs H.; FOWLER, Paul A.; GARREL, Catherine. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 10, p. 1634-1650, 2010.

AURICH, Mariana F. et al. Olfactory impairment is related to REM sleep deprivation in rotenone model of Parkinson's disease. **Sleep Science**, v. 10, n. 1, p. 47, 2017.

BABATUNDE, Bamidele Richard, et al. Rotenone induced olfactory deficit in Parkinson's disease rat model: The protective role of adenosine A2A receptors antagonist. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 2023, 127: 102188.

BETARBET, Ranjita et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301-1306, 2000.

BISBAL, Mariano; SANCHEZ, Mónica. Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. **Neural regeneration research**, v. 14, n. 5, p. 762, 2019.

BITTLE, Jada et al. The role of redox dysregulation in the effects of prenatal stress on embryonic interneuron migration. **Cerebral Cortex**, v. 29, n. 12, p. 5116-5130, 2019.

BLESA, Javier et al. Motor and non-motor circuit disturbances in early Parkinson disease: which happens first?. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 23, n. 2, p. 115-128, 2022.

BLOEM, Bastiaan R.; OKUN, Michael S.; KLEIN, Christine. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 397, n. 10291, p. 2284-2303, 2021.

BOYD, Rachel J., et al. Neuroinflammation represents a common theme amongst genetic and environmental risk factors for Alzheimer and Parkinson diseases. **Journal of Neuroinflammation**, 2022, 19.1: 223.

BRAAK, Heiko et al. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. **Journal of neural transmission**, v. 110, p. 517-536, 2003.

BRENNAN, P.A.; KEVERNE, E.B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Progress Neurob** 51: 457-481, 1997.

CARREIRO, Zé. Intérpretes: Tonico e Tinoco. Canoeiro. São Paulo: **Continental**: 1950. Música eletrônica. Disponível em: <https://open.spotify.com/intl-pt/track/6Ha1HY8v3pp7n1eutBQqyX>. Acesso dia 15 de julho de 2023.

CHASE, Bruce A.; MARKOPOULOU, Katerina. Olfactory dysfunction in familial and sporadic Parkinson's disease. **Frontiers in neurology**, v. 11, p. 447, 2020.

CHUPROSKI, Ana Paula et al. Metabolic dysfunctions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. **Experimental Brain Research**, v. 241, n. 5, p. 1289-1298, 2023.

COSTA, José Paulo Chaves da; ALVES, Sérgio de Mello; BÉLO, Muracy. Teores de rotenona em Clones de Timbó (Derris Spp. Fabaceae) de diferentes regiões da Amazônia e os seus efeitos na emergência de Imagos em Musca Domestica L. **Acta Amazônica**, v. 29, p. 563-573, 1999.

DE LAZZARI, Federica et al. Superoxide radical dismutation as new therapeutic strategy in Parkinson's disease. **Aging and disease**, v. 9, n. 4, p. 716, 2018.

DHIMAN, Vikas et al. Is ambient air pollution a risk factor for Parkinson's disease? A meta-analysis of epidemiological evidence. **International Journal of Environmental Health Research**, p. 1-18, 2022.

DOTY, Richard L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 6, p. 329-339, 2012.

FAGOTTI, Juliane et al. Chronic sleep restriction in the rotenone Parkinson's disease model in rats reveals peripheral early-phase biomarkers. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1898, 2019.

FLEMING, Sheila M. et al. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. **Experimental neurology**, v. 187, n. 2, p. 418-429, 2004.

FLORES-CUADRADO, Alicia et al. Astrogliosis and sexually dimorphic neurodegeneration and microgliosis in the olfactory bulb in Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 7, n. 1, p. 11, 2021.

FRANCO, Pedro, et al. Exposição a PM2. 5 e admissões hospitalares urgência devido às doenças de Alzheimer e Parkinson. In: O compromisso da Geografia para territórios em mudança. Livro de Atas do XIII Congresso da Geografia Portuguesa. **Associação Portuguesa de Geógrafos**, Universidade de Coimbra. Faculdade de Letras, 2022. p. 342-346.

GAO, Hui-Ming et al. Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 4, p. 1228-1236, 2003.

HEINZ, Sabrina et al. Mechanistic investigations of the mitochondrial complex I inhibitor rotenone in the context of pharmacological and safety evaluation. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

HONG, Jin Yong et al. Apathy and olfactory dysfunction in early Parkinson's disease. **Journal of movement disorders**, v. 8, n. 1, p. 21, 2015.

HUISMAN, Evelien; UYLINGS, Harry BM; HOOGLAND, Piet V. A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 19, n. 6, p. 687-692, 2004.

ILKIW, Jessica L.; LIMA, Marcelo MS. Perspectives for the association between olfactory disturbances and depression in Parkinson's disease. **Neural regeneration research**, v. 14, n. 4, p. 591, 2019.

INTARARUCHIKUL, Thidarat et al. Effects of Centella asiatica extract on antioxidant status and liver metabolome of rotenone-treated rats using GC-MS. **Biomedical Chromatography**, v. 33, n. 2, p. e4395, 2019.

ISHIDO, Masami; SUZUKI, Junko. Inhibition by rotenone of mesencephalic neural stem-cell migration in a neurosphere assay in vitro. **Toxicology in vitro**, v. 24, n. 2, p. 552-557, 2010.

ISHIDO, Masami; SUZUKI, Junko; MASUO, Yoshinori. Neonatal rotenone lesions cause onset of hyperactivity during juvenile and adulthood in the rat. **Toxicology Letters**, v. 266, p. 42-48, 2017.

a) JAIN, Juli et al. Delayed in sensorimotor reflex ontogeny, slow physical growth, and impairments in behaviour as well as dopaminergic neuronal death in mice offspring following prenatally rotenone administration. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 2023.

b) JAIN, Rachit et al. Inter and intracellular mitochondrial transfer: future of mitochondrial transplant therapy in Parkinson's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 159, p. 114268, 2023.

JENNINGS, Liam et al. The behavioral sensitivity of mice to acetate esters. **Chemical Senses**, v. 47, p. bjac017, 2022.

KASDAGLI, Maria-Iosifina et al. Air pollution and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis up to 2018. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 222, n. 3, p. 402-409, 2019.

KHERA, Kundan S.; WHALEN, Carole; ANGERS, George. Teratogenicity study on pyrethrum and rotenone (natural origin) and ronnel in pregnant rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 10, n. 1, p. 111-119, 1982.

KIM, Bo-Ra et al. Spatiotemporal dynamics of the development of mouse olfactory system from prenatal to postnatal period. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 17, p. 1157224, 2023.

KOPRICH, James B.; KALIA, Lorraine V.; BROTCHE, Jonathan M. Animal models of α synucleinopathy for Parkinson disease drug development. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 515-529, 2017.

KRISHNA, Gokul et al. Oral supplements of inulin during gestation offsets rotenone-induced oxidative impairments and neurotoxicity in maternal and prenatal rat brain. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, p. 751-762, 2018.

LABBE, D. et al. Modulation of perceived taste by olfaction in familiar and unfamiliar beverages. **Food Quality and Preference**, v. 17, n. 7-8, p. 582-589, 2006.

LIU, Ganqiang, et al. Mitochondrial haplogroups and cognitive progression in Parkinson's disease. **Brain**, 2023, 146.1: 42-49.

LÓPEZ-MASCARAQUE, Laura; DE CASTRO, F. The olfactory bulb as an independent developmental domain. **Cell Death & Differentiation**, v. 9, n. 12, p. 1279-1286, 2002.

MAGALHÃES, João D.; CARDOSO, Sandra Morais. Mitochondrial signaling on innate immunity activation in Parkinson disease. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 78, p. 102664, 2023.

MARKHAM, Julie A.; KOENIG, James I. Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. **Psychopharmacology**, v. 214, p. 89-106, 2011.

MARTINEZ-MARTIN, Pablo et al. Impact of advanced Parkinson's disease on caregivers: an international real-world study. **Journal of Neurology**, p. 1-12, 2023.

MELO, Karina Motta et al. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 13926-13938, 2015.

MEONI, Sara; MACEROLLO, Antonella; MORO, Elena. Sex differences in movement disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 2, p. 84-96, 2020.

MUCIGNAT-CARETTA, Carla. The rodent accessory olfactory system. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 196, p. 767-777, 2010.

MÜLLER-NEDEBOCK, Amica C. et al. Different pieces of the same puzzle: a multifaceted perspective on the complex biological basis of Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 9, n. 1, p. 110, 2023.

MUNDIÑANO, Inaki-Carril et al. Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. **Acta neuropathologica**, v. 122, n. 1, p. 61-74, 2011.

NOSEDA, Ana Carolina D. et al. MT2 melatonin receptors expressed in the olfactory bulb modulate depressive-like behavior and olfaction in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 891, p. 173722, 2021.

OLIVOLA, Sara et al. Parkinson's disease in pregnancy: a case report and review of the literature. **Frontiers in neurology**, v. 10, p. 1349, 2020.

OTHMAN, Zetty Shafiqah et al. Development of a new binary solvent system using ionic liquids as additives to improve rotenone extraction yield from Malaysia *Derris* sp. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

PAMIES, David et al. Rotenone exerts developmental neurotoxicity in a human brain spheroid model. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 354, p. 101-114, 2018.

PARKINSON, James. An essay on the shaking palsy. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 223-236, 2002.

PATEL, Seema; SANGEETA, Sushree. Pesticides as the drivers of neuropsychotic diseases, cancers, and teratogenicity among agro-workers as well as general public. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 91-100, 2019.

PHAIROH, Krittapat et al. Pharmacognostic specification and rotenone content in *Derris elliptica* stems. **Pharmacognosy Journal**, v. 13, n. 1, 2021.

PINOS, Helena et al. Relationship between prenatal or postnatal exposure to pesticides and obesity: a systematic review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 13, p. 7170, 2021.

POST, Bart et al. Young onset Parkinson's disease: a modern and tailored approach. **Journal of Parkinson's disease**, v. 10, n. s1, p. S29-S36, 2020.

PREDIGER, Rui Daniel Schröder et al. Facilitação da memória olfativa pelo etanol em ratos: papel dos sistemas colinérgico, opióide e dopaminérgico. **UFSC**. 2002.

PRUNELL, Giselle; OLIVERA-BRAVO, Silvia. A Focus on Astrocyte Contribution to Parkinson's Disease Etiology. **Biomolecules**, 2022, 12.12: 1745.

RADDER, Danique LM, et al. Physiotherapy in Parkinson's disease: a meta-analysis of present treatment modalities. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, 2020, 34.10: 871-880.

RAGER, Julia E. et al. Review of the environmental prenatal exposome and its relationship to maternal and fetal health. **Reproductive Toxicology**, v. 98, p. 1-12, 2020.

RAIJMAKERS, M. T. M. et al. NAD (P) H oxidase associated superoxide production in human placenta from normotensive and pre-eclamptic women. **Placenta**, v. 25, p. S85-S89, 2004.

REEKES, Tyler Harrison et al. Sex specific cognitive differences in Parkinson disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 6, n. 1, p. 7, 2020.

RODRIGUES, Lais S. et al. Olfactory impairment in the rotenone model of Parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 383, 2014.

RODRIGUES, Lais S. et al. Potential new therapies against a toxic relationship: neuroinflammation and Parkinson's disease. **Behavioural Pharmacology**, v. 30, n. 8, p. 675-687, 2019.

RODRIGUES, Lais Soares et al. Caffeine and nicotine in a Parkinson's disease's animal model: from olfactory improvement to neuroprotection. 2022. Doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1991814/v1>.

RODRIGUEZ, Alvaro et al. ToxId: an efficient algorithm to solve occlusions when tracking multiple animals. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 14774, 2017.

SAKANO, Hitoshi. Developmental regulation of olfactory circuit formation in mice. *Development*, **Growth & Differentiation**, v. 62, n. 4, p. 199-213, 2020.

SANTOS-LOBATO, Bruno L. et al. Genetics of Parkinson's disease in Brazil: a systematic review of monogenic forms. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 79, n. 07, p. 612-623, 2021.

SAWILOWSKY, Shlomo S. New effect size rules of thumb. **Journal of modern applied statistical methods**, v. 8, n. 2, p. 26, 2009.

SCALIA, Frank; WINANS, Sarah S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. **Journal of Comparative Neurology**, v. 161, n. 1, p. 31-55, 1975.

SCHLOSSER, Gerhard. Making senses: development of vertebrate cranial placodes. **International review of cell and molecular biology**, v. 283, p. 129-234, 2010.

SHANMUGHAPRIYA, Santhanam; LANGFORD, Dianne; NATARAJASEENIVASAN, Kalimuthusamy. Inter and Intracellular mitochondrial trafficking in health and disease. **Ageing Research Reviews**, v. 62, p. 101128, 2020.

SHARMA, Neha et al. Pharmacological evaluation of vanillic acid in rotenone-induced Parkinson's disease rat model. **European Journal of Pharmacology**, v. 903, p. 174112, 2021.

SILVA, Ana Beatriz Gomes et al. Doença de Parkinson: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 47677-47698, 2021.

SOLLA, P. et al. Sex-related differences in olfactory function and evaluation of possible confounding factors among patients with Parkinson's disease. **Journal of neurology**, v. 267, p. 57-63, 2020.

SONG, Yu-jia et al. The effect of estrogen replacement therapy on Alzheimer's disease and Parkinson's disease in postmenopausal women: a meta-analysis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 157, 2020.

TANSEY, Malú Gámez et al. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. **Nature Reviews Immunology**, p. 1-17, 2022.

TASSONE, Annalisa et al. Mitochondrial Bioenergy in Neurodegenerative Disease: Huntington and Parkinson. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7221, 2023.

TENCATT, Luiz Fernando Caserta; GOMES, Vandergleison de Carvalho; EVERS, Hans-Georg. A new species of Corydoras (Siluriformes: Callichthyidae) from the rio Madre de Dios basin, Peruvian Amazon, with comments on Corydoras aeneus identity. **Neotropical Ichthyology**, v. 21, p. e230023, 2023.

TREMBLAY, Cécilia; FRASNELLI, Johannes. Olfactory–Trigeminal Interactions in Patients with Parkinson's Disease. **Chemical Senses**, v. 46, 2021.

TREMBLAY, Cécilia; MEI, Jie; FRASNELLI, Johannes. Olfactory bulb surroundings can help to distinguish Parkinson's disease from non-parkinsonian olfactory dysfunction. **NeuroImage: Clinical**, v. 28, p. 102457, 2020.

UCHIDA, Sae; ITO, Yoshie; KAGITANI, Fusako. Effects of nicotine on odor-induced increases in regional blood flow in the olfactory bulb in rats. **The journal of physiological sciences**, v. 69, p. 425-431, 2019.

VALDEZ, Laura B. et al. Complex I syndrome in striatum and frontal cortex in a rat model of Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 135, p. 274-282, 2019.

VALVERDE, Facundo; HEREDIA, Margarita; SANTACANA, María. Characterization of neuronal cell varieties migrating from the olfactory epithelium during prenatal development in the rat. Immunocytochemical study using antibodies against olfactory marker protein (OMP) and luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH). **Developmental brain research**, v. 71, n. 2, p. 209-220, 1993.

a) VASCONCELLOS, Paula Renata Olegini, et al. Condições da exposição a agrotóxicos de portadores da doença de Parkinson acompanhados no ambulatório de neurologia de um hospital universitário e a percepção da relação da exposição com o adoecimento. **Saúde em debate**, 2020, 43: 1084-1094.

b) VASCONCELLOS, Paula Renata Olegini, et al. Exposição a agrotóxicos na agricultura e doença de Parkinson em usuários de um serviço público de saúde do Paraná, Brasil. **Cadernos Saúde Coletiva**, 2020, 28: 567-578.

WILLIAMS, Chloe N.; LUPFER, Gwen. The Effect of Owl Feces on Rat Operant Responding: Can Rats Recognize a Conspecific-Eating Predator?. **Journal of Articles in Support of the Null Hypothesis**, v. 20, n. 1, p. 2, 2023.

YUAN, Tian-Shuo et al. Sex modulates the outcome of subthalamic nucleus deep brain stimulation in patients with Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 18, n. 4, p. 901, 2023.

ZAITONE, Sawsan A.; ABO-ELMATTY, Dina M.; ELSHAZLY, Shimaa M. Piracetam and vinpocetine ameliorate rotenone-induced Parkinsonism in rats. **Indian journal of pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 774, 2012.

ZHANG, Zhen-Nian et al. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. **Brain research**, v. 1655, p. 104-113, 2017.