



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

TYCIANE DE SOUZA NASCIMENTO

**PARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS:
UM ESTUDO TEMPORAL DE ALTERAÇÕES MOTORAS E NÃO MOTORAS E
MECANISMOS ENVOLVIDOS.**

FORTALEZA

2020

TYCIANE DE SOUZA NASCIMENTO

PARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS: UM ESTUDO TEMPORAL DE ALTERAÇÕES MOTORAS E NÃO MOTORAS E MECANISMOS ENVOLVIDOS.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Geanne Matos de Andrade.

FORTALEZA
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N199p Nascimento, Tyciane.
PARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS : UM ESTUDO TEMPORAL DE ALTERAÇÕES MOTORAS E NÃO MOTORAS E MECANISMOS ENVOLVIDOS. / Tyciane Nascimento. – 2020.
114 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.
1. Rotenona. 2. Déficits motores. 3. Neurodegeneração. 4. Neuroinflamação. 5. Alterações Gastrointestinais. I. Título.

CDD 610

TYCIANE DE SOUZA NASCIMENTO

PARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ROTENONA EM RATOS: UM ESTUDO TEMPORAL DE ALTERAÇÕES MOTORAS E NÃO MOTORAS E MECANISMOS ENVOLVIDOS.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Geanne Matos de Andrade.

Aprovada em: _06/_10/_2020_

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro Braga Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Merari de Fátima Ramires Ferrari
Universidade de São Paulo (USP)

A essa força multi nomeável que governa a natureza.
Aos meus pais, minha irmã e meus sobrinhos,
Ao Herói, o eterno guardião da minha janela, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Essa força multi nomeável que governa a natureza.

Aos meus pais, **Neldo** e **Nilda**, por mais uma vez me acompanhar nessa jornada acadêmica, por todo apoio, suporte, investimento, compreensão, carinho: tudo que eu sou devo a vocês. A minha irmã Tycia, pelo apoio, pelas caronas, a perturbação, o divertimento e a força. Aos meus sobrinhos **Arthur** e **Catharina** pela perturbação e divertimento constante, e por serem minha fonte inesgotável de força. Ao **Raul** pelo companheirismo e apoio.

Ao **Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade**, por mais uma vez confiar no meu trabalho, pela excelente orientação, pela contribuição para a minha formação científica e pela oportunidade para a minha construção como profissional.

Ao **Prof. Dra. Merari de Fatima Ramires Ferrari** pela amabilidade, pelo tempo, disponibilidade, pelas valiosas contribuições e sugestões. Ao Prof. Dr. **Pedro Jorge Calas Magalhães** pelo tempo e pelas valiosas sugestões. A Dra. **Marta Regina Santos do Carmo**, pela orientação, pela paciência e disponibilidade, e por tantos ensinamentos na minha trajetória.

Ao **Pro. Dr. Arménio Aguiar**, pela parceria, pela orientação, pelos artigos, por sempre ter uma contribuição para o meu trabalho, pelo cuidado, por me acolher no seu laboratório onde aprendi tantas coisas novas, sou imensamente grata.

A **Jéssica Rabelo** por mais uma vez me ensinar todo o necessário, pela paciência infinita, a contribuição imensa, a disponibilidade e companheirismo nas horas mais difíceis, as extensas horas de trabalho, as caronas e cuidado, os conselhos e por mais uma vez me acompanhar e suavizar mais uma finalização de um ciclo. Uma pessoa por quem tenho profunda admiração, gratidão e sem o qual esse trabalho não seria possível e meu aprendizado nessa trajetória infinitamente mais pobre.

Aos colegas do LNC (Laboratório de Neurociência e Comportamento): ao **Alfaete** por me acompanhar nessa jornada da rotenona, por toda ajuda, amizade, incentivo, companheirismo. Ao **Albert** por estar sempre disponível a ajudar e pelas risadas. Aos demais colegas de laboratório: **Juliete**, **Jessica Pessoa** pela amizade, por tornarem essa jornada mais leve, aos demais colegas pelo companheirismo. Ao **Arnaldo** e **Kelly** por sempre estarem presentes e se disporem a tirar nossas dúvidas e auxiliar.

A **Mônica Belém** por me acolher, pela parceria, companheirismo, ensinamentos, informações, amizade e por tanto me ensinar e me guiar nesse mestrado, por sempre me salvar

nos momentos de aperto, sou imensamente grata.

Aos **funcionários do Biotério** do Núcleo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) pelo suporte. Ao técnico **Alisson Chaves** pela dedicação, competência e paciência na ajuda dos meus extensos protocolos e trocentas exigências.

Aos animais, meus maiores companheiros nessa jornada de descoberta, e os que mais se doaram no processo: eu prezo o sacrifício de cada um de vocês.

À Fundação Cearense de Apoio Científico e Tecnológico (**FUNCAP**) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o engrandecimento deste trabalho e para minha formação. A todos, minha humilde e sincera gratidão.

"A educação é um ato de amor, por isso, um ato de coragem. Não pode temer o debate. A análise da realidade. Não pode fugir à discussão criadora, sob pena de ser uma farsa."
(Paulo Freire)

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) atinge cerca de 1,6% da população mundial acima dos 65 anos, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum em idosos. A DP é caracterizada pela perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, levando a uma grave redução dos níveis de dopamina, resultando em diversos sintomas motores (tremor de repouso, bradicinesia, instabilidade, anormalidades posturais e acinesia) e sintomas não motores (hiposmia, depressão, demência, ansiedade e constipação). A rotenona é um pesticida que mimetiza sintomas da DP, representando um modelo de critério de constructo. O objetivo do presente estudo é estabelecer uma linha temporal do surgimento das alterações motoras e não motoras e mecanismos envolvidos no modelo de parkinsonismo experimental induzido pela rotenona em ratos. Ratos Wistar (220-250g) foram divididos em dois grupos: ROT (receberam rotenona 2,75mg/kg, i.p. durante 21 dias) e CTL (receberam o veículo DMSO + óleo de girassol, i.p. durante 21 dias). Os resultados mostraram que a rotenona foi capaz de induzir déficits motores na exploração horizontal e vertical e velocidade média dos animais no teste do campo aberto após 14 e 21 dias de administração ($p < 0,05$), na estabilidade postural no teste do comportamento de *rearing* e na coordenação motora no teste do rotarod após 14 e 21 dias ($p < 0,05$). O déficit observado no rotarod foi responsivo à apomorfina, que melhorou o desempenho dos animais. A rotenona também induziu déficits não motores, como prejuízo olfatório no teste do pellet enterrado após 7 e 21 dias, e no teste da discriminação olfatória após 21 dias, comportamento tipo-depressivo no teste de preferência por sacarose após 14 e 21 dias, bem como prejuízo na memória de trabalho no teste do labirinto em Y e memória aversiva no teste da esquiva passiva após 21 dias de administração ($p < 0,05$). A rotenona também retardou significativamente o esvaziamento gástrico de líquidos e induziu a perda de neurônios dopaminérgicos no estriado e substância negra, diminuição do conteúdo de dopamina e DOPAC, microgliose e astrogliose no estriado, além de causar estresse oxidativo no bulbo olfatório e mesencéfalo ($p < 0,05$). Concluímos que a rotenona causa neurodegeneração e alterações motoras e não motoras por mecanismos que envolvem neuroinflamação e estresse oxidativo numa linha temporal que pode ser similar a clínica da doença, sendo assim um bom modelo de parkinsonismo que pode ser utilizado na busca novas de novas substâncias neuroprotetoras bem como na compreensão da patogênese dessa doença.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Rotenona. Déficits motores. Neurodegeneração. Neuroinflamação. Alterações Gastrointestinais. Hiposmia.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) affects about 1.6% of the world's population over 65 years old, being the second most common neurodegenerative disease in the elderly. PD is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra, leading to a severe reduction of dopamine levels, resulting in several motor symptoms (resting tremor, bradykinesia, instability, postural abnormalities and akinesia) and non-motor symptoms (anosmia, depression, dementia, anxiety and constipation). Rotenone is a pesticide that mimics PD symptoms, representing a model of construct criteria. The aim of the present study was to establish a timeline and mechanisms involved in motor and non-motor changes in the experimental model of parkinsonism induced by rotenone in rats. Wistar rats (220-250g) were divided into two groups: ROT (receiving rotenone 2.75mg /kg, i.p. for 21 days) and CTL (receiving the DMSO vehicle + sunflower oil i.p for 21 days). The results showed that rotenone was able to induce motor deficits significantly ($p < 0.05$) after 14 and 21 days of administration in the horizontal and vertical exploration and mean velocity of the animals in the open field test, as well as in the postural stability in the rearing behavior test, also observed decrease in motor coordination in the rotarod test. The deficit observed after 21 days in rotarod was responsive to apomorphine, which improved the performance of the animals. Rotenone also induced non-motor deficits such as olfactory impairment in the pellet test buried after 7 and 21, as well as in the olfactory discrimination test after 21, type-depressive behavior in the sucrose preference test after 14 and 21 days, as well as in working memory in the Y-maze test and aversive memory in the passive avoidance test after the 21st day. Rotenone also significantly delayed gastric emptying of liquids ($p < 0.05$) and induced the loss of dopaminergic neurons in the striatum and substantia nigra, decreased content of dopamine and DOPAC, microgliosis and astrogliosis in the striatum, in addition to causing oxidative stress in the olfactory bulb and midbrain. We conclude that rotenone causes neurodegeneration and motor and non-motor alterations by mechanisms that involve inflammation and oxidative stress in a timeline that can be similar to the disease clinic, thus being a good model of parkinsonism that can be used in the search for new neuroprotective substances as well as in understanding of the pathogenesis of this disease.

Key words: Parkinson's disease. Rotenone. Motor Deficit. Neurodegeneration. Neuroinflammation. Gastrointestinal abnormalities. Hyposmia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Principais achados fisiopatológicos da doença de Parkinson.....	16
Figura 2	– Estrutura química da rotenona.....	22
Figura 3	Mecanismos de toxicidade induzida por rotenona em neurônios dopaminérgicos.	23
Figura 4	– Desenho experimental: Protocolo 1.....	28
Figura 5	– Desenho experimental: Protocolo 2.....	29
Figura 6	– Desenho experimental: Protocolo 3.....	29
Figura 7	– Aparato do campo aberto.....	31
Figura 8	– Animal no movimento de <i>rearings</i>	32
Figura 9	– Aparato do rotarod.....	33
Figura 10	– Animal no aparato da discriminação olfatória.....	34
Figura 11	– Labirinto em Y.....	35
Figura 12	– Aparato utilizado na esquiva passiva.....	36
Figura 13	– Efeito da rotenona sobre o peso dos animais.....	44
Figura 14	– Efeito da rotenona sobre o ganho ponderal dos animais.....	44
Figura 15	Efeito da rotenona sobre a taxa de sobrevivência dos animais.....	45
Figura 16	– Efeito da rotenona a sobre a atividade locomotora horizontal dos animais (Número de <i>crossings</i>) no teste do campo aberto	48
Figura 17	– Efeito da rotenona sobre a atividade locomotora vertical (Número de <i>rearings</i>) no teste do campo aberto.....	48
Figura 18	– Efeito da rotenona sobre a velocidade média dos animais no teste do campo aberto.....	49
Figura 19	– Efeito da rotenona sobre a estabilidade postural dos animais no teste do comportamento de <i>rearing</i>	51
Figura 20	– Efeito da rotenona sobre a coordenação motora dos animais no teste do	51

Rotarod.....	51
Figura 21 – Efeito da apomorfina no déficit de estabilidade postural induzida por rotenona no teste do comportamento de <i>rearing</i>	53
Figura 22 – Efeito da apomorfina no déficit de coordenação motora induzida por rotenona no teste do rotarod.....	53
Figura 23 – Efeito da rotenona sobre a capacidade de discriminação olfatória dos animais após 7 dias de administração de rotenona.....	54
Figura 24 – Efeito da rotenona sobre a capacidade de discriminação olfatória dos animais após 21 dias de administração de rotenona.....	54
Figura 25 – Efeito da rotenona sobre a detecção de cheiros voláteis dos animais no teste do <i>pellet</i> enterrado.....	56
Figura 26 – Efeito da rotenona sobre o % de preferência por sacarose dos animais no teste de preferência por sacarose.....	56
Figura 27 – Efeito da rotenona sobre memória de trabalho dos animais no teste de labirinto em Y.....	58
Figura 28 – Efeito da rotenona sobre memória aversiva dos animais no teste da esQUIVA passiva.....	58
.	
Figura 29 – Efeito agudo da rotenona sobre o esvaziamento de líquidos por meio da técnica de esvaziamento do ¹³ CO ₂	61
Figura 30 – Efeito crônico da rotenona sobre o esvaziamento de líquidos por meio da técnica de esvaziamento do ¹³ CO ₂	62
Figura 31 --Efeito da rotenona (21 dias) sobre a retenção gástrica dos animais no teste do esvaziamento do corante.....	64
Figura 32 --Efeito da rotenona (21 dias) sobre a distribuição do corante nos compartimentos do trato gastrointestinal dos animais no teste do esvaziamento do corante.....	65
Figura 33 --Efeito da rotenona sobre a sobre a imunorreatividade para TH no estriado.	68

Figura 34 --Efeito da rotenona sobre a sobre a imunorreatividade para TH na substância negra.....	69
Figura 35 --Efeito da rotenona sobre a imunorreatividade para iba-1.....	70
Figura 36 --Efeito da rotenona sobre a imunorreatividade para GFAP.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos principais modelos animais de parkinsonismo utilizando toxinas.....	21
Tabela 2 – Efeito da rotenona sobre o a composição corporal dos animais.....	46
Tabela 3 – Avaliação do esvaziamento gástrico de líquidos de ratos expostos à rotenona e veículo pela técnica de esvaziamento de $^{13}\text{CO}_2$ durante o período de administração de rotenona e intervalos. O pico de liberação de $^{13}\text{CO}_2$ (C-máx), o tempo para o pico de esvaziamento de $^{13}\text{CO}_2$ (T-máx) e a quantidade total de $^{13}\text{CO}_2$ liberado (AUC).....	63
Tabela 4 – Efeitos da rotenona sob as concentrações de monoaminas (mg/g tecido) no estriado e bulbo olfatório esquerdo e mesencéfalo dos animais.....	66
Tabela 5 – Efeitos da rotenona sobre a peroxidação lipídica (T-BARS) (μM) e níveis de nitrito/nitrato (μM) no estriado, bulbo olfatório e mesencéfalo dos animais.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ACT	Água corporal total
ANOVA	Análise de Variância (<i>Analys of Variance</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
ASC	Área sob a curva
CTL n ^a	Grupo controle + dias de administração do veículo
DA	Dopamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPAC	Ácido diidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
EPM	Erro Padrão Médio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FE	Fluido extracelular
FI	Fluido intracelular
GC	Gordura corporal
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
i.p	Injeção Intraperitoneal
L-Dopa	Levodopa
MDA	Malondialdeído
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MM	Massa Magra
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidroperdidina
NE	Noradrenalina
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
OMZ	Omeprazol
ROT n ^a	Grupo rotenona + dias de administração de rotenona
SN	Substância Negra

SNpc	Substância Negra <i>pars compacta</i>
TA	Temperatura ambiente
TH	Tirosina Hidroxilase
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrometros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 A Doença de Parkinson.....	14
1.1.1 Epidemiologia.....	14
1.1.2 Fisiopatologia	15
1.1.3 Sintomas motores e não motores	16
1.1.4 Tratamentos para DP	18
1.1.5 Modelos animais da DP.....	19
1.3 A rotenona e o modelo de parkinsonismo.....	20
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Animais.....	28
4.2 Drogas.....	28
4.3 Protocolo experimental.....	28
4.4 Bioimpedância por Espectroscopia (SMITH <i>et al</i> , 2009).....	31
4.5 Testes comportamentais	32
4.5.1 Testes motores.....	32
4.5.1.1 Teste do Campo Aberto (WALSH; CUMMINS, 1976).....	32
4.5.1.2 Teste do comportamento de rearing (FLEMING <i>et al</i> , 2004; CANNON <i>et al</i> , 2009)	33
4.5.1.3 Teste do Rotarod. (PADOVAN-NETO <i>et al</i> 2009.).....	33
4.5.1.4 Teste Desafio da Apomorfina (CANNON <i>et al.</i> , 2016).....	34
4.5.2 Testes Olfatórios	34
4.5.2.1 Teste do Pellet de comida enterrado (ALBERTS <i>et al</i> , 1971).....	35
4.5.2.2 Discriminação olfatória (PREDIGER <i>et al.</i> , 2006; TADAIESKY <i>et al.</i> , 2008).....	35
4.5.3 Testes de Memória.....	36
4.5.3.1 Labirinto em Y (STONE <i>et al.</i> , 1991).....	36
4.5.3.2 Esquiva passiva (DeNOBLE <i>et al.</i> , 1986).....	37
4.5.4 Teste da Preferência por Sacarose (PAPP <i>et al.</i> , 1991; POTHION <i>et al</i> , 2004).....	38
4.6 Avaliação do Esvaziamento gástrico de líquidos (EGL) por esvaziamento do ¹³ CO ₂	38
4.7 Teste do Esvaziamento do corante (SILVA, 2012).	39
4.8 Dosagem de monoaminas e metabólitos por HPLC (AGUIAR, 2006).....	40
4.9 Avaliação do Estresse Oxidativo	40
4.9.1 Determinação da peroxidação lipídica	40
4.9.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato.....	41
4. 10 Análise imunohistoquímicas.....	41
4.10.1 Imunomarcacão para Tirosina Hidroxilase (TH).....	41
4.10.2 Imunomarcacão para iba-1.....	42
4.10.3 Imunomarcacão para GFAP.....	43
4.11 Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	44
4.1 Efeito da rotenona sobre o peso e taxa de sobrevivência.....	44
4.2 Efeito da rotenona sobre a composição corporal.....	45

4.3 Efeitos da rotenona sobre a atividade motora dos animais (teste do campo aberto)	49
4.4 Efeito da rotenona sobre a estabilidade postural dos animais (teste do comportamento de <i>rearing</i>).	52
4.5 Efeito da rotenona sobre a coordenação motora dos animais (teste do rotarod).	52
4.6 Efeito da apomorfina no déficit de estabilidade postural e coordenação motora induzida por rotenona	54
4.7 Efeito da rotenona sobre a capacidade de discriminação de odores no teste da discriminação olfatória	54
4.8 Efeito da rotenona sobre a detecção olfatória de cheiros voláteis dos animais (teste da procura do <i>pellet</i> enterrado).....	57
4.9 Efeito da rotenona sobre comportamento depressivo dos animais (teste de preferência por sacarose).	57
4.10 Efeito da rotenona sobre a memória de trabalho dos animais (Teste do labirinto em Y).	59
4.11 Efeito da rotenona sobre a memória aversiva dos animais (Teste do Esquiva Passiva).	59
4.12 Efeito da rotenona sobre o esvaziamento gástrico dos animais.....	61
4.13 Efeito da rotenona sobre as concentrações de monoaminas no estriado, mesencéfalo e bulbo olfatório	68
4.14 Efeitos da rotenona sobre a imunorreatividade para TH.	69
4.15 Efeitos da rotenona sobre a imunorreatividade para iba-1.	69
4.16 Efeitos da rotenona sobre a imunorreatividade para GFAP	69
4.17 Efeitos da rotenona sobre a peroxidação lipídica (T-BARS) (μ M) e níveis de nitrito/nitrato (μ M) no estriado, bulbo olfatório e mesencéfalo dos animais	74
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez pelo médico inglês James Parkinson em 1817 no ensaio intitulado “An Essay on the Shaking Palsy” (BERRIOS, 2016) onde ele a distinguiu dos demais tremores e a definiu como um “movimento involuntário trêmulo, com força muscular diminuída; com uma propensão de curvatura do tronco para frente” (JOST; REICHMANN, 2017). Contudo, os sinais e sintomas motores da DP como conhecemos hoje só foram descritos em 1880 pelo médico francês Jean-Martin Charcot, que os descreveu como sendo tremor em repouso, rigidez muscular, postura rígida e arqueada (LEES, 2018). Atualmente a DP é definida como uma desordem neurodegenerativa crônica caracterizada pela perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, resultando em diversos sintomas motores e não motores (ELBAZ *et al.*, 2015; VENDEROVA; PARK, 2012).

1.1.1 Epidemiologia

A DP é o segundo transtorno neurológico degenerativo, relacionado à idade, mais comum em humanos, atrás apenas da Doença de Alzheimer (ELBAZ *et al.*, 2015; TYSNES; STORSTEIN, 2017). Segundo a *Parkinson's Foundation* (2017), mais de 10 milhões de pessoas no mundo têm a Doença de Parkinson. As doenças crônicas neurodegenerativas afetam principalmente pessoas idosas, cerca de 1,6% da população mundial acima de 65 anos (FRITSCH *et al.*, 2012), com idade média de aparecimento dos sintomas entre 62 e 70 anos e pico de incidência entre os 70 e 79 anos (MUANGPAISAN *et al.*, 2011) e com o aumento da expectativa de vida observa-se um aumento crescente dessas patologias (DORSEY *et al.*, 2007).

Não existem dados atualizados da epidemiologia da DP no Brasil, no entanto, segundo a Associação Brasil *Parkinson*, ela já ultrapassa 200 mil casos no nosso país (BRASIL, 2006) e atinge 3,3% da população acima de 64 anos (SANTOS, 2015). O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), nos dados do último CENSO, aponta cerca de 220 mil casos de Parkinson já diagnosticados, com 36 mil novos casos surgindo a cada ano, atingindo principalmente homens com mais de 50 anos (IBGE, 2016). Estima-se ainda que o número

de pessoas acometidas com a DP no país dobre em 2030 (DORSEY *et al.*, 2007). Em um estudo mais recente de Bovolenta *et al.* (2016), que considerou a população brasileira acima de 60 anos e o percentual de prevalência destes como sendo portadores da DP, indicado em pesquisas no país, infere que o Brasil possui mais de 630 mil pessoas portadoras da DP .

A DP é uma das doenças neurológicas mais economicamente dispendiosas da velhice (GUMBER, 2019; SPOTTKE *et al.*, 2005) e representa um grande impacto econômico aos cofres públicos. Nos Estados Unidos, o custo anual da DP é estimado em 10,8 bilhões de dólares (CHEN, 2010; WEIR *et al.*, 2018), e na Europa Oriental, os custos anuais são estimados em 0,2 bilhões de euros (WINTER *et al.*, 2010). No Brasil não existem dados atuais dos impactos totais da DP aos cofres públicos, contudo apenas a implementação do novo Protocolo de Tratamento da Doença de Parkinson junto ao Sistema Único de Saúde (SUS) contabilizaram um investimento de R\$ 17,91 milhões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.1.2 Fisiopatologia

A DP é caracterizada pela perda progressiva e irreversível dos neurônios dopaminérgicos mielinizados da região *pars compacta* da substância negra (SNpc), localizada no mesencéfalo, levando a uma grande redução nos níveis de dopamina estriatais (Figura 1) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; GERLACH; RIEDERER, 1996; LEVY; MALAGELADA; GREENE, 2009; MEREDITH *et al.*, 2008; WIRDEFELDT *et al.*, 2011). Observa-se ainda a presença de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas de proteínas não solúveis, como a α -sinucleína e ubiquitina, chamados corpúsculos de Lewy (Figura 1C), principalmente no *locus coeruleus*, gânglios basais, hipotálamo, córtex cerebral, núcleos motores dos nervos cranianos e em componentes centrais e periféricos do sistema nervoso autônomo (BABA *et al.*, 1998; EMBORG *et al.*, 2004; PAL *et al.*, 2011; WIRDEFELDT *et al.*, 2011).

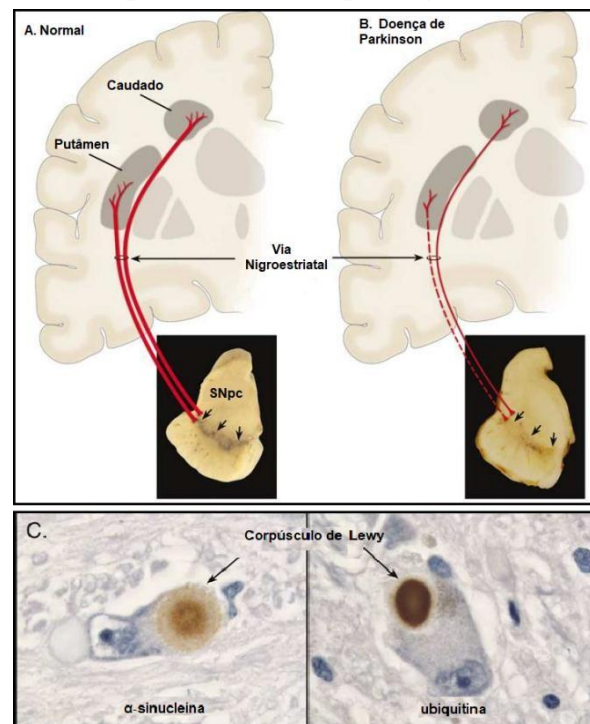
Os sintomas motores da DP manifestam-se após a perda de cerca de 70 a 80 % dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (GREENAMYRE *et al.*, 2011; LEWIS *et al.*, 2011). A DP envolve ainda uma disfunção em múltiplos sistemas monoaminérgicos, como o dopaminérgico, colinérgico, serotoninérgico e noradrenérgico (TEIVE, 2005).

A etiologia da DP ainda é desconhecida, idiopática, porém múltiplos fatores parecem contribuir pra doença, numa complexa associação entre fatores genéticos, ambientais e envelhecimento (ROSS; SMITH, 2007). Aproximadamente 10-15% dos pacientes com DP

possuem histórico familiar desta patologia em parentes de primeiro grau (ELBAZ *et al.*, 2015). Os fatores ambientais estão relacionados principalmente à exposição a pesticidas. Estudos mostram uma grande prevalência da DP em trabalhadores rurais e a relação estreita entre a exposição a esses produtos e aumento do risco de desenvolver DP (WIRDEFELDT *et al.*, 2011).

Acredita-se que a fisiopatologia da DP envolva ainda diversos eventos moleculares e celulares que incluem estresse oxidativo, acúmulo de proteínas alteradas, excitotoxicidade, processo inflamatório, mecanismos pró-apoptóticos e disfunção mitocondrial (NUSSBAUM *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2010; WIRDEFELDT *et al.*, 2011). Mais recentemente também se tem postulado que a DP é uma desordem causada por agregados proteicos semelhante a príons, devido ao comportamento semelhante a príons dos agregados proteicos de α -sinucleína (LEMA TOMÉ *et al.*, 2013; OLANOW; BRUNDIN, 2013). Contudo, as causas da morte neuronal que ocorre na DP ainda não estão completamente elucidadas.

Figura 1. Principais achados fisiopatológicos da Doença de Parkinson.



A e B- Neurodegeneração da via Nigroestriatal na DP. **C-** Presença de corpúsculos de Lewy intracitoplasmáticos. Fonte: adaptado de Dauer; Przedborski, 2003.

1.1.3 Sintomas motores e não motores

A DP envolve sintomas motores progressivos, como tremor de repouso, acinesia,

rigidez muscular, instabilidade, anormalidades posturais e acinesia (LYONS; PAHWA, 2011; OBESO *et al.*, 2017). A rigidez, acinesia e bradicinesia estão associadas a disfunção nigro-estriatal e a consequente perda de dopamina, sendo inicialmente afetados os músculos próximos ao pescoço, seguidos dos músculos da face, membros superiores e inferiores (BAGLIO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2011). As anormalidades posturais e de equilíbrio se devem principalmente à perda dos reflexos posturais. A postura é acometida principalmente em situações em que os pacientes não dedicam atenção plena na manutenção postural (SCHRAG *et al.*, 2015), o que se reflete também na marcha, que passam a ter passos mais curtos e arrastados, com anteriorização da cabeça, flexão dos joelhos e ausência da participação do movimento dos braços (LYONS *et al.*, 2011).

A DP apresenta diversos sintomas não motores, que podem ser explicados pelo comprometimento de outros sistemas monoaminérgicos como serotoninérgicos e noradrenérgicos (SOUZA *et al.*, 2011). De fato, hoje sabe-se que o curso clínico inicia-se com sintomas pré-motores, com o surgimento de sintomas como constipação, hiposmia (diminuição da capacidade olfativa), distúrbios no sono REM (*Rapid Eye Movement*), ansiedade, depressão, fadiga, hipotensão, disfunção sexual, que aparecem cerca de 5 a 10 anos antes dos sintomas motores (SCHRAG *et al.*, 2015). No decorrer da doença são observados ainda diversos outros sintomas como problemas cardiovasculares, problemas de atenção e memória, demência, distúrbios de humor e sialorreia (GUO *et al.*, 2013; OBESO *et al.*, 2017; POSTUMA; BERG, 2019; WOLTERS, 2009), que pioram com a progressão da doença e podem ser mais incapacitantes que os próprios sintomas motores (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006).

Recentemente, o interesse nos sintomas pré-motores tem crescido, uma vez que, como já citado, o surgimento dos sintomas motores, que são o marco atual para o diagnóstico da doença, ocorre quando já há cerca de 70-80% de perda de neurônios dopaminérgicos. Assim, o estudo dos achados pré-motores pode não apenas auxiliar no delineamento fisiopatológico da progressão inicial da DP, mas também na identificação de pessoas em risco eminente do desenvolvimento da doença, pois quanto mais cedo iniciado o tratamento, melhor a responsividade. Além disso, essas pessoas poderão ser elegíveis para ensaios clínicos de estratégias neuroprotetoras, que se mostraram promissoras em ensaios pré-clínicos (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006; CHEN, 2010; GUO *et al.*, 2013).

A hiposmia e anosmia são comumente os primeiros sinais clínicos da DP a surgir, cerca de 20 anos antes do diagnóstico, possui alta prevalência, acometendo 90% de pacientes com Parkinson e tem crescentemente sido usada como um biomarcador clínico da doença

(DALL'ANTONIA; ŠONKA; DUŠEK, 2018; FERESHTEHNEJAD et al., 2019).

Sintomas gastrointestinais com constipação são os sintomas não motores mais comuns da doença de Parkinson, atingindo cerca de 60% dos pacientes e aparecendo cerca de 5 a 10 anos antes do diagnóstico (KLINGELHOEFER; REICHMANN, 2017; LECLAIR-VISONNEAU et al., 2020). Esses sintomas possuem grande papel no curso da doença, parecendo estar envolvida na sua fisiopatologia (SANTOS et al., 2019).

1.1.4 Tratamentos para DP

Atualmente, só existem medicamentos para atenuar os sintomas motores, mas esses não impedem a progressão da doença, permanecendo a contínua perda neuronal. Esses medicamentos atuam aumentando os níveis de dopamina no cérebro ou mimetizando seus efeitos, como a Levodopa, precursor da dopamina, que aumenta os níveis desta, sendo geralmente associada a inibidores da dopa descarboxilase de ação periférica (ex. carbidopa, benserazida), ou drogas que previnem a degradação endógena da dopamina (inibidores da MAO-B, ex. selegilina, rasagilina). Outros fármacos prescritos são inibidores de catecol-O-metil transferase (COMT, ex. tolcapone, entacapone) e agonistas dopaminérgicos (ex. bromocriptina, pramipexol), moduladores do glutamato (ex. amantadina) e antagonistas colinérgicos (ex. benztropina, tri-hexifenidilo, biperideno) (FERRAZ, 1999; LYONS et al., 2011).

O tratamento baseado em reposição de dopamina pode acarretar efeitos adversos, desde flutuações clínicas até discinesia. De fato, a levodopa induz flutuações clínicas, seja pelo encurtamento ou pela inconsistência do efeito da mesma, em cerca de 80% dos pacientes após 5 anos de tratamento, e 40% apresentam um quadro de discinesia após o mesmo período de tratamento, que se caracteriza por picos de movimentos involuntários, sendo muitas vezes mais incapacitantes que a própria DP (CLARKE et al., 2005; KATZENSCHLAGER; LEES, 2002; STOCCHI; TAGLIATI; OLANOW, 2008).

As intervenções cirúrgicas são ainda uma opção para casos avançados da DP e para o tratamento de alguns casos resistentes ao tratamento farmacológico (FARGEL et al., 2007). A Estimulação Cerebral Profunda (*Deep Brain Stimulation, DBS*) consiste na implantação de uma espécie de marca-passo cerebral que gera impulsos elétricos de alta frequência e é, atualmente, a intervenção cirúrgica de primeira escolha pelo fato de ser potencialmente mais segura que as outras opções (BENABID et al., 2009). Contudo as intervenções cirúrgicas são

utilizadas em casos específicos, devido ao alto custo e a limitação de sua eficácia a longo prazo.

Vale ressaltar que o tratamento da DP deve ser multiprofissional, realizado por médicos, fisioterapeutas, psicólogos, fonoaudiólogos e nutricionistas, e individualizado a terapêutica de acordo com as características clínicas do paciente, como idade, progressão da doença, comorbidades, estilo de vida, entre outras (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006; FARGEL *et al.*, 2007).

O uso de agentes neuroprotetores é outra opção de crescente interesse, que têm mostrado bons resultados em estudos pré-clínicos. A maioria desses possuem fortes propriedades antioxidantes (ex. vitamina E, ácido úrico) e/ou anti-inflamatórias (ex. anti-inflamatórios não esteroidais-AINES, minociclina, estatinas) ou são agentes anti-apoptóticos, que vêm se mostrando capazes de barrar a neurodegeneração dopaminérgica (TAVARES, 2015). Contudo, esses agentes ainda requerem testes clínicos.

1.1.5 Modelos animais da DP

Os modelos animais são excelentes ferramentas para o entendimento de doenças. E podem ser classificados em três grupos de acordo com critérios farmacológicos, comportamentais e bioquímicos. A validade preditiva é o nível mais baixo de validade e representa os modelos com isomorfismo farmacológico, contudo a geração de sinais e sintomas não é totalmente relacionado à doença. A validade de face assegura similaridade entre o modelo e doença em relação à sintomas, porém não em relação aos mecanismos fisiopatológicos. Já a validade de constructo é o maior critério de validade em modelos animais e engloba os modelos que cumprem os critérios de face e preditivo e compartilha os mesmos mecanismos fisiopatológicos da doença (DRECHSEL; PATEL, 2008; ELLENBROEK; COOLS, 1988).

Para o estudo da DP, foram desenvolvidos modelos animais utilizando animais geneticamente modificados, com deleções, mutiplicações e outras alterações de genes ligados a proteínas envolvidas na fisiopatologia da DP, como a α -sinucleína, e os que utilizam toxinas que lesam e destroem seletivamente os sistemas catecolaminérgicos. Os modelos desenvolvidos com toxinas mais utilizados nas últimas décadas, incluem a 6-hidroxiopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiperidina (MPTP), paraquat e rotenona, sendo os dois primeiros os mais bem caracterizados. As características dos principais modelos de Parkinsonismo utilizando toxinas estão resumidos na Tabela 1 (ALAM; SCHMIDT, 2002; GREENAMYRE *et al.*, 2011; MEREDITH *et al.*, 2008).

A 6-OHDA é um análogo da dopamina e foi o primeiro modelo de DP empregado, ela não cruza a barreira-hematoencefálica portanto é utilizada através de injeções intracerebrais (GRANDI, 2018). Uma vez no cérebro, a 6-OHDA é transportada pelo transportador de dopamina (DAT) para o interior dos neurônios dopaminérgicos onde inibe o complexo I e IV da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias causando estresse oxidativo, excitotoxicidade glutamatérgica e inflamação, levando a morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos (TITOVA *et al.*, 2017; BLESA, 2018; ZENG; GENG; JIA, 2018). A 6-OHDA produz um modelo com uma lesão robusta e de alta reprodutibilidade, levando ao surgimento de déficits motores, olfatórios, gastrointestinais e na memória não progressivos, contudo essa toxina não reproduz os todos os mecanismos fisiopatológicos da DP, parecendo não afetar outras regiões cerebrais além do estriado e SN, não induz a produção de agregados proteicos e não interage com a α -sinucleína (REZAEI *et al.*, 2019; SALARI; BAGHERI, 2019).

O MPTP é uma toxina que atravessa a barreira-hematoencefálica, podendo ser administrado por vias periféricas, uma vez no cérebro é metabolizado à neurotoxina MPP⁺ pelos astrócitos e transportada ao interior de neurônios dopaminérgicos pelo DAT onde inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons causando déficit energético, estresse oxidativo, excitotoxicidade glutamatérgica e inflamação (GRANDI, 2018; BLESA, 2018; ZENG; GENG; JIA, 2018). O MPTP produz um modelo com degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos em camundongos, não apresentando o mesmo sucesso quando injetado em ratos, levando a déficits motores não progressivos, déficits gastrointestinais e na memória. O MPTP também não interage com a α -sinucleína (SALARI, 2019; ZHANG *et al.*, 2017).

1.3 A rotenona e o modelo de parkinsonismo

A rotenona (Figura 2) é membro dos rotenóides, pertencentes à família dos isoflavonóides, obtida de plantas leguminosas das espécies *Derris elliptica*, *Lonchocarpus nicou*, e *Tephrosia vogelii*. É comumente usada como pesticida em plantações, por possuir pouca fitotoxicidade, bem como veneno para peixes e em várias preparações contra piolhos para uso em humanos e outros animais (VILLAR, 1991; NEHRU *et al.*, 2013). A rotenona é largamente utilizada em alguns países, devido características como: rápida decomposição ao contato com luz e ao ar e não deixar resíduos e/ou metabolitos tóxicos (GABLEHOUSE, 2005; MCCLAY, 2005; ROBERTSON; SMITH-VANIZ, 2008; TEXEIRA, 1996).

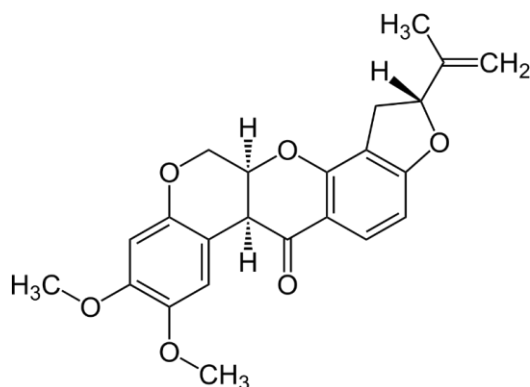
O modelo de DP induzido por rotenona foi proposto por Alam e Schmidt (2002). A rotenona atravessa facilmente a barreira hematoencefálica devido a sua alta lipossolubilidade e se acumula em organelas intracelulares, como as mitocôndrias, onde age como um potente inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, por inibir a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH), levando à morte neuronal (CANNON *et al.*, 2009; GIASSON; LEE, 2016; GREENAMYRE *et al.*, 2011; JOHNSON; BOBROVSKAYA, 2015; MEREDITH *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2017).

Tabela 1. Características dos principais modelos animais de parkinsonismo utilizando toxinas.

TOXINA	TEMPO DE MAIOR PERDA NEURONAL	PERDA DE DA ESTRIATAL	VANTAGENS	DESVANTAGENS	AUTORES
6-OHDA Intranigral	42h	Dose-dependente	- Alta morte neuronal; -Pode mimetizar estágios terminais e iniciais da DP.	-Não Progressiva; -Não apresenta inclusões; -Não mostra patologia extranigral	SALARI (2019)
6-OHDA Intraestriatal	16 semanas	Perda de TH no local da injeção.	-Progressiva.	-Não apresenta inclusões; - Não mostra patologia extranigral	SALARI (2019)
MPTP agudo	24h	Perda de DA do estriado dorsal.	-Inibe o complexo I; -Baixa de TH no estriado.	-Não progressiva; -Não apresenta inclusões.	ZHANG (2017)
MPTP crônica	3 semanas	Baixa de DA do estriado dorsal.	-Inibe o complexo I -Inclusões de α -sinucleína. - Patologia extranigral.	-Rápida morte neuronal. -As inclusões não são semelhantes à corpúsculos de Lewy.	ZHANG (2017)
Paraquat	7 dias	Pouca alteração.	-Baixa de DA	-Resultados inconsistentes de perda de DA; -Não apresenta inclusões; -Não mostra patologia extranigral	BLESSA (2018)
Rotenona	36 dias ou +	Perda de TH no estriado, dose dependente.	-Inibição do complexo I; -Perda progressiva de células dopaminérgicas; -Inclusões de alfa sinucleína; -Va i.p mostra patologia extranigral.	-Grande variação entre os animais; -Variação na resposta motora.	GREENAMYRE (2011) TITOVA (2017)

Fonte: adaptado de MEREDITH *et al*, 2008.

Figura 2 – Estrutura química da rotenona.



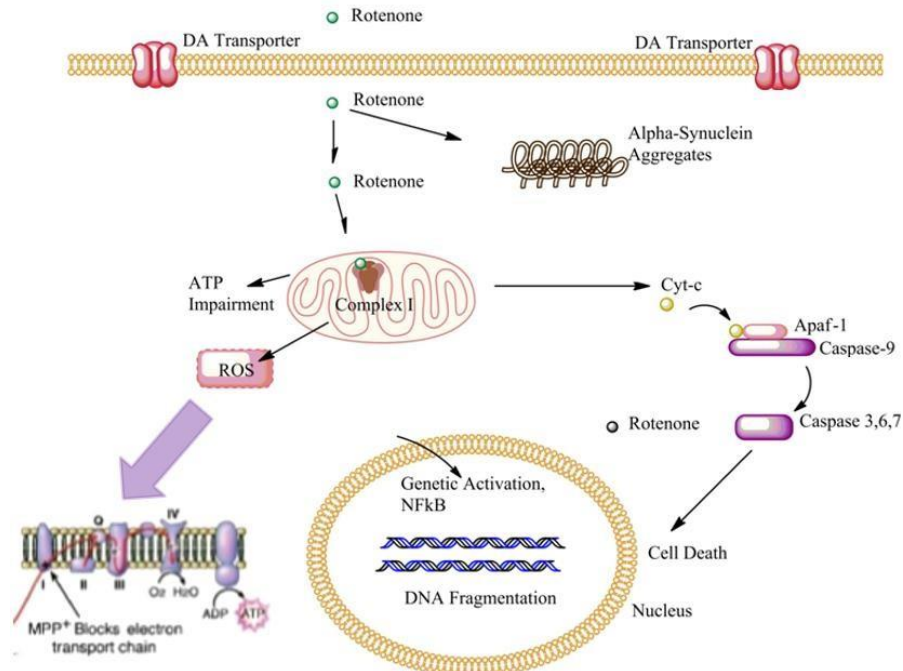
Fonte: (ALMEIDA, 2010)

A inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ocasionada pela exposição a esse pesticida induz uma cascata de eventos relacionada a estresse oxidativo e inflamação. Esse déficit mitocondrial acarreta morte celular por crise bioenergética, prejudicando o armazenamento da dopamina em vesículas, por isso na exposição crônica à rotenona observa-se inicialmente um aumento dos níveis de DA, de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico, formando um quadro de estresse oxidativo e peroxidação lipídica, gerando danos no DNA (DUTY; JENNER, 2011; GREENAMYRE *et al.*, 2011; JOHNSON; BOBROVSKAYA, 2015; LEVY; MALAGELADA; GREENE, 2009; WU; JOHNSON, 2007). A incapacidade da produção de ATP também acarreta a entrada excessiva de cálcio na célula, reação microglial e ativação de astrócitos (BABA *et al.*, 1998; BERNDT; HOLZHÜTTER; BULIK, 2013; JOHNSON; BOBROVSKAYA, 2015; VENDEROVA; PARK, 2012).

A rotenona também parece elevar os níveis de glutamato deixando os neurônios dopaminérgicos mais vulneráveis a excitotoxicidade glutamatérgica (GREENAMYRE *et al.*, 2011; SONIA ANGELINE *et al.*, 2012; WU; JOHNSON, 2007), além do acúmulo de α -sinucleína com formação de corpúsculos de Lewy (BETARBET *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 2015), e acúmulo de tubulina intracelular e ativação de caspases, levando a ativação de mecanismos de apoptose (SARAVANAN; SINDHU; MOHANAKUMAR, 2005; SCHOBER, 2004) (Figura 3). Isso tudo resulta na morte dos neurônios dopaminérgicos na substância negra e estriado (BETARBET *et al.*, 2000) e perda de neurônios noradrenérgicos no *locus coeruleus* (DUTY; JENNER, 2011), resultando nas manifestações clínicas como, alterações

motoras (ALAM; SCHMIDT, 2002; LEWIS *et al.*, 2011), comportamento tipo-depressivo e distúrbios do sono, hiposmia e distúrbios do sono REM. (LIMA, 2012; MORAIS *et al.*, 2012a)

Figura 3- Mecanismos de toxicidade induzida por rotenona em neurônios dopaminérgicos.



Fonte: Adaptado de SHOBER, 2004.

Desse modo, o modelo induzido pela rotenona parece compartilhar os mesmos mecanismos da DP, como degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos, inibição do complexo I mitocondrial e ocorrência de corpúsculos de Lewy. Além disso, cumpre critérios de validade de face e preditiva representando assim um modelo de validade constructo (o maior grau de validação como critério para modelos animais) (ALAM; SCHMIDT, 2002; ELLENBROEK; COOLS, 1988).

Apesar das vantagens experimentais, a rotenona sistêmica ainda não é muito utilizada como modelo de DP pelo fato de ocasionar alta mortalidade dos animais por interferência na fosforilação oxidativa dos órgãos periféricos vitais (SARAVANAN; SINDHU; MOHANAKUMAR, 2005; ZHANG *et al.*, 2017b), e, muitas vezes, apresentar baixa reprodutibilidade. Muitos pesquisadores preferem, assim, a injeção estereotáxica que reduz essa mortalidade, mas contém o viés de não mimetizar a exposição ambiental nem a progressão da doença.

O modelo da rotenona vem sendo utilizado nos grandes centros de pesquisa mundial que estudam a DP, originando inúmeros trabalhos como os de Saravanan e colaboradores

(2005); Wu e Johnson (2007); Cannon e colaboradores (2009); Lima (2012); Sonia e colaboradores (2012) ; Zaminelli (2013); Yuan e colaboradores (2015), entre outros, pois possui a vantagem de englobar sintomas pré-motores e outros sintomas não motores, podendo ser uma alternativa para a busca de novas drogas neuroprotetoras.

Entender a toxicidade induzida pela rotenona por si só é importante, uma vez que ela é largamente utilizada como venenos para peixes fora do país, podendo se depositar em lençóis freáticos levando a bioacumulação podendo se transmitido ao longo da cadeia trófica (RATHORE *et al.*, 2002; ROBERTSON; SMITH-VANIZ, 2008; SMITH; GANGOLLI, 2002) e no Brasil não há acompanhamento ou dados de sua utilização, nem dados homogêneos de intoxicação por pesticidas e uma vez que os agrotóxicos no país são usados em combinações, nem sempre elucidadas, pouco se sabe da utilização da rotenona e seus desdobramentos (DELGADO; PAUMGARTTEN, 2004; FARIA *et al.*, 2004; SIQUEIRA, 2006). De fato, no Brasil o único agrotóxico em tramitação para proibição devido sua associação ao parkinsonismo é o Paraquat. E um estudo com 100 mil pessoas já demonstrou que a exposição a rotenona aumenta a incidência de parkinsonismo em 70% (ROSS; SMITH, 2007). E a aprovação anual de novos agrotóxicos no Brasil tem sido a maior em 15 anos (LEITE, 2020) devido a uma nova legislação, mais permissiva de utilização e liberação de agrotóxicos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2019).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Os dados recentes mostrando um aumento alarmante na incidência da DP no Brasil (36 mil casos surgem por ano no país) e no mundo (acometendo 10 milhões de pessoas) estimulam a procura por novas terapias, não somente que reduzam a perda de neurônios dopaminérgicos, e os consequentes distúrbios motores, como também que vise diminuir as complicações não motoras que podem ser um dos aspectos mais incapacitante da DP. E essa procura por novas substâncias neuroprotetoras tem se mostrado desafiadora no sentido de traduzir resultados positivos de estudos pré-clínicos em clínicos (LANG, 2006). Assim faz-se necessário o aprimoramento de modelos animais que englobem uma sintomatologia mais próxima da clínica da DP e auxiliem a busca de novas substâncias neuroprotetoras, bem como no entendimento da fisiopatologia da doença, uma vez que a etiologia da morte neuronal dopaminérgica na DP continua não totalmente esclarecida, parecendo envolver uma associação entre fatores genéticos, ambientais e envelhecimento. O principal fator ambiental relacionado a ocorrência da DP é a exposição a pesticidas. Estudos mostram uma grande prevalência da DP em trabalhadores rurais e a relação estreita entre a exposição a esses produtos e aumento do risco de desenvolver DP. No Brasil a aprovação anual de novos agrotóxicos tem sido a maior em 15 anos devido a uma nova legislação, mais permissiva de utilização e liberação de agrotóxicos. O modelo de DP induzido pela rotenona é um modelo de critério de constructo, além de sua exposição crônica por injeção poder ser comparada à exposição crônica ambiental à pesticidas. Assim estudar a capacidade da rotenona de induzir sintomas motores e não motores por administração sistêmica, numa linha temporal bem definida, se torna fundamental para a busca de melhores modelos capazes de auxiliar na procura de novas terapias neuroprotetoras, bem como melhor entendimento da DP.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer uma linha temporal do surgimento de alterações motoras e não motoras e os mecanismos envolvidos no modelo de parkinsonismo experimental induzido pela rotenona em ratos.

3.2 Objetivos específicos

No modelo de parkinsonismo experimental induzido por rotenona, estabelecer uma linha temporal das alterações e mecanismos envolvidos, avaliando os seguintes parâmetros:

- Taxa de mortalidade.
- Modificações no peso e composição corporal.
- Alterações do comportamento motor.
- Hiposmia.
- Aprendizado e memória.
- Comportamento do tipo depressivo.
- Modificações no esvaziamento gástrico.
- Dano neuronal:
 - Concentração de monoaminas no mesencéfalo, no corpo estriado e bulbo olfatório.
 - Imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH) no estriado e SN;
 - Ativação glial
 - Estresse oxidativo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos albinos da estirpe Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do biotério central do Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC) e transferidos para o biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais (220-240g) foram mantidos em gaiolas acrílicas micro isoladas, forradas com maravalha (raspa de madeira de pinho), com ciclo claro/escuro de 12/12 h e alimentados com ração peletizada padrão e água *ad libitum*.

No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 54/2017.

4.2 Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: rotenona (Sigma-Aldrich®-USA), dimetilsulfóxido (DMSO), Óleo de Girassol (Cargill Agrícola SA®-BR), apomorfina (Sigma-Aldrich®-USA), Cetamina (König, Argentina) e Xilazina (König, Argentina). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

A rotenona foi preparada diariamente protegida da luz, sendo inicialmente diluída em 100% DMSO e em seguida diluído em óleo de girassol de forma a chegar à solução de 2,75 mg/mL em 98% de óleo de girassol e 2% de DMSO. As suspensões foram passadas no agitador vórtex em cada fase do preparo, como na separação das doses e antes da administração em cada animal.

4.3 Protocolo experimental

Foram utilizados ao todo 88 animais divididos em 2 grupos. O grupo controle (CTL) recebeu veículo (98% de óleo de girassol e 2% de DMSO, 1ml/kg) (n=40) por via intraperitoneal (i.p.) e outro recebeu rotenona (2,75mg/kg, i.p.), (n=48). Ambos os grupos foram tratados semanalmente (segunda-feira a sexta-feira.) por 21 dias. Esse protocolo é uma adaptação do modelo proposto por Cannon e colaboradores (2009), em que a aplicação

intraperitoneal de rotenona por 21 dias consecutivos causa pouca ou nenhuma toxicidade periférica, a adaptação para um modelo com intervalos entre as aplicações visa diminuir a mortalidade gerada pela rotenona.

Concomitante com a administração da rotenona foram realizados os testes motores e não motores nos dias: 0, 3, 7, 14 e 21 após o início da administração da droga, a fim de estabelecer a linha do tempo de ocorrência de tais achados. Para isso, os animais foram divididos em três diferentes protocolos. Os animais submetidos ao protocolo 1 (n = 24) realizaram os testes de campo aberto, pellet enterrado, comportamento de *rearing*, desafio da apomorfina (comportamento de *rearing*), labirinto em Y, desafio de apomorfina, discriminação olfatória e esvaziamento do corante (Figura 4). Os animais submetidos ao protocolo 2 (n = 24) realizaram os testes de rotarod, teste de preferência por sacarose, desafio de apomorfina (rotarod), esquiva passiva e esvaziamento do corante (Figura 5). E os animais submetidos ao protocolo 3 (n = 20) realizaram os testes de bioimpedância por espectroscopia, avaliação do esvaziamento gástrico (EGL) por $^{13}\text{CO}_2$ e teste de esvaziamento do corante (Figura 6).

Vale ressaltar que alguns testes comportamentais, como o teste do comportamento de *rearing*, o teste da discriminação olfatória, labirinto em Y e esquiva passiva, estão sujeitos à adaptação e por isso foram realizados apenas uma vez em cada protocolo experimental e alguns outros testes, que não estão sujeitos a adaptação, foram escolhidos para acompanhar à progressão dos achados motores e não motores. Bem como a avaliação do esvaziamento gástrico (EGL) por $^{13}\text{CO}_2$ foi escolhida para acompanhar a progressão das alterações do esvaziamento gástrico a fim de reduzir o número de animais utilizados.

Figura 4. Desenho experimental: Protocolo 1.

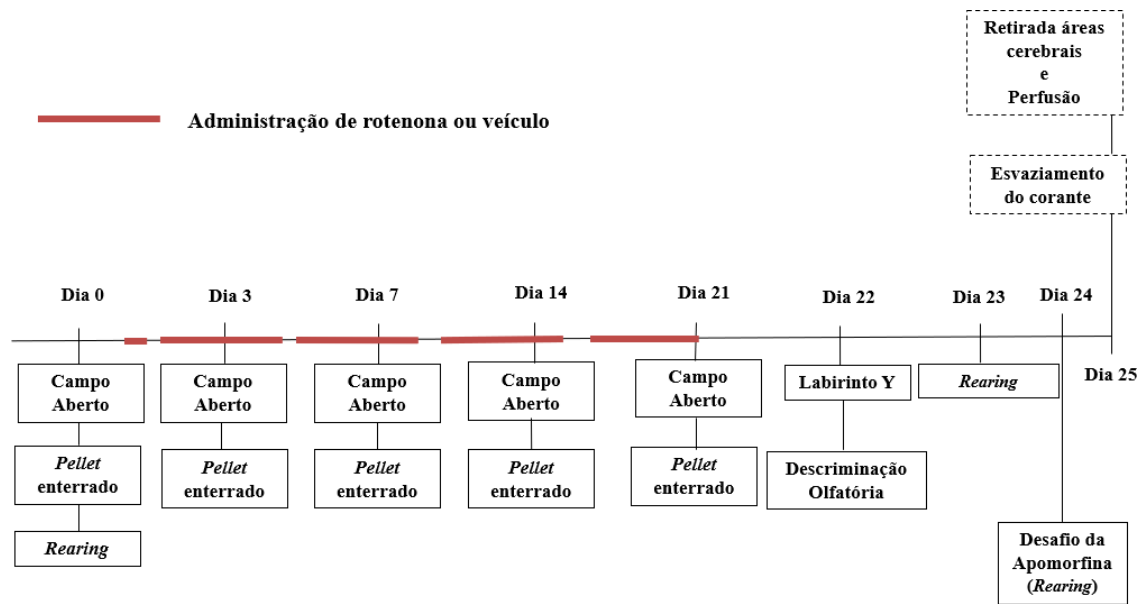


Figura 5. Desenho experimental: Protocolo 2.

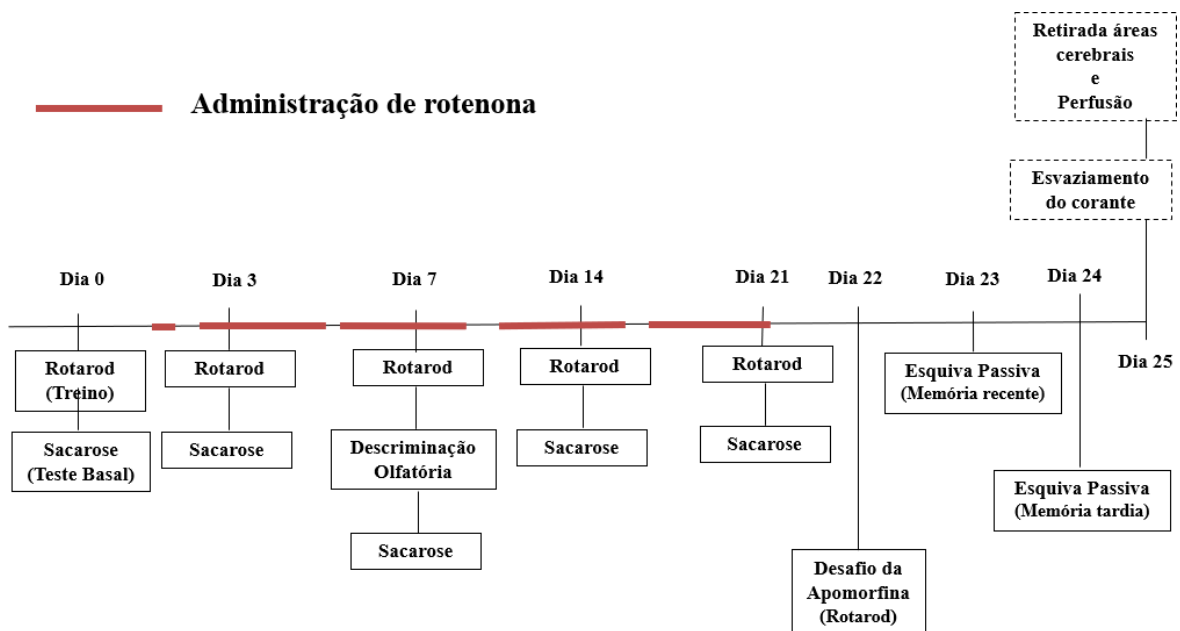
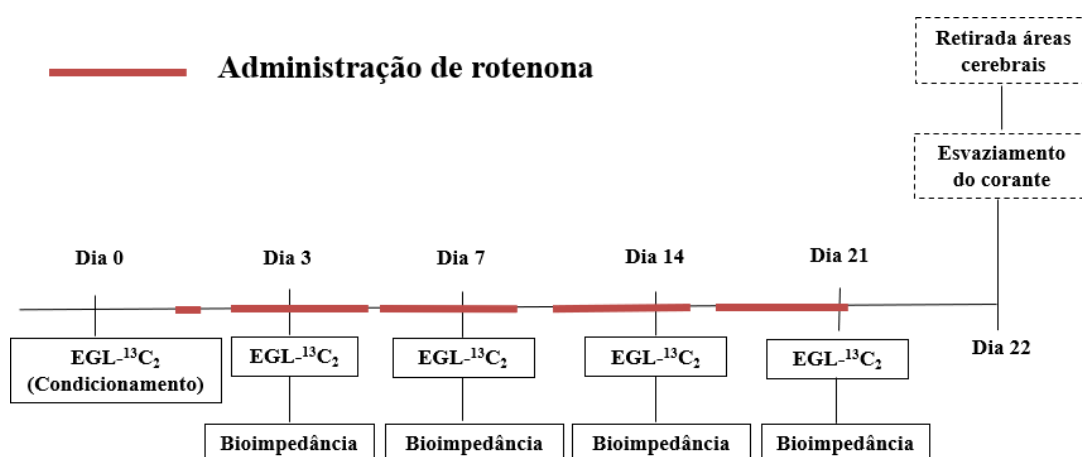


Figura 6. Desenho experimental: Protocolo 3.



Os animais foram observados diariamente quanto à sobrevivência e sinais de debilitação, sendo também acompanhados diariamente o peso e consumo de alimentos. Os animais que apresentaram sinais de debilitação, limitando sua locomoção e alimentação, foram eutanasiados por overdose de anestésico com acompanhamento dos veterinários do biotério. Os que apresentaram boas condições foram submetidos aos protocolos e ao final foram eutanasiados por meio de decapitação para retirada das áreas cerebrais (corpo estriado, mesencéfalo e bulbo olfatório) para dosagem de monoaminas (N=6) e avaliação do estresse oxidativo (N=6). Para as análises imunohistoquímicas (n=4), os animais foram anestesiados com Cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (10mg/ kg) e perfundidos com paraformaldeído a 4% em PBS (tampão fosfato 0,1 M contendo salina 0,9 %, pH 7,4). Os cérebros foram removidos, fixados em formol tamponado a 10% por 24 h e depois crioprotetidos em sacarose a 30% em PBS a 4° C, posteriormente foram feitos os cortes histológicos no criostato (10µm) montado em lâminas silanizadas para análise do dano neuronal (TH, GFAP e iba-1).

4.4 Bioimpedância por Espectroscopia (SMITH *et al*, 2009).

As alterações na composição corporal foram avaliadas pela técnica de espectroscopia de bioimpedância antes da administração da rotenona (dia 0) e após 3, 7, 14 e 21 dias da administração. A espectroscopia de bioimpedância (ImpediVet Vet BIS 1Impedmed®) foi medida pela passagem de uma pequena corrente elétrica pelo organismo para determinar a impedância do fluxo da corrente, que é usada para determinar a água corporal total (ACT) fluido extracelular (FE) e intracelular (FI), massa magra (MM) e gordura corporal (GC) em

ratos (Smith *et al*, 2009). Para isso os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina e alocados em um superfície não condutora, a ponta de quatro agulhas foram inseridas subdermicamente ao longo da linha média dorsal do animal, entre os olhos, anteriormente ao pavilhão auricular, na região sacro-caudal e na linha de pele na base da cauda, as agulhas foram anexadas ao eletrodos e o teste foi realizado conforme descrito anteriormente pelo “*ImpediVet Rodent Measurement Guide*”.

4.5 Testes comportamentais

4.5.1 Testes motores

4.5.1.1 Teste do Campo Aberto (WALSH; CUMMINS, 1976).

A atividade exploratória dos animais foi avaliada através do teste do Campo Aberto no dia anterior ao início do tratamento com rotenona (dia 0) e nos dias 3, 7, 14 e 21 dias após o início da administração de rotenona. O aparato consiste em uma arena quadrada de acrílico preto com piso da arena dividido em nove quadrantes iguais (Figura 7). No teste, os animais são colocados na arena e deixados para explorar o ambiente por 5 (cinco) minutos, onde durante este período, o desempenho dos animais, quanto a exploração horizontal (*crossings*) e vertical (*rearings*) e velocidade média, foi medido pelo software ANY-maze (© Stoelting Co., Wood Dale). O teste foi conduzido sob luz vermelha e após cada animal ser retirado, a arena foi limpa com uma solução de álcool a 20%, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferissem no teste.

Figura 7: Aparato do campo aberto



Fonte: Adaptado de Commat LTDA.

4.5.1.2 Teste do comportamento de rearing (FLEMING et al, 2004; CANNON et al, 2009).

A fim de verificar a estabilidade postural dos animais, seu comportamento de *rearing* foi avaliado, ao início da indução do modelo (dia 0) e após 21 dias do início da administração de rotenona. Os animais foram colocados em um cilindro de acrílico (60 cm de altura e 18 cm de diâmetro) e durante 5 min o número de *rearings* foi quantificado. Para ser considerado como *rearing*, o animal tinha que erguer as patas acima do nível dos ombros e fazer contato com a parede do cilindro, com uma ou ambas as patas (Figura 8). Um novo *rearing* só foi contabilizado após o animal remover ambas as patas da parede do cilindro e fazer novo contato com a superfície do mesmo. O teste foi conduzido sob baixa luz vermelha e o cilindro foi limpo com uma solução de álcool a 20%, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferisse no teste.

Figura 8: Animal no movimento de rearing.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.5.1.3 Teste do Rotarod. (PADOVAN-NETO et al 2009.).

A fim de avaliar a coordenação motora e alterações de equilíbrio dos animais foi realizado o teste do rotarod. O aparato do rotarod consiste em uma haste de 30cm de diâmetro dividida em quatro compartimentos de 5cm de largura e 20cm de altura (Figura 9). Os animais foram treinados antes do início do tratamento em duas sessões de 5min, com intervalo de 10 min entre cada sessão, em condição de aceleração de 4 a 40 rpm. O teste realizado no dia 0 (antes da administração de rotenona) e 3, 7, 14 e 21 dias após o início da indução do modelo para avaliação da progressão das alterações motoras. No teste, foi

permitido ao animal se mover no aparato, em condição de velocidade constante de 20 rpm, sendo o tempo para queda registrado, com tempo de permanência máxima de 120s. O teste foi conduzido sob luz vermelha e o aparato foi limpo com uma solução de álcool a 20%, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferisse no teste.

Figura 9: Aparato do Rotarod.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.5.1.4 Teste Desafio da Apomorfina (CANNON et al., 2016).

Para determinar se os déficits motores observados são dependentes de dopamina, os animais foram submetidos ao desafio da apomorfina após 21 dias de administração da rotenona. Os animais receberam o agonista da dopamina, apomorfina, 0,6 mg/kg por via intraperitoneal, sendo então repetidos os testes do comportamento de *rearing* e rotarod. Se os déficits forem dopamina-dependentes, espera-se observar a reversão temporária desses, ou seja, um aumento de número de *rearing*s no teste do comportamento de *rearing* e um maior tempo de latência para queda no rotarod. O teste do cilindro foi realizado 10 min após administração da apomorfina e o teste do rotarod foi realizado 20 min após a administração de apomorfina.

4.5.2 Testes Olfatórios

4.5.2.1 *Teste do Pellet de comida enterrado (ALBERTS et al, 1971).*

A progressão das modificações da capacidade de detecção olfatória de cheiros voláteis dos animais foi avaliada por sua habilidade de localizar um *pellet* de comida (o *pellet* normalmente utilizado na sua alimentação) enterrado na maravalha da gaiola do animal. Anteriormente ao teste os animais foram mantidos em jejum por 16 horas, com livre acesso a água. O teste consistiu em enterrar um *pellet* de comida numa gaiola limpa previamente preparada com 3 cm de maravalha, onde os animais foram então alocados exatamente acima do local onde o *pellet* estava enterrado. Foi então mensurado o tempo, em segundos, entre a introdução do animal na gaiola e este tocar o *pellet* de comida com as duas patas dianteiras, com a máxima de permanência de 300 segundos. O teste foi conduzido sob luz vermelha baixa e em uma gaiola limpa, com maravalha nova para cada animal. A cada repetição do teste (nos dias 0, 3, 7, 14, 21 dias após o início da administração da rotenona) o local do pellet foi trocado, a fim de evitar acomodação ao teste.

4.5.2.2 *Discriminação olfatória (PREDIGER et al., 2006; TADAIESKY et al., 2008).*

A capacidade dos animais de discriminar cheiros foi avaliada pelo teste de discriminação olfatória após 7 e 21 dias de administração de rotenona. Em geral, ratos adultos saudáveis são capazes de discriminar entre os dois compartimentos, tendo preferência pelo compartimento familiar, impregnado com o seu próprio odor em relação ao local com odor neutro (LEE; LINSTER; DEVORE, 2015). O teste consistiu em, após manter os animais em gaiolas com a mesma maravalha por uma semana, coloca-los durante 5 min em uma caixa dividida em dois compartimentos idênticos, separados por uma porta aberta, de forma que pudessem escolher entre um compartimento contendo a maravalha retirada da caixa previamente ocupada por ele (compartimento familiar) e outro contendo maravalha nova (compartimento não familiar) (Figura 10). Cada animal é colocado inicialmente no compartimento familiar próximo à porta e o tempo gasto pelo rato em cada compartimento (familiar e não familiar) é registrado.

Figura 10: Animal no aparato da Discriminação Olfatória.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.5.3 Testes de Memória

4.5.3.1 Labirinto em Y (STONE et al., 1991).

Esse teste objetiva avaliar a memória operacional e o aprendizado e foi realizado após 21 dias de administração de rotenona. O labirinto em forma de Y consiste em uma caixa de acrílico com os três braços iguais de 63 cm (Figura 11). Neste teste, o animal é colocado em um braço e pode alternar espontaneamente as entradas nos outros braços durante 8 (oito) minutos. O número total de entradas em cada braço, bem como a sequência de entradas, foi registrado.

As informações foram então analisadas para determinar o número de entradas nos braços sem repetição por meio de porcentagem de alternância entre eles. O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último. O resultado foi expresso em porcentagem e obtido através de uma fórmula matemática: Alternações espontâneas = $(\text{Número de acertos} / \text{Número total de entradas} - 2) \times 100$.

Figura 11: Labirinto em Y

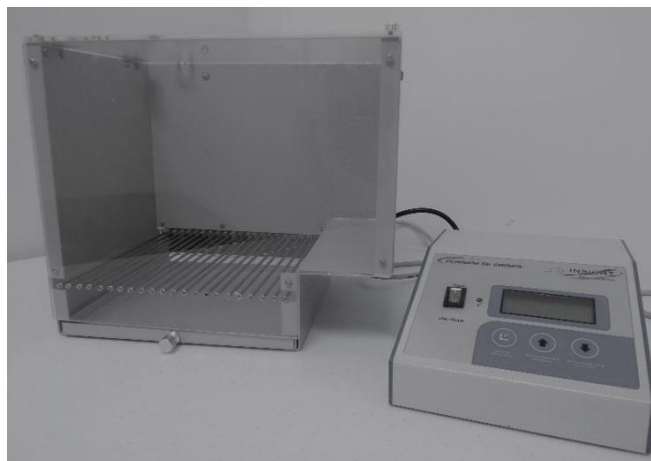


Fonte: *Maze Engineers and Noldus*

4.5.3.2 *Esquiva passiva (DeNOBLE et al., 1986).*

Esse teste tem como objetivo avaliar a memória aversiva, utilizando-se um aparelho de esquiva passiva (Insight® EP 104MR). O aparelho consiste em uma caixa de alumínio que possui uma plataforma e um piso gradeado eletrificado (Figura 12). Os animais são deixados para ambientação no aparelho durante um 1 (um) minuto, e retirado. Após 30 (trinta) segundos o animal é novamente colocado na plataforma e ao descer para explorar a área gradeada prontamente recebe um choque de 1,0mA, durante 1s, com o tempo de latência para descida sendo registrado, até um máximo de 300 (trezentos) segundos (treino). O animal é então retirado e após 15 (quinze) minutos (memória recente), é colocado novamente na plataforma, com a latência de descida sendo registrada, com o máximo de 300 (trezentos) segundos. A retenção do aprendizado é testada após 24 (vinte e quatro) horas, sem utilização de choques, onde os animais são colocados novamente na plataforma e o tempo de latência para a descida da plataforma é registrada (memória tardia).

Figura 12: Aparato utilizado na esquiva passiva.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.5.4 Teste da Preferência por Sacarose (PAPP et al., 1991; POTHION et al, 2004).

O teste da preferência por sacarose é utilizado como uma medida de anedonia em roedores, já que quadros depressivos tendem a diminuir a preferência pelo consumo de sacarose. Anteriormente ao início da administração da rotenona, o conteúdo de uma das garrafas dos animais foi substituído por solução de sacarose a 2%, compreendendo uma fase de habituação de 24 horas. Após este período, os animais foram separados, e duas garrafas, um contendo uma solução de sacarose 2% e outra contendo água lhes foram disponibilizadas. As garrafas foram então pesadas antes de serem apresentadas aos ratos e 24 horas depois. O percentual de consumo de sacarose foi calculado usando a equação: % de preferência por sacarose = ingestão de sacarose \times 100 / ingestão total. O consumo total foi definido como a soma do consumo de água e consumo de sacarose. Os animais passaram por um teste basal, permanecendo no experimento apenas os ratos que apresentaram uma preferência por sacarose superior a 60%. O teste foi repetido nos dias 0 e 3, 7, 14 e 21 dias após o início da indução do modelo. As garrafas foram trocadas de lado a cada repetição do teste a fim de evitar acomodação.

4.6 Avaliação do Esvaziamento gástrico de líquidos (EGL) por esvaziamento do $^{13}\text{CO}_2$.

Métodos alternativos de avaliação do esvaziamento gástrico usando isótopos estáveis têm sido empregados em humanos a fim evitar exposição a materiais radioativos, e em animais para reduzir a mortalidade e garantir a segurança dos pesquisadores, e se baseiam na ingestão de um substrato com marcador que é rapidamente absorvido no intestino delgado

seguindo para o fígado pelo sistema porta, sendo excretado pelos pulmões na respiração. Assim, a avaliação do esvaziamento gástrico de líquidos foi realizada através da técnica de esvaziamento do $^{13}\text{CO}_2$. Para isso os animais foram, previamente ao início do protocolo, condicionados a permanecerem nas câmaras de vácuo em 4 sessões de 30 minutos. Para a realização do teste dos animais foram mantidos em jejum prévio de sólidos por 12 horas. O teste consistiu na administração via gavagem de solução achocolatada (2,5mL/kg) adicionada com acetado de sódio-13 (16mg/kg) e coleta de ar foi realizada nos 90 minutos seguintes a administração através uma bomba de vácuo. A concentração do isótopo $^{13}\text{C}_2$ foi analisada (ppm) através de espectroscopia de gases (Wagner analysen technik GmbH/software IRIS®), permitindo a observação do perfil de esvaziamento e o cálculo da área sob a curva (AUC), o pico máximo de liberação $^{13}\text{CO}_2$ (T-máx) e a concentração máxima de liberação de $^{13}\text{CO}_2$ (C-máx). O teste foi realizado após o 3^a, 7^a, 14^a e 21^a dias de administração de rotenona a fim de avaliar o efeito agudo e durante os intervalos de administração (logo após a pausa do fim de semana), a fim de avaliar os efeitos crônicos da administração da rotenona.

4.7 Teste do Esvaziamento do corante (SILVA, 2012).

A avaliação da retenção gástrica foi realizada pela técnica de diluição de corante em parceria com o Laboratório Luís Capelo de Fisiologia Gastrointestinal do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais foram submetidos a jejum prévio de 16 horas, com livre acesso a água. Estes receberam então, por via orogástrica, a refeição teste (solução glicosada a 5% contendo vermelho fenol, 0,75mg/ml). Após um período pós-prandial de 10, 15 e 20 minutos, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação. Logo após, foi realizada uma laparotomia mediana seguida de ligaduras obstrutivas do piloro e da cárdia, permitindo a retirada do estômago e intestino, que foram estendidos sobre uma prancha. O intestino delgado foi então dividido em três segmentos: proximal, medial e distal. O estômago e cada seguimento tiveram seus volumes medidos. Após a medição dos volumes, os tecidos foram homogeneizados, centrifugados e submetidos a análise colorimétrica para a determinação da massa de vermelho fenol existente em cada seguimento. A retenção do vermelho fenol em cada seguimento foi calculada pela equação: retenção seguimento $X = (\text{volume da víscera} + 100) \times \text{absorbância da víscera}$. A fim de verificar a influência de alteração do pH estomacal um novo teste foi realizado após administração de 50mg/kg de omeprazol trinta (30) min antes da administração do vermelho fenol.

4.8 Dosagem de monoaminas e metabólitos por HPLC (AGUIAR, 2006).

O hemisfério direito do corpo estriado, mesencéfalo e bulbo olfatório foram utilizados para preparar homogenatos a 10%. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido pérclorico (HClO₄) por 30 segundos e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15000 rpm. O sobrenadante foi então separado e filtrado através de uma membrana (Millipore-0,2µm) e uma alíquota de 20µl foi retirada e injetada no equipamento de HPLC para a análise eletroquímica. Para a análise, uma coluna CLC-ODS (M) com comprimento de 25cm, calibre 4,6mm e diâmetro da partícula de 3µm da (Shimadzu, Japão) foi utilizada. A fase móvel foi composta por tampão ácido cítrico 0,163M, pH 3,0, contendo ácido octasulfônico sódico, 0,69M (SOS), como reagente formados do par iônico, acetonitrila 4% v/v. Dopamina (DA), ácido diidroxifenilacético (DOPAC), noradrenalina (NE) e serotonina (5-HT) foram eletricamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD52 6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl. A partir da área dos picos das soluções com concentrações padrões de DA DOPAC, NE, as concentrações das amostras foram calculadas e os resultados expressos em mg/g de tecido.

4.9 Avaliação do Estresse Oxidativo

4.9.1 Determinação da peroxidação lipídica.

O estresse oxidativo foi realizado pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) um indicador de peroxidação lipídica. No dia do ensaio, 60 µL do homogenato (10% em tampão fosfato) do hemisfério direito do bulbo olfatório, estriado e mesencéfalo foram centrifugados a 1200 rotações por minuto (rpm) 4°C por 30 minutos. Após a centrifugação, 100 µL de ácido perclórico a 35% foi adicionado para interromper a peroxidação e, centrifugado novamente a 5000 rpm 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e a este foi adicionado 50µl de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Posteriormente, foi levado ao banho de água por 30 minutos a uma temperatura variável de 95-100°C. A solução foi retirada e colocada para esfriar a temperatura ambiente. Após, foi feita a leitura de 150 µL da solução em 535 nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de malonaldeído (MDA) padrão e os resultados foram expressos em concentração (µM).

4.9.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato.

Nesse ensaio o reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água bidestilada, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%) foi usado para relevar a presença de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorvância em 540 nm.

Para realização do ensaio, os homogenatos (10% em tampão fosfato) de bulbo olfatório, estriado e mesencéfalo foram centrifugados a 12000 rpm por 15 min a 4°C e 100 μL de cada sobrenadante foi adicionado a 100 μL do reagente de Griess. Para o branco, foi utilizado 100 μL do tampão fosfato e 100 μL reagente de Griess. Após 10 minutos, foi feita a leitura das absorvâncias em 540nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de nitrito padrão e os resultados foram expressos em concentração (μM). As leituras da absorvância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x), então foi feita a determinação da equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de nitrito em cada amostra.

4. 10 Análise imunohistoquímicas

4.10.1 Imunomarcacão para Tirosina Hidroxilase (TH).

A tirosina hidroxilase (TH) é uma enzima envolvida na síntese de dopamina e um marcador molecular de neurônios dopaminérgicos. A marcação para TH foi realizada em fatias (10 μm de espessura e espaçamento de 50 μm) representativas do estriado e substância negra.

As fatias foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS, sendo o bloqueio da peroxidase endógena feito com H_2O_2 1,05% em metanol 10% em PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente (TA). Após lavar 3 vezes por 5 minutos em PBS e bloquear as proteínas endógenas com uma solução bloqueadora (10% de soro de cavalo e 1% de Triton X-100 em PBS) por 2 horas a TA. Após as fatias foram incubadas no anticorpo primário anti-TH diluído na solução bloqueadora (*rabbit*, 1:200; Sigma-Aldrich) *overnight* a 4°C.

As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS, sendo em seguida incubadas com polímero marcado com HRP conjugado com anticorpos *anti-mouse* e *anti-rabbit* (*Dako EnVision + Dual Link System-HRP*, Dako) por 30 minutos a TA, e lavados novamente 3

vezes por 5 minutos com PBS. A marcação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (*DAB Peroxidase Substrate Kit*; Dako). A reação foi interrompida, lavando-se as fatias em água destilada. Por fim, após secagem, as lâminas foram mergulhadas em xilol e montadas com *entellan* (Merck, Alemanha).

Para a quantificação da imunorreatividade para TH As lâminas foram visualizadas em um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 40x. Foram selecionadas 3 fatias de cada animal e três áreas em cada fatia para o estriado e quatro áreas para o mesencéfalo, aleatoriamente, e a quantificação semi-quantitativa da densidade óptica foi realizada em todas as imagens utilizando o software *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA) . A densidade óptica final de cada imagem foi dada pela densidade do branco subtraído da densidade da imagem total. Foi calculada a média dos 3 valores por animal, e foi calculada a média dos valores obtidos para o grupo controle, e os demais valores foram calculados como porcentagem desse valor.

4.10.2 Imunomarcacão para iba-1.

As micróglia são células imunocompetentes do cérebro. Para a verificação da presença e ativação destas células (microgliose) foi empregado o marcador de micróglia iba-1. A marcação para iba-1 foi realizada em fatias (10 µm de espessura e espaçamento de 50 µm) representativas do estriado.

As fatias foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS, sendo o bloqueio da peroxidase endógena feito com H₂O₂ 1,05% em metanol 10% em PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente (TA). Após lavar 3 vezes por 5 minutos em PBS e bloquear as proteínas endógenas com uma solução bloqueadora (10% de soro de cavalo e 1% de Triton X-100 em PBS) por 2 horas a TA. Após as fatias foram incubadas no anticorpo primário anti-iba-1 diluído na solução bloqueadora (*rabbit polyclonal*, 1:300; WAKO, Japão) *overnight* a 4°C.

As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS, sendo em seguida incubadas com polímero marcado com HRP conjugado com anticorpos *anti-mouse* e *anti-rabbit* (*Dako EnVision + Dual Link System-HRP*, Dako) por 30 minutos horas a TA, e lavados novamente 3 vezes por 5 minutos com PBS. A marcação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (*DAB Peroxidase Substrate Kit*; Dako). A reação foi interrompida, lavando-se as lâminas em água destilada. Por fim, após secagem, as lâminas foram mergulhadas em xilol e montadas com *entellan* (Merck, Alemanha).

Para a quantificação da imunorreatividade para iba-1 As lâminas foram visualizadas em

um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 100x. Foram selecionadas 3 fatias de cada animal e três áreas em cada fatia, aleatoriamente, e a quantificação semi-quantitativa da densidade óptica foi realizada em todas as imagens utilizando o software *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA) . A densidade óptica final de cada imagem foi dada pela densidade do branco subtraído da densidade da imagem total. Foi calculada a média dos 3 valores por animal, e foi calculada a média dos valores obtidos para o grupo controle, e os demais valores foram calculados como percentagem desse valor.

4.10.3 Imunomarcacão para GFAP.

A avaliação da astrogliose foi feita pela imunomarcacão com o anticorpo para GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*). A marcação para GFAP foi realizada em fatias (10 µm de espessura e espaçamento de 50 µm) representativas do estriado.

As fatias foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS, sendo o bloqueio da peroxidase endógena feito com H₂O₂ 1,05% em metanol 10% em PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente (TA). Após lavar 3 vezes por 5 minutos em PBS e bloquear as proteínas endógenas com uma solução bloqueadora (10% de soro de cavalo e 1% de Triton X-100 em PBS) por 2 horas a TA. Após as fatias foram incubadas no anticorpo primário anti-GFAP diluído na solução bloqueadora (*goat*, 1:200; Sigma-Aldrich) *overnight* a 4°C.

As fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS, sendo em seguida incubadas com um anticorpo secundário diluído na solução de bloqueio (*rabbit anti-goat IgG*, 1:200; Sigma-Aldrich) por 2 horas a TA, e lavados novamente 3 vezes por 5 minutos com PBS. O método avidina-biotina (ABC) (Vector Labs) foi utilizado por 30 minutos a TA para a amplificação do sinal. A marcação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (*DAB Peroxidase Substrate Kit*; Dako). A reação foi interrompida, lavando-se as lâminas em água destilada. Por fim, após secagem, as lâminas foram mergulhadas em xilol e montadas com *entellan* (Merck, Alemanha).

Para a quantificação da imunorreatividade para GFAP, As lâminas foram visualizadas em um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 100x. Foram selecionadas 3 fatias de cada animal e três áreas em cada fatia, aleatoriamente, e a quantificação semi-quantitativa da densidade óptica foi realizada em todas as imagens utilizando o software *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA) . A densidade óptica final de cada imagem foi dada pela densidade do branco subtraído da densidade da imagem total. Foi calculada a média dos 3 valores por animal, e foi calculada a média dos valores obtidos para o grupo controle, e os demais valores

foram calculados como percentagem desse valor.

4.11 Análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas pelo Software GraphPad Prism 6.01. Para a análise estatística foi inicialmente realizado o teste de normalidade Shapiro Wilk para verificar se os dados apresentavam distribuição normal a fim de determinar o uso de testes paramétricos ou não paramétricos.

Para a comparação entre os grupos, os testes que apresentaram resultados paramétricos foram analisados através do Test t de Student, já os dados não paramétricos foram analisados utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Para a análise dentro dos grupos (pareadas), foi utilizado o teste de ANOVA de uma via para medidas repetidas e teste de Tukey como post-hoc para os resultados paramétricos, e para os não paramétricos foi realizado o Teste de Friedman e Teste de Dunn como post-hoc. Para a análise da curva de sobrevivência foi realizado o teste de Kaplan-Meier. E para análise dos pesos foi usado ANOVA de duas vias e teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), exceto para a construção da curva de sobrevivência, que estão expressos em percentual. Em todos os testes o critério de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da rotenona sobre o peso e taxa de sobrevivência.

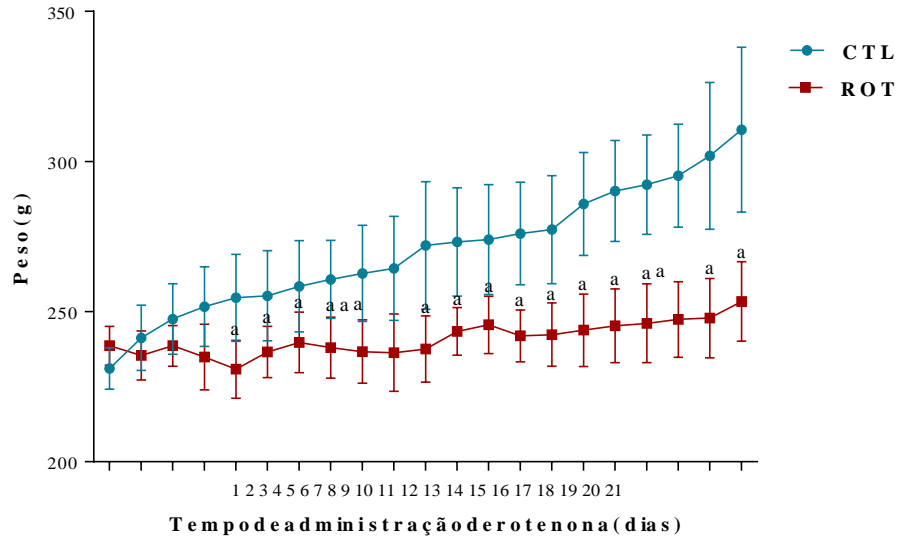
A rotenona induziu uma diminuição significativa no ganho de peso diário do 5º dia ao 21º de administração, em comparação aos animais controle (CTL 5: $254,6 \pm 4,588g$, ROT 5: $230,8 \pm 2,784g$; CTL 21: $310,6 \pm 8,682g$, ROT 21: $253,6 \pm 3,816g$, $p < 0,05$.) (Figura 13), e o ganho ponderal de peso dos animais expostos à rotenona ao final do protocolo foi significativamente menor que dos animais controle (CTL: $79,5 \pm 8,6g$, ROT: $14,8 \pm 3,8g$, $p < 0,05$.) (Figura 14). A administração de rotenona diminuiu a taxa de sobrevivência dos animais para 82,14% ($p < 0,05$), essa redução engloba tanto os animais que morreram decorrente a provável intoxicação pela droga e quanto aos animais que foram eutanasiados por apresentar fenótipo muito debilitante (bradicinesia, rigidez, instabilidade postural e de

marcha) que limitassem sua locomoção e alimentação (Figura 15).

4.2 Efeito da rotenona sobre a composição corporal.

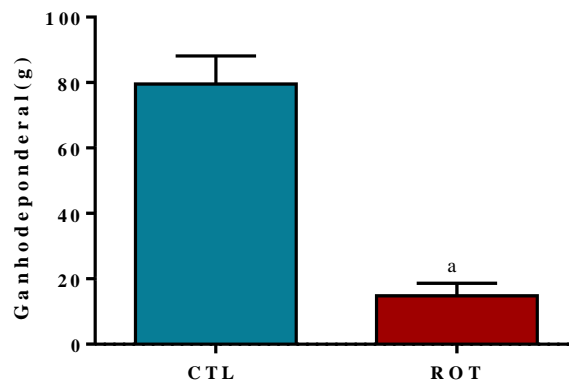
A avaliação da bioimpedância mostrou que a diferença no ganho de peso presente dos animais expostos à rotenona envolve perda de massa de magra (CTL 3-MM: $175,5 \pm 4,417\text{g}$; ROT 3-MM: $158,3 \pm 5,658\text{g}$; CTL 7-MM: $181,9 \pm 4,474\text{g}$; ROT 7-MM: $163,8 \pm 7,259\text{g}$, $p < 0,05$) e desidratação (CTL 3-ACT: $128,4 \pm 3,233\text{ml}$; ROT 3-ACT: $115,9 \pm 4,142\text{ml}$; CTL 7-ACT: $133,1 \pm 3,264\text{ml}$; ROT 7-ACT: $119,9 \pm 5,3\text{ml}$, $p < 0,05$) após 3 e 7 dias de administração de rotenona quando comparado aos controles, e essa desidratação está relacionada principalmente a perda de água extracelular. Também foi observada a perda de gordura corporal após 7 e 14 dias (CTL 7-GC: $85,3 \pm 4,361\text{g}$; ROT 7-GC: $72,6 \pm 3,100\text{g}$; CTL 14-GC: $82,1 \pm 4,666\text{g}$; ROT 14-GC: $67,4 \pm 4,126\text{g}$, $p < 0,05$) (Tabela 2).

Figura 13- Efeito da rotenona sobre o ganho de peso diário dos animais.



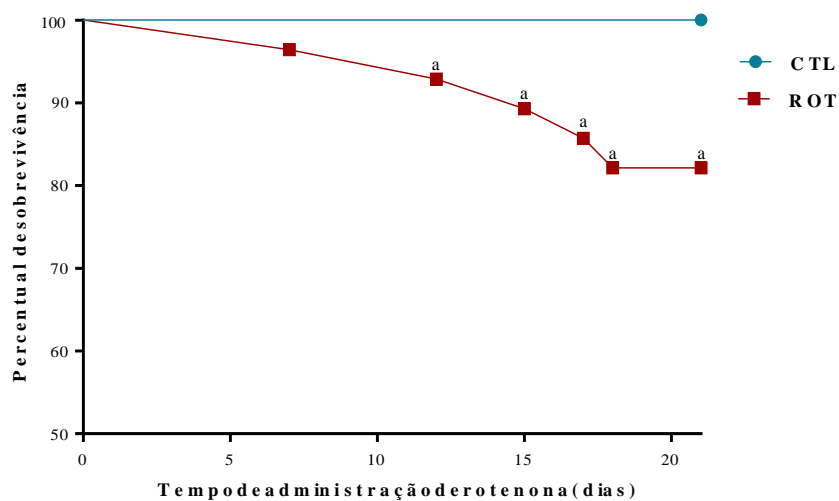
Os animais tiveram seus pesos medidos diariamente. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL do respectivo dia, $p < 0,05$. ANOVA de duas vias e teste de Bonferroni.

Figura 14- Efeito da rotenona sobre o ganho ponderal dos animais.



Os animais tiveram seus pesos medidos diariamente, ao final de 21 dias o peso de cada animal foi subtraído do peso inicial para obtenção do ganho ponderal (g). Os valores estão representados como média \pm EPM, $n=10-14$. **a** vs. CTL, $p < 0,05$. Teste t de Student.

Figura 15- Efeito da rotenona sobre a taxa de sobrevivência dos animais.



Os animais foram acompanhados diariamente quanto a sobrevivência, e os animais que apresentavam fenótipo debilitante foram eutanasiados. Os valores estão representados como percentual. a vs. CTL no respectivo dia, $p < 0,05$, teste de Kaplan-Meier.

Tabela 2- Efeito da rotenona sobre o a composição corporal dos animais.

	CTL				ROT			
	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 21
MM	175,5 ± 4,417g	181,9 ± 4,474g	192,4 ± 6,739g	198,5 ± 8,828g	158,3 ± 5,658g ^a	163,8 ± 7,259g ^b	173,6 ± 7,250g	183,9 ± 9,314g
GC	82,2 ± 4,702g	81,8 ± 4,039g	82,07 ± 4,666g	100,5 ± 4,882g	76,8 ± 3,328g	68,9 ± 4,216g ^c	67,4 ± 4,126g ^d	86,5 ± 5,250g
ACT	128,4 ± 3,233ml	133,1 ± 3,264ml	140,9 ± 4,911ml	145,3 ± 6,462	115,9 ± 4,142ml ^e	119,9 ± 5,314ml ^f	127,1 ± 5,307ml	134,6 ± 6,818ml
FE	56,6 ± 1,497ml	60,3 ± 1,541ml	62,9 ± 2,096ml	66,4 ± 2,439ml	52,5 ± 1,186ml ^g	54,0 ± 1,904ml ^h	55,9 ± 2,150ml ⁱ	59,7 ± 2,230ml
FI	71,8 ± 1,916ml	72,85 ± 1,819ml	77,9 ± 2,901ml	78,9 ± 4,289ml	63,4 ± 3,241ml ^j	65,9 ± 3,763ml	71,0 ± 3,374ml	74,9 ± 4,899ml

O teste de bioimpedância por espectroscopia foi realizado após 3, 7, 14 e 21 dias de administração a fim de acompanhar as alterações na composição corporal, n =10. Os valores estão representados como média ± EPM. **a** vs. CTL-MM 3. **b** vs. CTL-MM 7. **c** vs. CTL-GC 7. **d** vs. CTL-GC 14 8. **e** vs. CTL-ACT 3. **f** vs. CTL-ACT 7. **g** vs. CTL-FE 3. **h** vs. CTL-FE 7. **i** vs. CTL-FE 14. **j** vs. CTL-FI 3, p<0,05. Teste t de Student. MM: Massa magra; GC: Gordura corporal; ACT: Água corporal total; FE: Fluido extracelular; FI: Fluido intracelular.

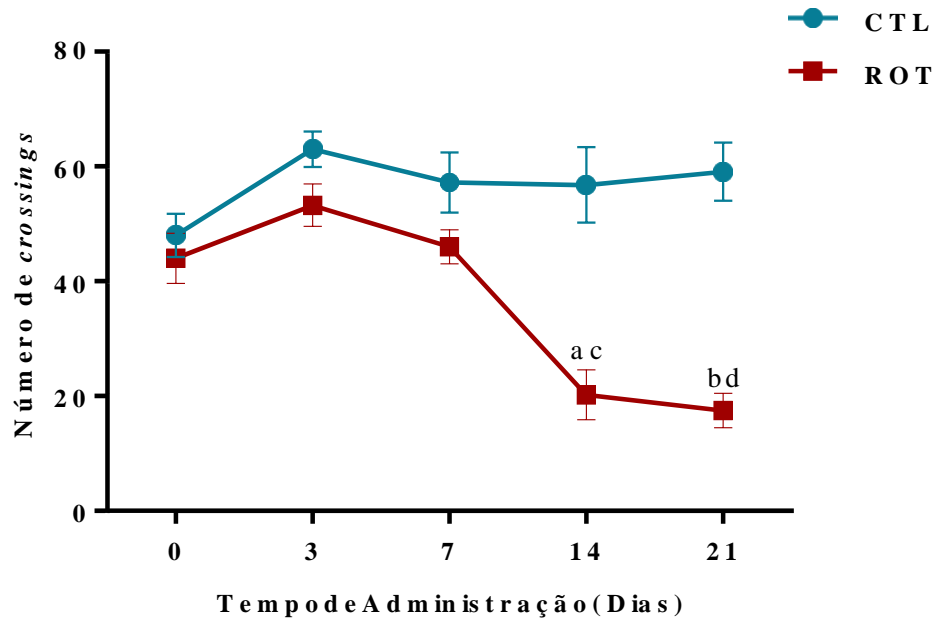
4.3 Efeitos da rotenona sobre a atividade motora dos animais (teste do campo aberto).

No teste do campo aberto foi observado uma diminuição no número *crossings* nos animais expostos à rotenona, em comparação ao grupo controle, após 14 e 21 dias de administração (CTL 14: $56,80 \pm 6,54$; ROT 14: $20,25 \pm 4,32$; CTL 21: $59,10 \pm 5,03$; ROT 21: $17,50 \pm 3,02$; $p < 0,05$) demonstrando um déficit na atividade motora horizontal dos animais. Também foi observada uma diminuição da atividade locomotora horizontal dos animais do grupo ROT no decorrer da indução do modelo, tendo sido observado uma diferença significativa ($p < 0,05$) no 14º e 21º dias após o início da administração de rotenona em comparação aos dias anteriores de testes (dias 0, 3 e 7), alteração que não foi observada no acompanhamento do grupo controle (Figura 16).

Em relação a atividade locomotora vertical observou-se uma diminuição do número de *rearings* nos animais do grupo rotenona após 14 e 21 em comparação ao grupo controle (CTL 14: $19,10 \pm 2,93$; ROT 14: $10,83 \pm 2,76$, $p < 0,05$; CTL 21: $16,40 \pm 2,78$; ROT 21: $6,66 \pm 1,50$, $p < 0,01$). Também foi observada uma diminuição da atividade locomotora vertical dos animais do grupo ROT no decorrer da indução do modelo, tendo sido observado uma diferença significativa ($p < 0,05$) no 14º e 21º dias após o início da administração de rotenona em comparação aos dias anteriores de testes (dias 0 e 3), alteração que não foi observada no acompanhamento do grupo controle (Figura 17).

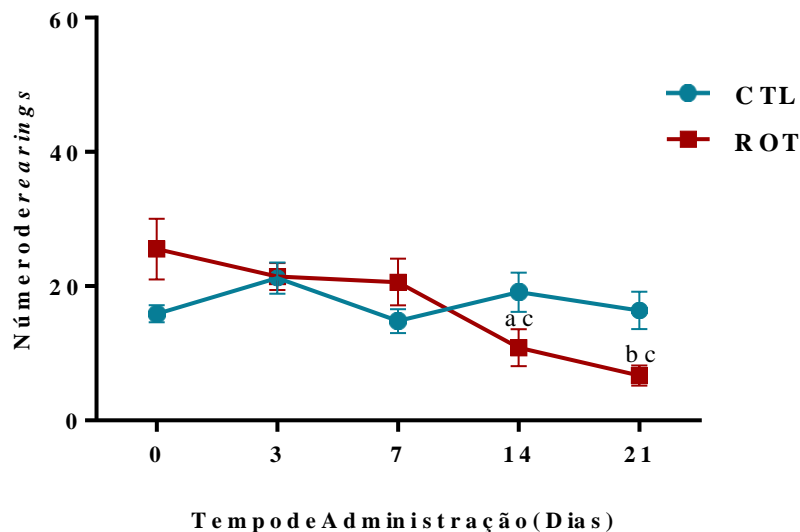
Observou-se ainda uma diminuição da velocidade média nos animais expostos a rotenona após 14 dias, em comparação ao grupo controle (CTL 14: $88,90 \pm 10,92$ m/s; ROT 14: $54,54 \pm 18,47$ m/s $p < 0,05$). Também foi observada uma diminuição da velocidade média dos animais do grupo ROT no decorrer da indução do modelo, tendo sido observado uma diferença significativa ($p < 0,05$) no 14º dia após o início da administração de rotenona em comparação aos dias anteriores de testes (dia 3), alteração que não foi observada no acompanhamento do grupo controle (Figura 18).

Figura 16- Efeito da rotenona sob a atividade locomotora horizontal dos animais (número de *crossings*) no teste do campo aberto.



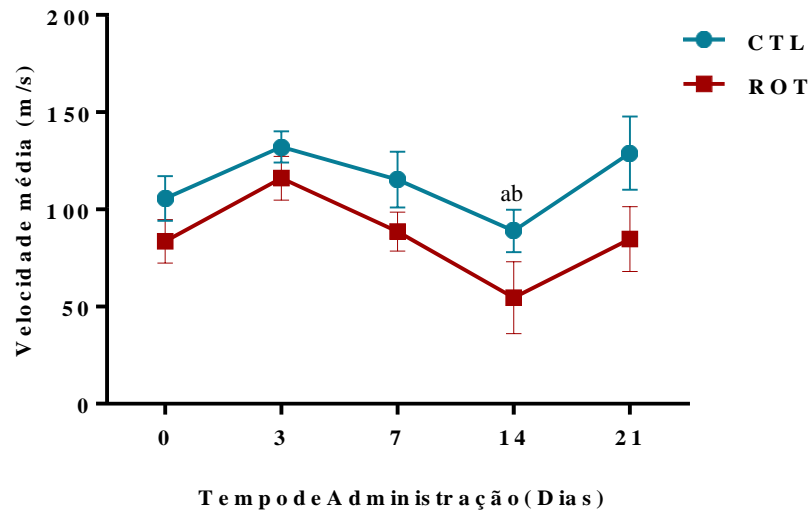
O teste do campo aberto foi realizado após 0, 3, 7, 14 e 21 dias de administração de rotenona a fim de determinar a linha de tempo de ocorrência de déficits da atividade locomotora, $n = 10-12$. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL 14 dias; **b** vs. CTL 21 dias, $p < 0,001$, teste de Mann-Whitney. **c** vs ROT 0, ROT 3 e ROT 7, **d** vs ROT 3 e ROT 7, ANOVA de uma via para medidas repetidas e teste de Tukey.

Figura 17- Efeito da rotenona sob a atividade locomotora vertical dos animais (número de *rearings*) no teste do campo aberto.



O teste do campo aberto foi realizado após 0, 3, 7, 14 e 21 dias de administração de rotenona a fim de determinar a linha de tempo de ocorrência de déficits da atividade locomotora, $n = 10-12$. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL 14 dias; **b** vs. CTL 21 dias, teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$. **c** vs ROT 0 e ROT 3 ($p < 0,05$), teste de Friedman e teste de Dunn.

Figura 18- Efeito da rotenona sob a velocidade média dos animais no teste do campo aberto.



O teste do campo aberto foi realizado antes após 0, 3, 7, 14, 21 dias de administração de rotenona a fim de determinar a linha de tempo de ocorrência de déficits da atividade locomotora, $n = 10-12$. os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL 14 dias; $p < 0,05$, teste de Mann-Whitney. **b** vs ROT 3, $p < 0,05$, teste de Friedman e teste de Dunn.

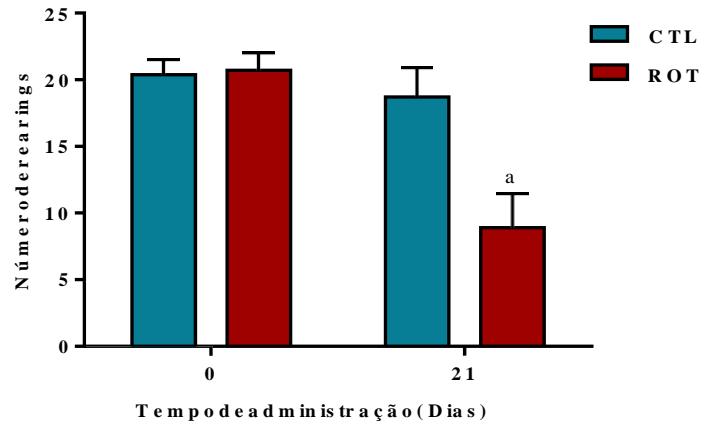
4.4 Efeito da rotenona sobre a estabilidade postural dos animais (teste do comportamento de *rearing*).

Ao final de 21 dias de administração da rotenona observou-se uma diminuição significativa no número de *rearings* dos animais expostos a rotenona quando comparadas ao grupo controle (CTL 21: $18,71 \pm 2,128$; ROT 21: $8,909 \pm 2,528$, $p < 0,05$), demonstrando um déficit da estabilidade postural dos animais (Figura 19).

4.5 Efeito da rotenona sobre a coordenação motora dos animais (teste do rotarod).

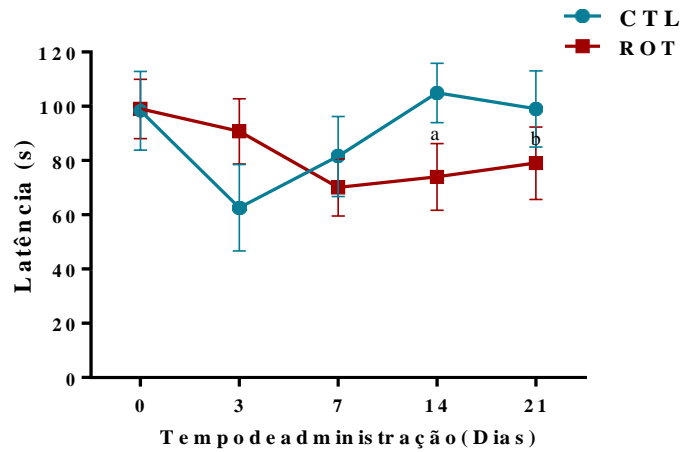
Foi observado uma diminuição significativa do tempo de latência para queda no grupo ROT após 14 e 21 dias quando comparado ao grupo controle (CTL 14: $104,90 \pm 10,98s$; ROT 14: $73,92 \pm 12,30s$; CTL 21: $99,00 \pm 14,02s$; ROT 21: $79,00 \pm 13,39s$, $p < 0,05$) (figura 20).

Figura 19- Efeito da rotenona sobre a estabilidade postural dos animais no teste do comportamento de *rearing*.



Os animais foram submetidos ao teste do comportamento de *rearing* antes do início da administração da rotenona (dia 0) e após 21 dias, n =10-11. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL 21 dias, C, Teste de Mann-Whitney.

Figura 20- Efeito da rotenona sobre a coordenação motora dos animais no teste do rotarod.



O teste do rotarod foi realizado após 0, 3, 7, 14 e 21 dias de administração de rotenona a fim de determinar linha de tempo de ocorrência dos déficits na coordenação motora, n =10-12. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL 14 dias, **b** vs. CTL 21 dias, $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney.

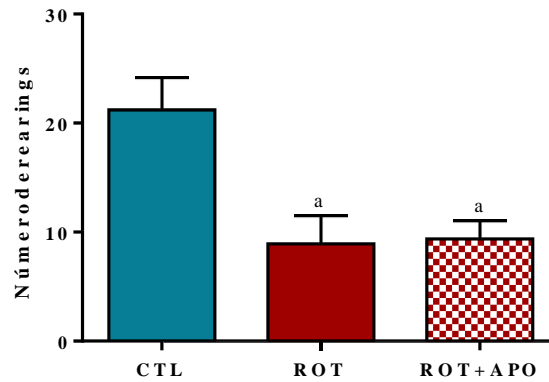
4.6 Efeito da apomorfina no déficit de estabilidade postural e coordenação motora induzida por rotenona.

No teste do comportamento de *rearing* não foi observada diferença significativa no número *rearings* após administração da apomorfina nos animais (Figura 21). No teste do rotarod foi observado um aumento significativo no tempo de latência para a queda após administração de apomorfina no grupo ROT (CTL 21: $99,00 \pm 14,02s$; ROT 21: $64,25 \pm 12,97s$; ROT+APO: $106,8 \pm 11,69s$, $p < 0,01$) (Figura 22).

4.7 Efeito da rotenona sobre a capacidade de discriminação de odores no teste da discriminação olfatória.

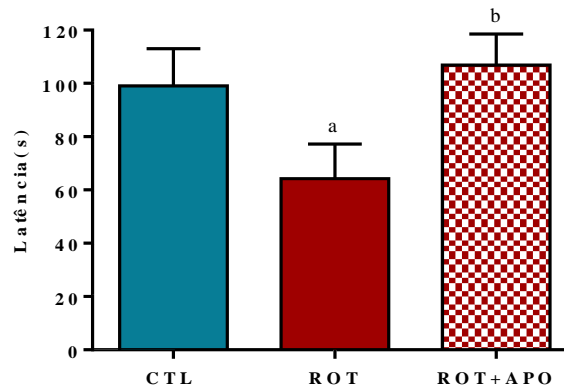
No teste da discriminação olfatória realizado após 7 dias do início da indução do modelo não foram observadas diferenças significativas no tempo de permanência nos compartimentos com cheiro familiar e não familiar entre os grupos (Figura 23). Entretanto, foi observado um maior tempo de permanência no compartimento não familiar em relação ao compartimento familiar após 21 de administração de rotenona (Familiar: CTL 21: $59,40 \pm 2,92s$; ROT 21: $37,42 \pm 5,04s$; Não-Familiar: CTL 21: $38,60 \pm 3,43s$; ROT 21: $60,12 \pm 5,15s$, $p < 0,01$), indicando um déficit na discriminação de odores (Figura 24).

Figura 21- Efeito da apomorfina no déficit de estabilidade postural induzida por rotenona no teste do comportamento de *rearing*.



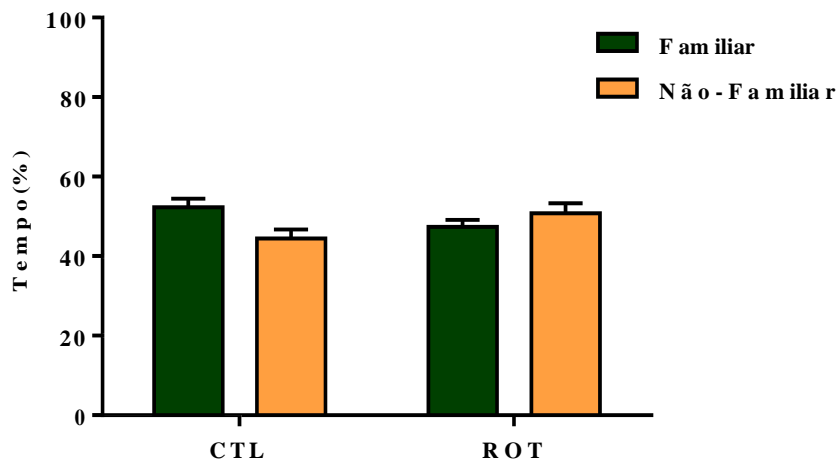
Os animais realizaram o teste do comportamento de *rearing*, posteriormente ao teste receberam 0,6mg/kg de apomorfina e após 15 minutos o teste foi repetido, n =10-12. Os valores estão representados como média ± EPM. **a** vs. CTL, $p < 0,05$, Teste de Friedman e post teste de Dunn.

Figura 22- Efeito da apomorfina no déficit de coordenação motora induzida por rotenona no teste do rotarod.



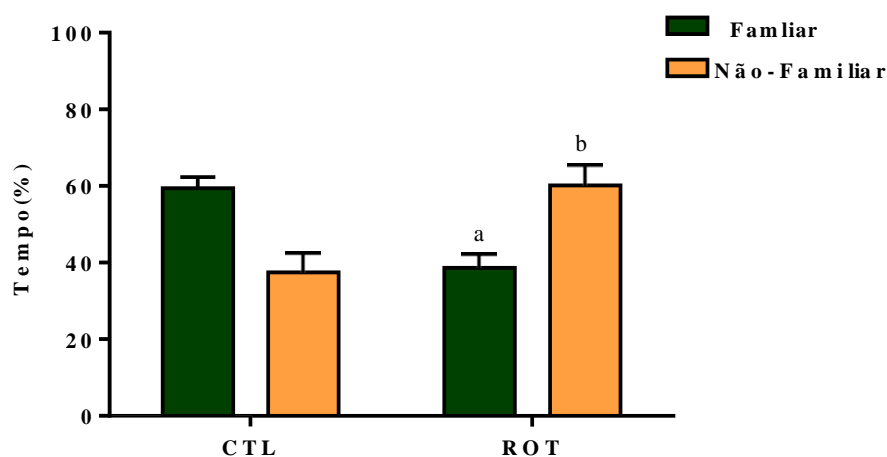
Os animais realizaram o teste do rotarod, posteriormente ao teste receberam 0,6mg/kg de apomorfina e após 20 minutos o teste foi repetido, n =10-12. Os valores estão representados como média ± EPM. **a** vs. CTL, $p < 0,05$, **b** vs. ROT, $p < 0,05$, Teste de Friedman e post teste de Dunn.

Figura 23- Efeito da rotenona sobre a capacidade de discriminação de odores dos animais após 7 dias de administração de rotenona.



Os animais foram deixados por cinco minutos para explorar o aparato contendo um compartimento com maravalha utilizada por eles durante uma semana (familiar) e um compartimento contendo maravalha nova (não-familiar), n =10-12. Os valores estão representados como média \pm EPM. Teste de Mann-Whitney.

Figura 24- Efeito da rotenona sobre a discriminação olfatória dos animais após 21 dias de administração de rotenona.



Os animais foram deixados por cinco minutos para explorar o aparato contendo um compartimento com maravalha utilizada por eles durante uma semana (familiar) e um compartimento contendo maravalha nova (não-familiar), n =10-11. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL Familiar, **b** vs. CTL Não-Familiar, $p < 0,01$, $p < 0,01$, teste t de Student.

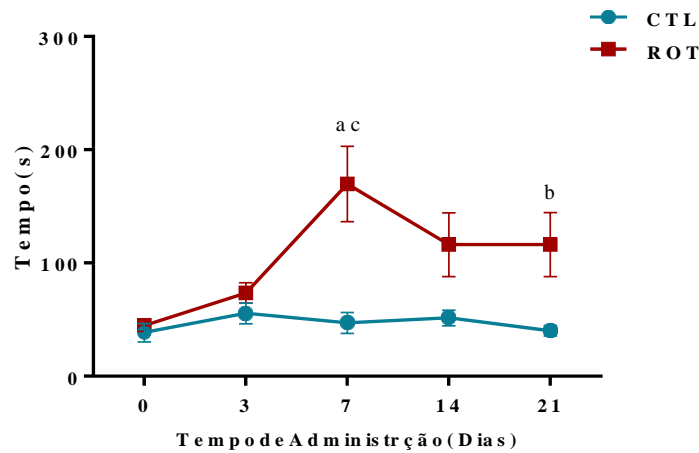
4.8 Efeito da rotenona sobre a detecção olfatória de cheiros voláteis dos animais (teste da procura do *pellet* enterrado).

Foi observado um aumento significativo no tempo necessário para encontrar o *pellet* no grupo ROT após 7 e 21 dias de administração de rotenona em comparação ao grupo controle (CTL 7: $47,10 \pm 9,19s$; ROT 7: $169,00 \pm 33,23s$, $p < 0,05$; CTL 21: $40,20 \pm 4,63s$; ROT 21 dias: $116,30 \pm 28,17s$, $p < 0,05$), indicando um déficit olfatório na habilidade em detectar cheiros voláteis no grupo rotenona, um indicativo de anosmia. No decorrer da indução do modelo, foi observado um aumento significativo do tempo para encontrar o *pellet* dentro do grupo ROT após 7 dias, quando comparado ao teste realizado antes da administração de rotenona (dia 0) (Figura 25).

4.9 Efeito da rotenona sobre comportamento depressivo dos animais (teste de preferência por sacarose).

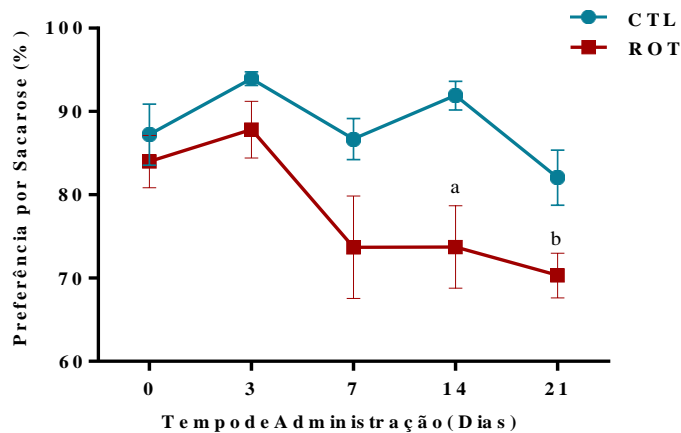
No teste de preferência por sacarose foi observado uma diminuição significativa no consumo de sacarose no grupo ROT após 14 e 21 dias de administração de rotenona em comparação ao grupo controle (CTL 14: $91,90 \pm 1,70\%$; ROT 14: $72,44 \pm 4,70\%$; CTL 21: $82,06 \pm 3,30\%$; ROT 21: $70,30 \pm 2,69\%$, $p < 0,05$) caracterizando um quadro de anedonia, um indicativo de depressão. (Figura 26).

Figura 25- Efeito da rotenona sobre a detecção de cheiros voláteis dos animais no teste do *pellet* enterrado.



O teste do *pellet* enterrado foi realizado após 0, 3, 7, 14 e 21 dias de administração de rotenona a fim de determinar a linha de tempo de ocorrência de déficits na detecção de cheiros voláteis, $n = 10-12$. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL 7 dias $p < 0,01$, **b** vs. CTL 21 dias, $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney. **c** vs ROT 0, $p < 0,05$, Teste de Friedman e post teste de Dunn.

Figura 26- Efeito da rotenona sobre o % de preferência por sacarose dos animais no teste de preferência por sacarose.



O teste de preferência por sacarose foi realizado após 0, 3, 7, 14 e 21 dias de administração de rotenona a fim de determinar a linha de tempo de ocorrência dos sintomas do tipo-depressivo, $n = 10-12$. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL 14 dias, $p < 0,01$; **b** vs. CTL 21 dias, $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney.

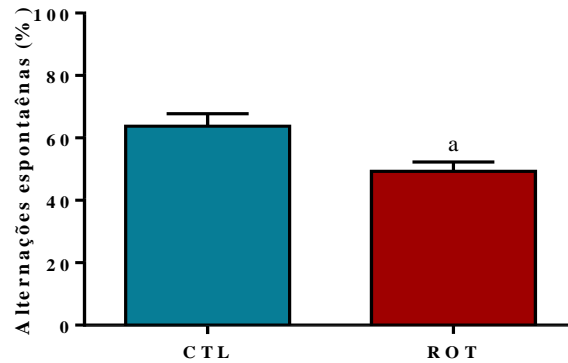
4.10 Efeito da rotenona sobre a memória de trabalho dos animais (Teste do labirinto em Y).

Foi observada uma diminuição no percentual de alternâncias espontâneas no teste do labirinto em Y, indicando um déficit na memória de trabalho dos animais, após 21 dias de administração de rotenona no grupo ROT em relação ao grupo CTL (CTL 21: $63,77 \pm 3,98\%$; ROT 21: $49,33 \pm 2,93\%$, $P < 0,01$) (Figura 27).

4.11 Efeito da rotenona sobre a memória aversiva dos animais (Teste do Esquiva Passiva).

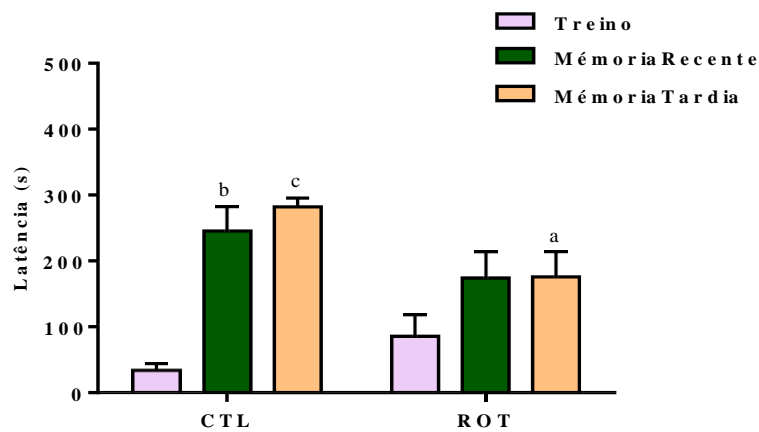
Foi observado uma diminuição no tempo de descida da plataforma 24hrs após o treino (memória tardia), indicando um déficit de retenção de memória no grupo ROT em relação ao CTL (Memória tardia: CTL 21: $281,7 \pm 13,49$ s; ROT 21: $155,8 \pm 37,39$ s, $p < 0,05$) (Figura 28). Não foi observada diferença na memória recente e tardia em relação ao treino, indicando um déficit de aprendizagem e retenção de memória no grupo ROT. No grupo controle foi observado um aumento significativo no tempo de descida da plataforma em relação ao treino, indicando o aprendizado e retenção da memória do grupo CTL (CTL-treino: $33,30 \pm 9,25$ s; CTL-Memória recente: $245,30 \pm 36,47$ s; CTL-Memória tardia: $281,70 \pm 13,49$ s, $p < 0,05$).

Figura 27- Efeito da rotenona sobre a memória de trabalho dos animais no teste de labirinto em Y.



Após 21 dias de controles e animais expostos a rotenona foram deixados para explorar o labirinto em Y por oito minutos e a alternância foi registrada, n =10-12. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. Controle dias $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney.

Figura 28- Efeito da rotenona sobre a memória aversiva dos animais no teste da esquiwa passiva.



Após 21 dias controles e animais expostos a rotenona e controles foram avaliados quanto ao tempo de latência para descida da plataforma, em sessões de 300s, realizadas 15 minutos (memória recente) e 24h (memória tardia) após o treino, n =10-12. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL - Memória tardia, $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney. **b** e **c** vs. CTL-treino, $p < 0,01$, teste de Friedman e teste de Dunn.

4.12 Efeito da rotenona sobre o esvaziamento gástrico dos animais.

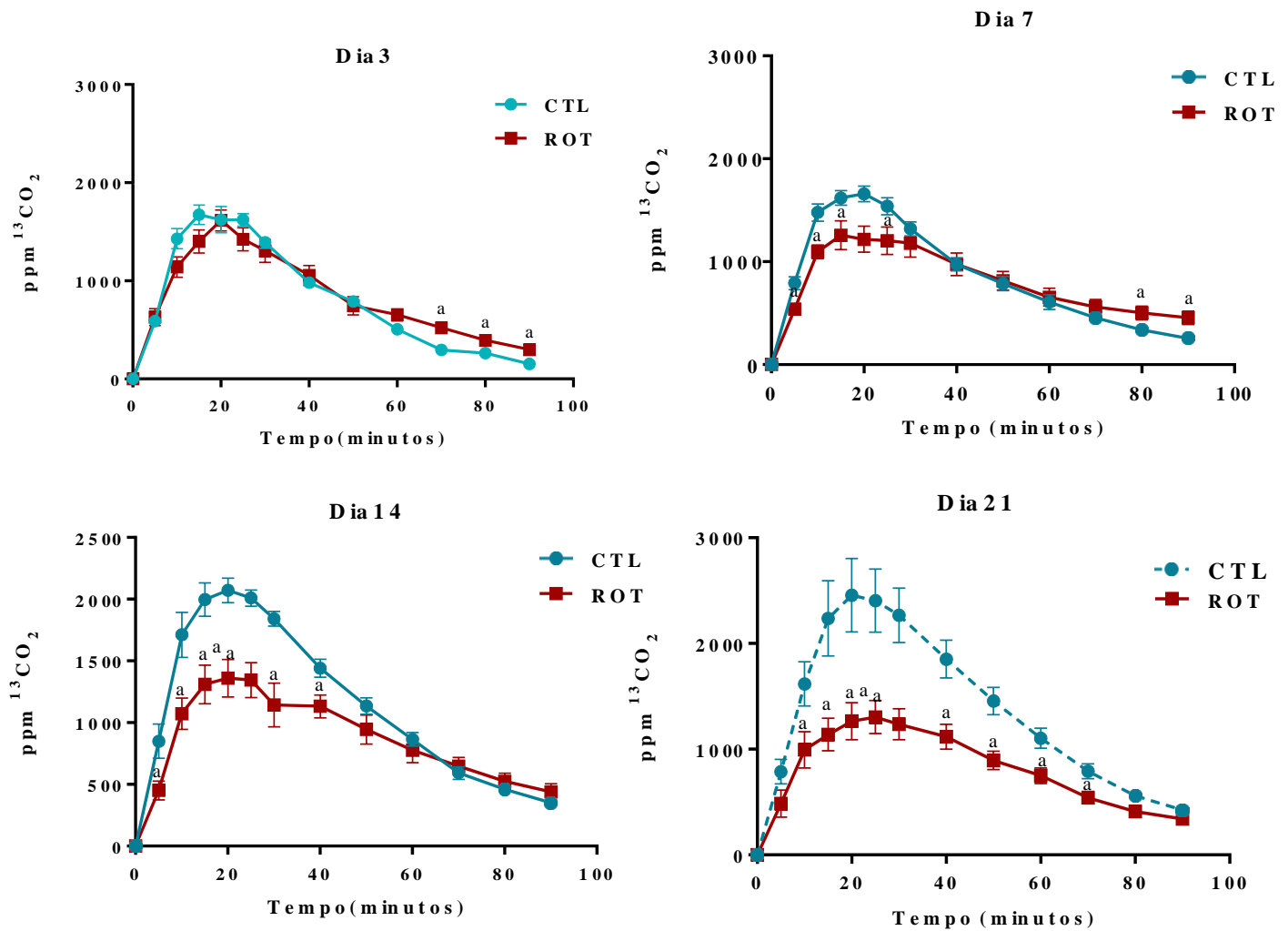
A rotenona induziu uma diminuição significativa no esvaziamento gástrico de líquidos em relação aos animais controles. Após 3 dias de administração, os animais expostos à rotenona apresentaram aumento da liberação de $^{13}\text{CO}_2$ após 70, 80 e 90 minutos de teste, e após 7 dias, foi observado uma queda na curva de esvaziamento após 5, 10, 15 e 25 minutos de teste e aumento da liberação de $^{13}\text{CO}_2$ após 80 e 90 minutos. Após 14 dias, a queda na curva de esvaziamento se acentuou e se iniciou após 5 minutos se prolongou até os 40 minutos de teste, após 21 dias a queda na curva de esvaziamento se acentuou se iniciando após 10 minutos e se prolongando até os 70 minutos (Figura 29).

Os déficits observados nos animais durante a administração da rotenona (efeito agudo) foram observados também após as pausas de administração (efeito crônico), após a pausa 1 foi observado um aumento da liberação de $^{13}\text{CO}_2$ após 50, 60, 70, 80 e 90 minutos de teste, após a pausa 2 foi observado uma queda na curva de esvaziamento após 5, 10 e 15 minutos de teste, seguido do aumento da liberação de $^{13}\text{CO}_2$ após 50, 60, 70, 80 e 90, após a pausa 3 foi observado uma queda na curva de esvaziamento após 20, 25 e 30 minutos de teste (Figura 30). As diferenças no perfil da curva de esvaziamento se deram por uma queda na quantidade total de $^{13}\text{CO}_2$ perdido, representado pela área sob a curva, após 14 e 21 dias administração e no terceiro intervalo nos animais expostos a rotenona quando comparados aos controles. Foi observado uma mudança no pico de liberação de $^{13}\text{CO}_2$ (c-máx.), deslocando verticalmente a curva após 7, 14 e 21 dias de administração de rotenona, e um atraso no tempo de esvaziamento (t-máx), deslocando horizontalmente a curva após o segundo intervalo de administração de rotenona (Tabela 3).

Além disso, no teste de esvaziamento gástrico do corante, os animais submetidos à 21 dias de administração de rotenona apresentaram retardo no esvaziamento gástrico após um período pós-prandial de 15 e 20 minutos quando comparados ao veículo (CTL-15: $27,70 \pm 1,458\%$; ROT-15: $36,09 \pm 2,727\%$; CTL-20: $25,68 \pm 2,144\%$; ROT-20: $34,28 \pm 2,968\%$, $p < 0,005$) (Figura 31-A) confirmando a observação tardia do esvaziamento gástrico na técnica de esvaziamento com $^{13}\text{CO}_2$. Este atraso no esvaziamento não foi alterado pela administração anterior de omeprazol (CTL: $27,70 \pm 1,458\%$; CTL + OMZ: $27,14 \pm 1,666\%$; ROT: $36,09 \pm$

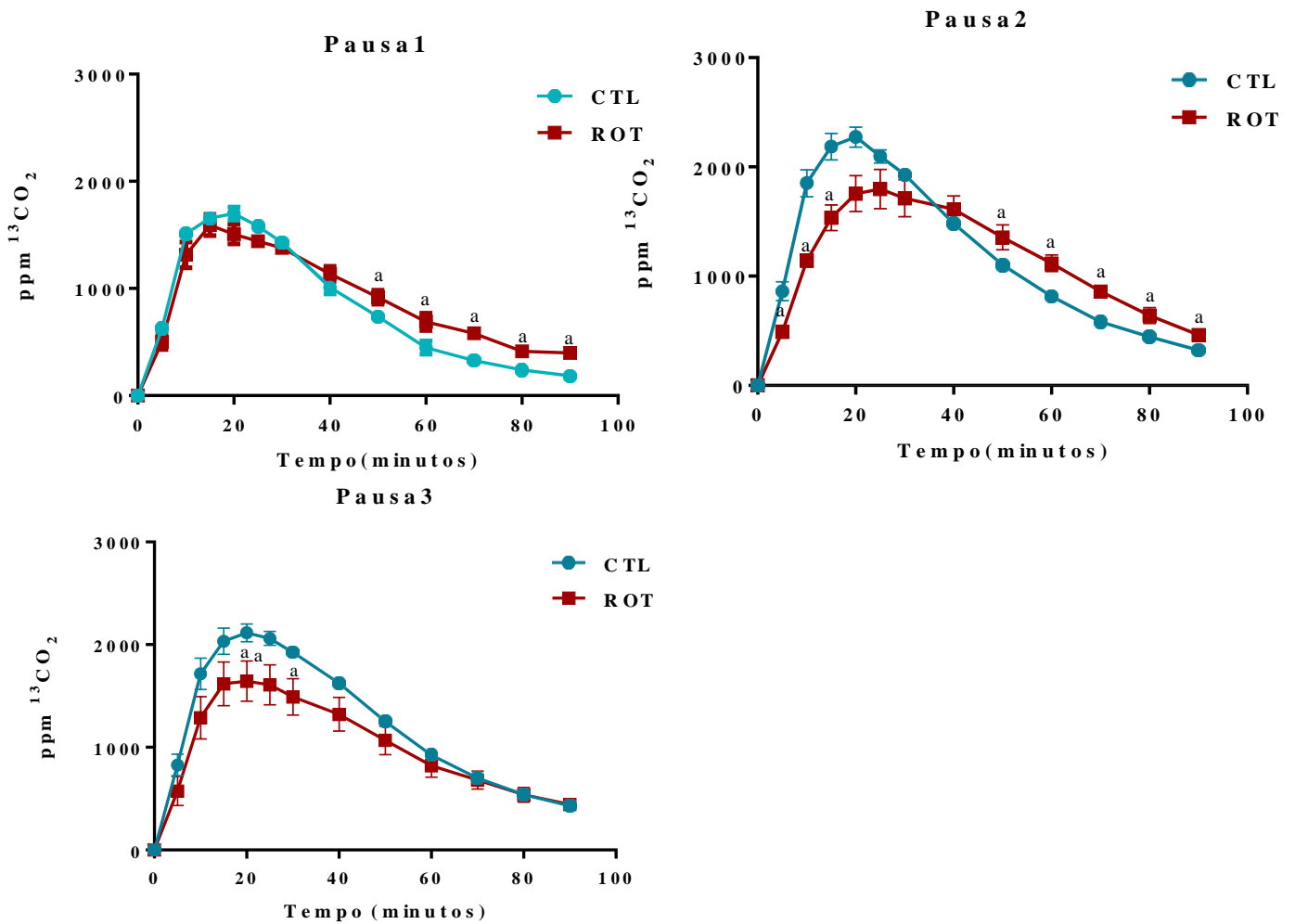
2,727%; ROT + OMZ: $37,88 \pm 2,176\%$, $p < 0,005$) (Figura 31-B). Adicionalmente foi observado uma diferença no padrão de distribuição do corante entre os compartimentos do TGI analisados: estomago (E), intestino proximal (P), medial (M) e distal (D), observando uma retenção do corante nos primeiros compartimentos (estomago e intestino proximal) no grupo ROT (CTL-E: $27,7 \pm 1,45\%$; ROT-E: $36,09 \pm 2,72\%$, $p < 0,01$; CTL-M: $30,84 \pm 1,85\%$; ROT-M: $20,34 \pm 1,09\%$), assim no intestino medial já foi observada uma diferença estatisticamente significativa na quantidade de corante recuperada entre os grupos (Figura 32).

Figura 29- Efeito agudo da rotenona sobre o esvaziamento de líquidos por meio da técnica de esvaziamento do $^{13}\text{CO}_2$.



Após 12 horas de jejum animais expostos a rotenona e controle receberam a solução adicionada de acetato de sódio-13 (16mg/kg) e amostras de ar foram coletadas nos 90 minutos seguintes, n=10. **a** vs. CTL no respectivo tempo, $p < 0.05$, Student's t-test. ppm: partes por milhão.

Figura 30- Efeito crônico da rotenona sobre o esvaziamento de líquidos por meio da técnica de esvaziamento do $^{13}\text{CO}_2$.



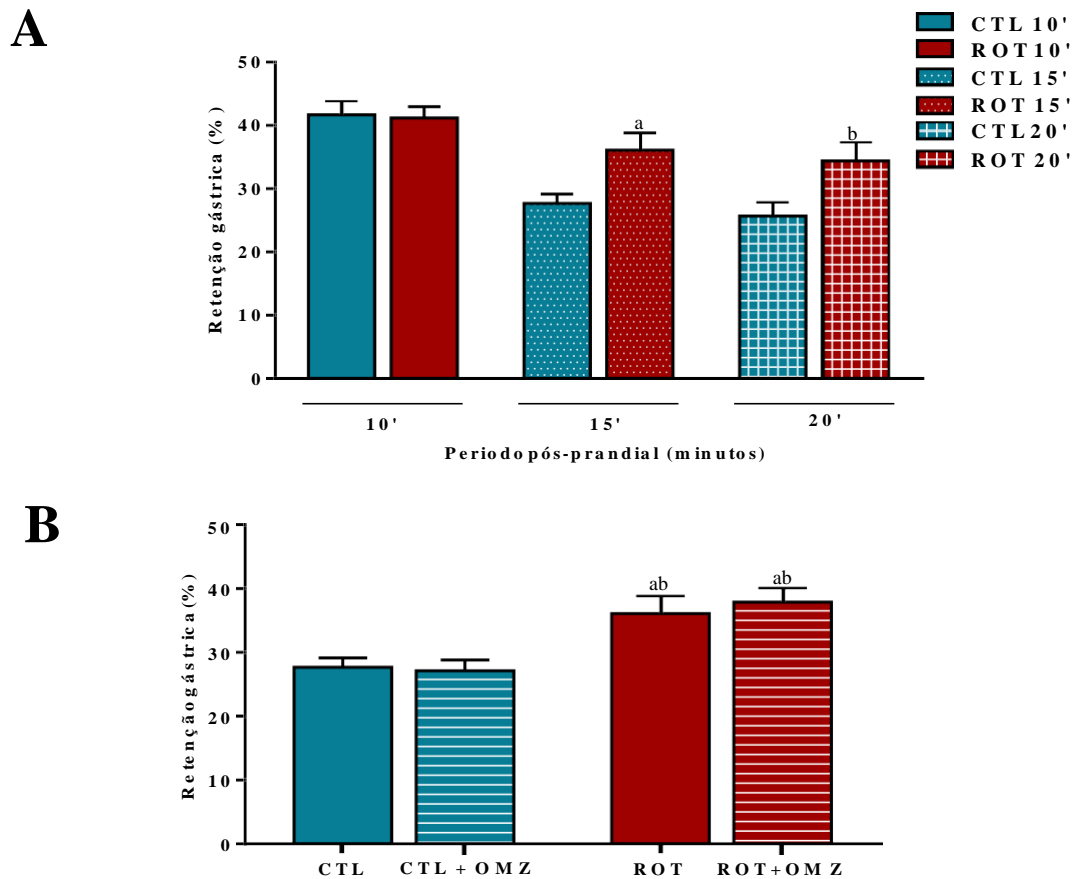
Após 12 horas de jejum animais expostos a rotenona e controle receberam a solução adicionada de acetato de sódio-13 (16mg/kg) e amostras de ar foram coletadas nos 90 minutos seguintes, n=10. a vs. CTL no respectivo tempo, p < 0.05, Student's t-test. ppm: partes por milhão.

Table 3: Avaliação do esvaziamento gástrico de líquidos de ratos expostos à rotenona e veículo pela técnica de esvaziamento de $^{13}\text{CO}_2$ durante o período de administração de rotenona e intervalos. O pico de liberação de $^{13}\text{CO}_2$ (C-Max), o tempo para o pico de esvaziamento de $^{13}\text{CO}_2$ (T-max) e a quantidade total de $^{13}\text{CO}_2$ liberado (AUC).

	CTL			ROT		
	T-Max	C-Max	AUC	T-Max	C-Max	AUC
Dia 3	19.44 ± 1.303 min	1758±99.44 ppm $^{13}\text{CO}_2$	74234±2983 ppm $^{13}\text{CO}_2$	20.56 ± 1.303min	1658±107.4 ppm $^{13}\text{CO}_2$	76053±5390 ppm $^{13}\text{CO}_2$
Dia 7	15.56±1.002 min	1711±78.56 ppm $^{13}\text{CO}_2$	78198±3574 ppm $^{13}\text{CO}_2$	17.78 ±2.222 min	1306±139.2 ppm $^{13}\text{CO}_2$ ^{d}	79723±10769 ppm $^{13}\text{CO}_2$
Dia 14	18.89±2.170 min	2171±94.32 ppm $^{13}\text{CO}_2$	103654±2502 ppm $^{13}\text{CO}_2$	28.89±4.914 min	1446±141.8 ppm $^{13}\text{CO}_2$ ^{c}	78664±6596 ppm $^{13}\text{CO}_2$ ^{e}
Dia 21	23.89±1.111 min	2585±362.0 ppm $^{13}\text{CO}_2$	124209±13277 ppm $^{13}\text{CO}_2$	22.78±2.778 min	1385±162.6 ppm $^{13}\text{CO}_2$ ^{d}	74102±7883 ppm $^{13}\text{CO}_2$ ^{f}
Pausa 1	17.22±0.8784 min	1753±48.48 ppm $^{13}\text{CO}_2$	74567±2918 ppm $^{13}\text{CO}_2$	16.88±1.315 min	1657±83.75 ppm $^{13}\text{CO}_2$	81524±2766 ppm $^{13}\text{CO}_2$
Pausa 2	18.89±1.111 min	2311±100.3 ppm $^{13}\text{CO}_2$	106613±3131 ppm $^{13}\text{CO}_2$	27.78±2.515 min ^{a}	1846±170.9 ppm $^{13}\text{CO}_2$	115198±13546 ppm $^{13}\text{CO}_2$
Pausa 3	18.89±1.389 min	2172±99.00 ppm $^{13}\text{CO}_2$	110891±2565 ppm $^{13}\text{CO}_2$	20.00±1.443 min	1932±95.93 ppm $^{13}\text{CO}_2$	91369±1053 ppm $^{13}\text{CO}_2$ ^{g}

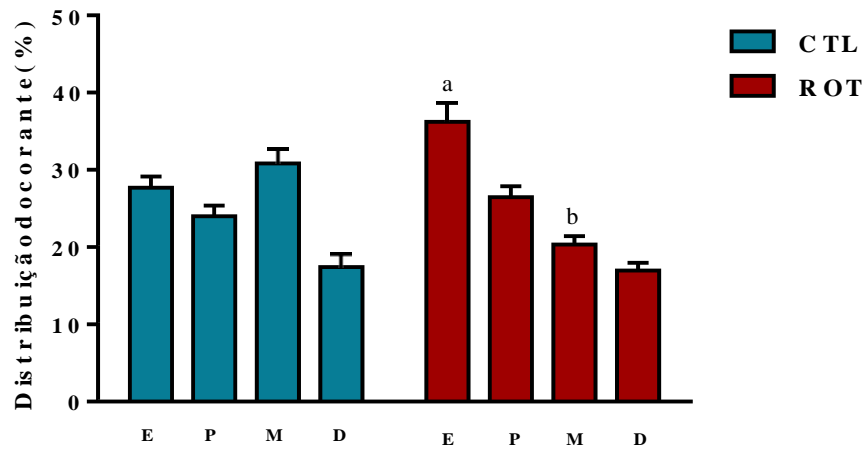
Os valores estão representados como média ± EPM, n=10. **a** vs. CTL-T-Max Pausa2, **b** vs. CTL-C-Max7, **c** vs. CTL-C-Max14, **d** vs. CTL-C-Max21, **e** vs. CTL-AUC14, **f** vs. CTL-AUC21, **g** vs. CTL-AUC Pausa3, $p < 0.05$, Mann-Whitney test.

Figura 31- Efeito da rotenona (21 dias) sobre a retenção gástrica dos animais no teste do esvaziamento do corante.



Após 16 horas de jejum, os animais expostos à rotenona e veículo por 21 dias receberam uma refeição teste contendo 0,75mg/ml de vermelho fenol, foram eutanasiados e o estômago foi retirado para a mensuração da retenção do corante, que reflete o % de esvaziamento gástrico, $n=10$. Os valores estão representados como média \pm EPM. (A) teste do esvaziamento do corante em três tempos pós-prandiais. **a** vs. CTL10', **a** vs. CTL20', $p < 0,05$, teste t de Student. (B) teste do esvaziamento do corante na presença e ausência de administração de omeprazol num período pós prandial de 15 minutos. **a** vs. CTL, **b** vs. CTL+OMZ, $p < 0,05$, ANOVA de uma via e teste de Tukey. CTL: Controle; CTL+OMZ: Controle+ Omeprazol; ROT: Rotenona; ROT+OMZ: Rotenona+ Omeprazol.

Figura 32- Efeito da rotenona (21 dias) sobre a distribuição do corante nos compartimentos do trato gastrointestinal dos animais no teste do vermelho fenol.



Após 16 horas de jejum os animais receberam uma refeição teste contendo 0,75mg/ml de vermelho fenol e após um tempo pós-prandial de 15min os animais foram sacrificados e o estomago e intestino foram retirados para a mensuração de retenção do corante, n =10. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL E, $p < 0,01$; **b** vs. CTL M $p < 0,001$, teste t de Student. E: Estomago; P: Intestino proximal; M: Intestino medial; D: Intestino Distal.

4.13 Efeito da rotenona sobre as concentrações de monoaminas no estriado, mesencéfalo e bulbo olfatório.

Os resultados obtidos mostram uma redução significativa nos níveis de dopamina (DA), bem como do metabolito DOPAC no corpo estriado (CTL-DA: $2203 \pm 151,9$ mg/g, ROT-DA: $1699 \pm 137,9$ mg/g, $p < 0,05$; CTL-DOPAC: $2744 \pm 328,4$ mg/g, ROT-DOPAC: $865,1 \pm 485,8$ mg/g, $p < 0,05$) dos animais expostos à rotenona quando comparados aos controles (Tabela 4) e não foram observadas alterações nas concentrações de noradrenalina (NA) e serotonina (5-TH). No mesencéfalo foi observada uma diminuição de metade do conteúdo de DA, embora sem significância estatística (CTL: $1438 \pm 322,6$; ROT: $784,3 \pm 308,8$.) e não foram observadas alterações nas concentrações de DOPAC, NA e 5-TH no grupo rotenona quando comparada ao grupo controle. No bulbo olfatório foi observada uma diminuição de metade do conteúdo de 5-TH, embora sem significância estatística (CTL: $87,15 \pm 26,72$; ROT: $48,16 \pm 7,46$.) e não foram observadas alterações nas concentrações de DA, DOPAC e NA nos animais expostos à rotenona em comparação ao grupo controle.

Tabela 4 - Efeitos da rotenona sobre as concentrações de monoaminas (mg/g tecido) no estriado e bulbo olfatório esquerdo e mesencéfalo dos animais.

	ESTRIADO				MESENCÉFALO				BULBO OLFATÓRIO			
	DA	DOPAC	NA	5-TH	DA	DOPAC	NA	5-TH	DA	DOPAC	NA	5-TH
CTL	$2203 \pm 151,9$	$2744 \pm 328,4$	$1482 \pm 274,6$	$70,37 \pm 10,72$	$1438 \pm 322,6$	$339,3 \pm 19,39$	$1064 \pm 316,3$	$185,8 \pm 15,32$	$415,9 \pm 23,51$	-	-	$87,15 \pm 26,72$
ROT	$1699 \pm 137,9^a$	$865,1 \pm 485,8^b$	$1341 \pm 108,8$	$72,20 \pm 8,966$	$784,3 \pm 308,8$	$325,6 \pm 49,16$	$618,7 \pm 243,6$	$156,2 \pm 11,83$	$456,2 \pm 26,66$	-	-	$48,16 \pm 7,457$

Os níveis de monoaminas e metabolitos foram medidos após 21 dias de administração de rotenona, $n = 6$. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. Dopamina/Estriado/CTL, **b** vs DOPA/Estriado/CTL $p < 0,05$, Teste de Mann-Whitney.

4.14 Efeitos da rotenona sobre a imunorreatividade para TH.

Os animais que receberam rotenona apresentaram uma diminuição significativa na imunomarcção para tirosina hidroxilase (TH) quando comparado ao grupo controle, no estriado (% da média dos controles: CTL: $100,0 \pm 2,972\%$; ROT: $78,57 \pm 5,730\%$, $p < 0,05$) (Figura 33) e na substancia negra (% da média dos controles: CTL: $100,0 \pm 10,40\%$; ROT: $30,81 \pm 5,303\%$, $p < 0,05$) (Figura 34).

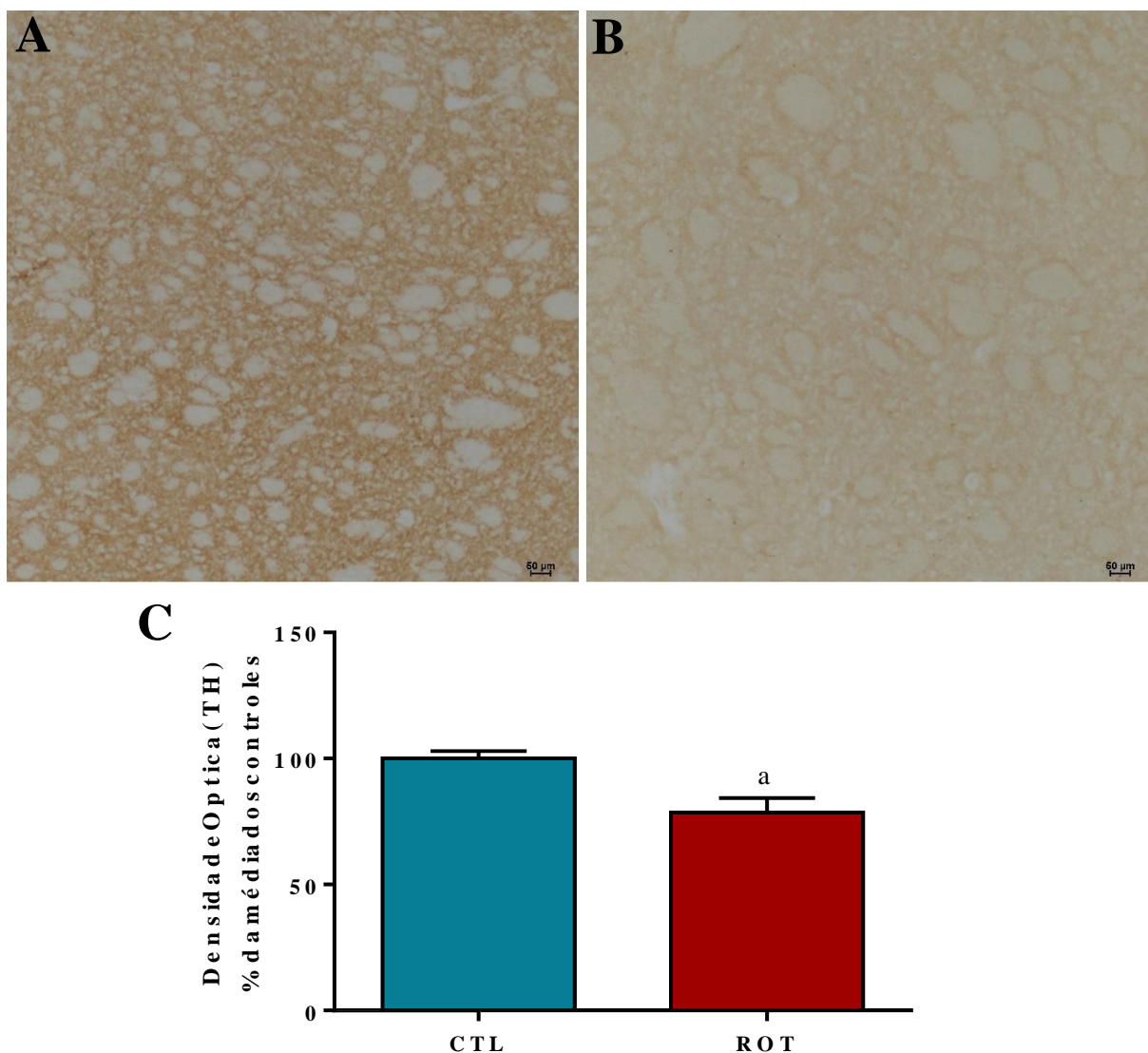
4.15 Efeitos da rotenona sobre a imunorreatividade para iba-1.

Os animais que receberam rotenona apresentaram um aumento significativo na microgliose, observado pela imunomarcção por iba-1 no estriado (% da média dos controles: CTL: $100,0 \pm 2,655\%$; ROT: $390,1 \pm 105,5\%$, $p < 0,05$) (Figura 35).

4.16 Efeitos da rotenona sobre a imunorreatividade para GFAP.

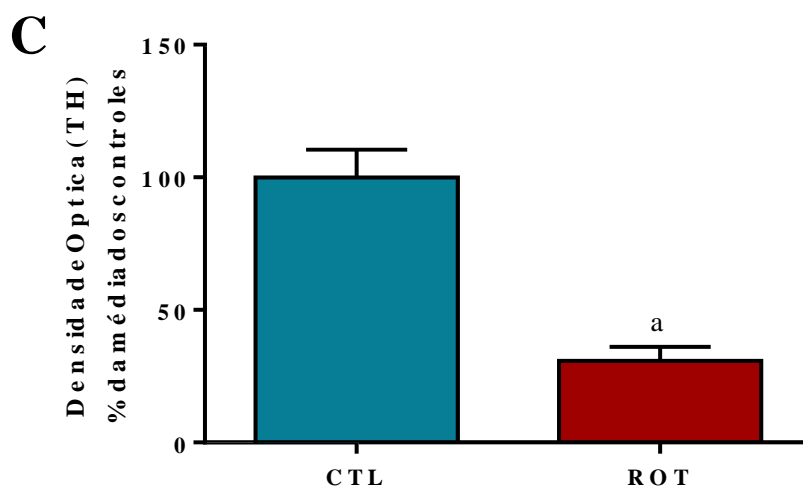
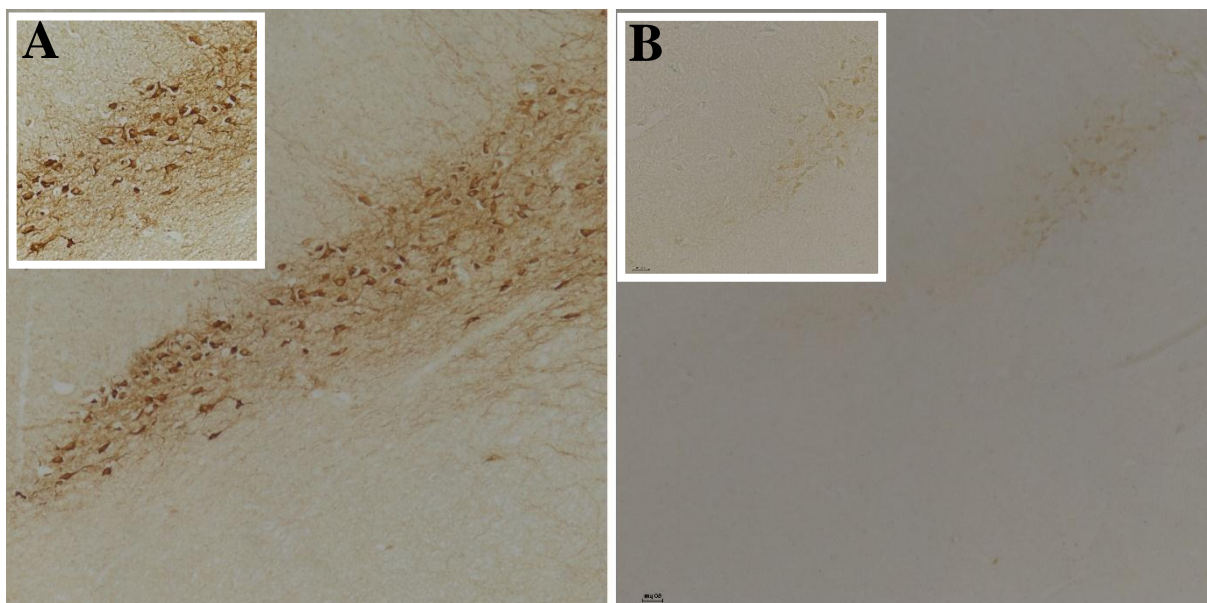
Os resultados demonstraram que os animais que receberam rotenona apresentaram um aumento na imunorreatividade para GFAP, característico para astrogliose, no estriado (% da média dos controles: CTL: $100,0 \pm 9,853\%$; ROT: $196,9 \pm 29,21\%$, $p < 0,05$) (Figura 36).

Figura 33- Efeito da rotenona sobre a sobre a imunorreatividade para TH no estriado.



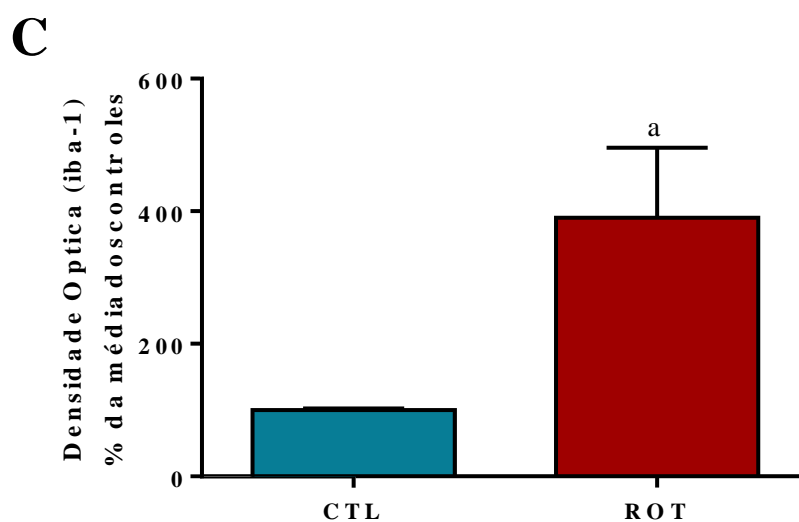
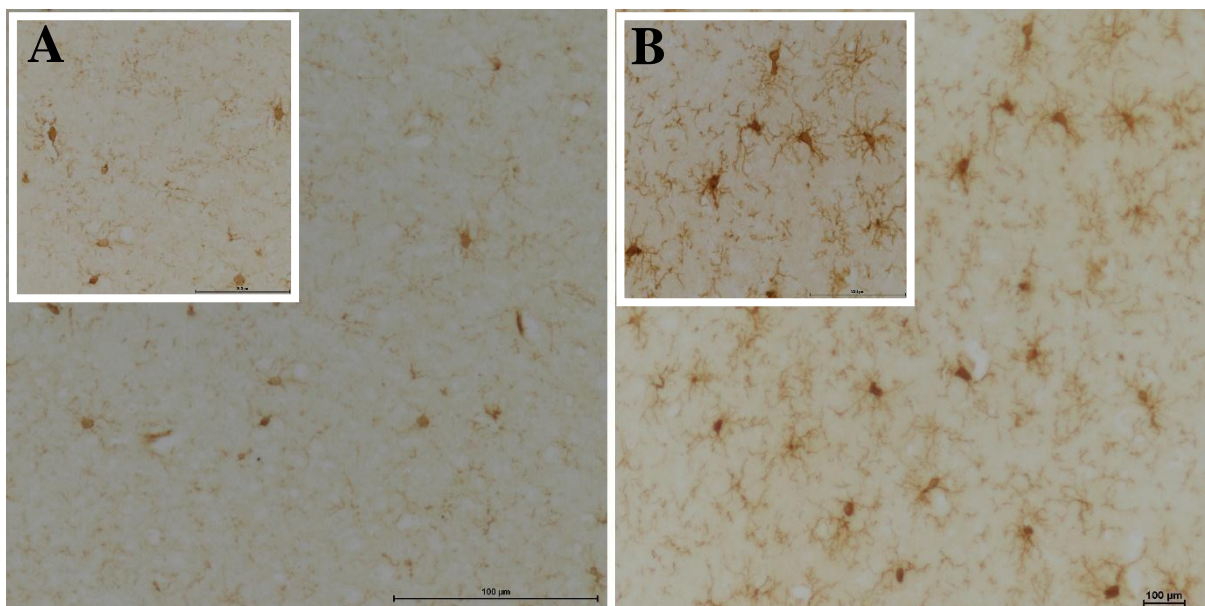
(A-B) Fotomicrografias demonstrando a imunomarcção para Tirosina Hidroxilase (TH), um marcador dopaminérgico, em seções cerebrais coronais (10 µM) do estriado (aumento 40x) em animais expostos à rotenona por 21 dias e controles (n=4). (C) Gráfico em barras mostrando a análise semi-quantitativa por densidade óptica da imunorreatividade para TH no estriado. Os valores estão representados como média ± EPM. **a** vs. CTL, $p < 0,05$, teste t de Student.

Figura 34- Efeito da rotenona sobre a sobre a imunorreatividade para TH na substância negra.



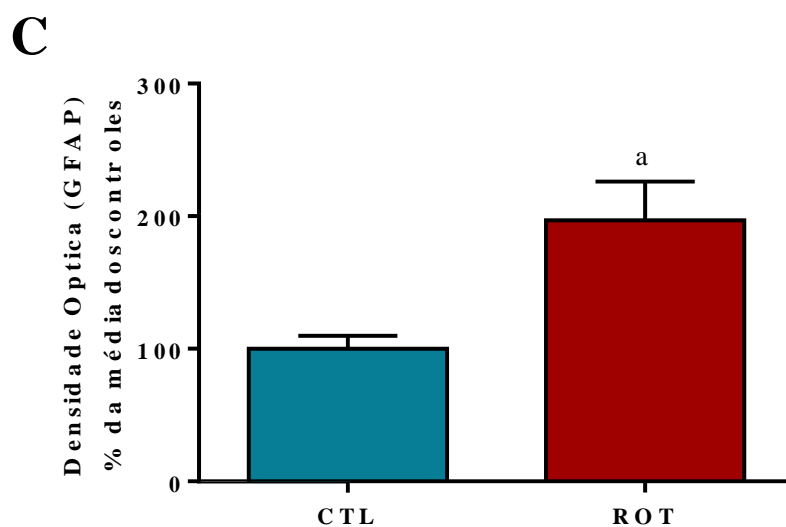
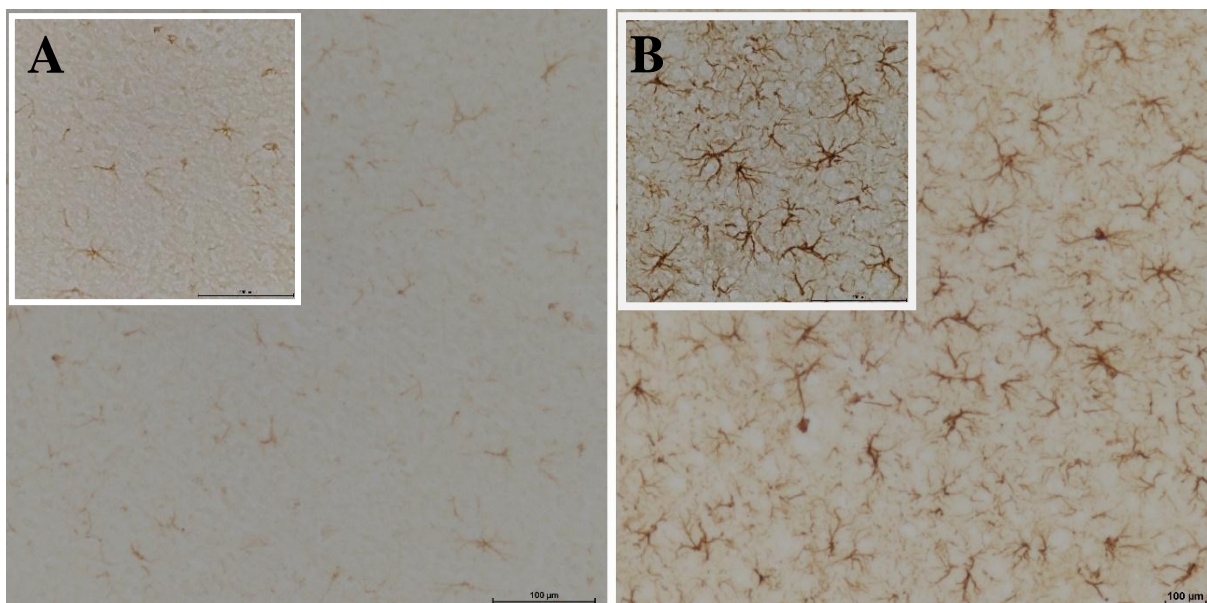
(A-B) Fotomicrografias demonstrando a imunomarcção para Tirosina Hidroxilase (TH), um marcador dopaminérgico, em seções cerebrais coronais (10 μ M) do mesencéfalo (aumento 40x), com detalhes no canto superior esquerdo (aumento 100x) em animais expostos à rotenona por 21 dias e controles (n=4). (C) Gráfico em barras mostrando a análise semi-quantitativa por densidade óptica da imunorreatividade para TH no mesencéfalo. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. CTL, $p < 0,05$, teste t de Student.

Figura 35- Efeito da rotenona sobre a imunorreatividade para iba-1.



(A-B) Fotomicrografias demonstrando a imunomarcacão para o marcador de micróglia (iba-1) em seções cerebrais coronais (10 µM) do estriado (aumento 100x), com detalhes no canto superior esquerdo (aumento 200x) em animais expostos  rotenona por 21 dias e controles (n=4). (C) Gráfico em barras mostrando a análise semi-quantitativa por densidade optica da imunorreatividade para iba-1 no estriado. Os valores estão representados como média ± EPM. **a** vs. CTL, $p < 0,05$, teste t de Student.

Figura 36- Efeito da rotenona sobre a imunorreatividade para GFAP.



(A-B) Fotomicrografias demonstrando a imunomarcção para astrócitos (GFAP) em seções cerebrais coronais (10 µM) do estriado (aumento 100x), com detalhes no canto superior esquerdo (aumento 200x) em animais expostos à rotenona por 21 dias e controles (n=4). (C) Gráfico em barras mostrando a análise semi-quantitativa por densidade óptica da imunorreatividade para GFAP no estriado. Os valores estão representados como média ± EPM. **a** vs. CTL, $p < 0,05$, teste t de Student.

4.17 Efeitos da rotenona sobre a peroxidação lipídica (T-BARS) (μM) e níveis de nitrito/nitrato (μM) no estriado, bulbo olfatório e mesencéfalo dos animais.

Na avaliação da peroxidação lipídica, o bulbo olfatório de animais expostos à rotenona por 21 dias apresentaram um aumento significativo nas concentrações de MDA em relação aos controles (CTL: $9,204 \pm 6,6595 \mu\text{M}$; ROT: $13,50 \pm 1,303 \mu\text{M}$, $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas no mesencéfalo e estriado entre os grupos (Tabela 5).

Na avaliação dos níveis de nitrito/nitrato, o mesencéfalo de animais expostos à rotenona por 21 dias apresentaram um aumento nas concentrações de nitrito em relação aos controles (CTL: $20,01 \pm 1,721 \mu\text{M}$; ROT: $37,65 \pm 5,830 \mu\text{M}$, $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas no estriado e bulbo olfatório entre os grupos (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeitos da rotenona sobre a peroxidação lipídica (T-BARS) (μM) e níveis de nitrito/nitrato (μM) no estriado, bulbo olfatório e mesencéfalo dos animais.

	ESTRIADO		MESENCÉFALO		BULBO OLFATÓRIO	
	T-BARS	Nitrito/Nitrato	T-BARS	Nitrito/Nitrato	T-BARS	Nitrito/Nitrato
CTL	$5,014 \pm 0,8815$	$83,28 \pm 17,38$	$5,069 \pm 0,9053$	$20,01 \pm 1,721$	$9,204 \pm 0,6595$	$43,75 \pm 10,23$
ROT	$7,777 \pm 1,185$	$80,01 \pm 32,84$	$6,006 \pm 0,6711$	$37,65 \pm 5,830^a$	$13,50 \pm 1,303^b$	$61,04 \pm 9,239$

Os níveis de MDA e nitrito/nitrato foram medidos à fim de avaliar o estresse oxidativo, após 21 dias de exposição à rotenona ou veículo, $n = 6$. Os valores estão representados como média \pm EPM. **a** vs. Dopamina/Estriado/CTL, **b** vs DOPA/Estriado/CTL $p < 0,05$, teste t de Student.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a rotenona (2,75mg/kg) administrada por 21 dias (via intraperitoneal) induz alterações que mimetizam os sintomas clínicos por pacientes com DP. Nos animais expostos à rotenona foram observados déficits motores, déficits na estabilidade postural e na coordenação motora. Em relação às alterações não motoras, observamos déficits na detecção de cheiro e retardo no esvaziamento gástrico que antecederam as alterações motoras, déficits na discriminação de cheiros, comportamento tipo-depressivo, déficit na memória de trabalho e déficit na retenção da memória aversiva. Corroborando com as alterações comportamentais foram observadas também uma diminuição das concentrações de DA e DOPAC, seu metabolito, no corpo estriado, perda de neurônios dopaminérgicos no estriado e substância negra, microgliose, e um quadro de estresse oxidativo no bulbo olfatório e mesencéfalo.

A utilização de pesticidas como o MPTP, paraquat e rotenona em modelos animais de DP, vem tornando-se cada vez mais popular e tem fornecido informações valiosas sobre o processo neurodegenerativo (GIASSON; LEE, 2016). O modelo da rotenona inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial resultando na degeneração específica, progressiva e crônica da via nigroestriatal e mimetiza diversos sintomas motores e não motores da doença (BETARBET *et al.*, 2000; GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018; GREENAMYRE *et al.*, 2011).

A metodologia utilizada no presente trabalho foi uma adaptação do modelo proposto por Cannon e colaboradores (2009), que demonstrou que a rotenona administrada por 21 dias consecutivos na dose de 2,75mg/kg (i.p.) era capaz de induzir déficits motores e lesão nos neurônios dopaminérgicos com poucos ou nenhum dano periférico. Contudo no modelo de indução de Cannon e colaboradores, mais de 60% dos ratos jovens, por volta de 14 dias, já apresentavam fenótipo de parkinsonismo debilitante, levando à necessidade de eutanásia dos animais, e ao final de 21 dias de administração todos os animais (100%) apresentavam sintomas severos de parkinsonismos. A adaptação do modelo de indução de parkinsonismo, com a introdução do intervalo de dois dias a cada cinco dias de aplicação, realizada no presente estudo, conseguiu diminuir a ocorrência de fenótipo debilitante que levasse à necessidade de eutanásia dos animais antes do fim do protocolo. O regime de exposição à

rotenona do presente estudo induziu uma taxa de mortalidade de 17,85%, essa taxa engloba tanto os animais mortos em decorrência da toxicidade periférica, quanto os animais sacrificados em vista do desenvolvimento do fenótipo debilitante de parkinsonismo que limitasse sua locomoção e alimentação, e ao final dos 21 dias de exposição à rotenona os animais que foram utilizados no presente estudo, embora demonstrassem fenótipo de parkinsonismo, esse não afetava sua locomoção de modo a interferir em sua alimentação.

A mortalidade induzida pela rotenona em animais pode estar associada à toxicidade por interferência na fosforilação oxidativa dos órgãos periféricos vitais que leva ao rápido desenvolvimento de fenótipo de parkinsonismo limitando sua locomoção e alimentação (SARAVANAN; SINDHU; MOHANAKUMAR, 2005).

A administração de rotenona teve ainda um impacto negativo sob o peso dos animais, principalmente no período inicial de administração, em relação ao grupo controle. Esse resultado corrobora com os resultados demonstrados nos trabalhos de Alam e Shmidt (2002) em um modelo de administração intraperitoneal de rotenona (2,5mg/kg) por 60 dias em ratos, de Cannon e colaboradores (2009) que administraram 2,75mg/kg de rotenona por via intraperitoneal por 21 dias em ratos, Betarbet (2000) que fez um tratamento por meio de bombas de liberação osmótica de 2,5 e 2,75mg/kg de rotenona na veia jugular de ratos por cinco semanas, e Bu e colaboradores (2019) em um modelo de administração subcutânea de rotenona (2,5mg/kg) por seis semanas. Essa perda de peso poderia estar associada a fosforilação oxidativa dos órgãos periféricos ou intoxicação sistêmica, contudo neste caso seria esperado um agravamento gradual desse quadro, e no presente estudo observamos uma melhora com o avançar do modelo. O modelo de parkinsonismo induzido por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) também leva à perda de peso, como é demonstrado no trabalho de Rezaee e colaboradores (2019) em um modelo de injeção de 8 µg de 6-OHDA no mesencéfalo medial, mostrando que a perda de peso presente em modelos de parkinsonismo induzidos por toxinas parece estar relacionada a outros fatores e não necessariamente à fosforilação oxidativa periférica.

De modo pioneiro mostramos que essa perda de peso, principalmente a inicial, após 3 e 7 dias de exposição à rotenona, envolve tanto perda de massa magra, quanto de gordura corporal, além de envolver um quadro de desidratação relacionado principalmente a perda de água extracelular. O teste de bioimpedância por espectroscopia já se mostrou eficiente na determinação da composição corporal de ratos, Smith e colaboradores (2009) mostraram a precisão e acurácia do teste. Essa é a primeira vez que um estudo *in vivo* demonstra a natureza da mudança corporal envolvida em modelos animais de parkinsonismo. Os mecanismos por

trás dessa perda de peso e alterações da composição corporal ainda não são conhecidos. Estudos de Betarbet e colaboradores (2009) sugerem que a perda de peso induzida por administração sistêmica de rotenona pode estar relacionada à diminuição da motilidade gastrointestinal, o trabalho de Bu e colaboradores (2019) mostra que a perda de peso pode estar associada à diminuição do trânsito e motilidade intestinal. Mecanismos centrais também parecem estar associados, os estudos de Guimarães e colaboradores (2013) demonstraram que uma lesão adicional do lócus coeruleus no modelo de parkinsonismo induzido pela injeção estriatal de 6-OHDA (1µl) acentua a perda de peso dos animais, e essa perda pode ser revertida pela estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico por meio de eletrodos.

Na clínica, a DP também apresenta um quadro de perda de peso em cerca de 65% dos pacientes, que parece estar relacionado a afagia, distúrbios gastrointestinais e mecanismos próprios do curso da doença ainda não conhecidos (CERSOSIMO *et al.*, 2018; MA *et al.*, 2018). Mecanismos centrais relacionados a perda de peso em pacientes com DP parecem estar associados a uma maior degeneração estriatal dopaminérgica (PAK *et al.*, 2018), a piora dos quadros de discinesia e psicose, além de constipação (CUMMING *et al.*, 2018). A perda de peso em pacientes com DP envolve a perda de gordura corporal total, visceral e subcutânea e massa muscular (YONG *et al.*, 2020).

A DP é clinicamente caracterizada por sintomas motores progressivos que acometem a capacidade motora, como tremor de repouso, acinesia, rigidez muscular, instabilidade e anormalidades posturais que acarretam problemas de marcha, em geral associadas a degeneração nigro-estriatal e consequente perda de dopamina (BAGLIO *et al.*, 2011; SCHRAG *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2011).

O teste do campo aberto foi realizado em diferentes tempos (0,3,7,14,21 dias de administração de rotenona), a fim de estabelecer o período o início das alterações motoras dos animais. Nesse trabalho foi observado uma diminuição significativa na atividade exploratória horizontal do animal (número de *crossings*) e vertical (número de *rearings*) após 14 e 21 dias de administração da rotenona quando comparados aos controles. Esses resultados corroboram com o período de alterações motoras observados nos estudos de Zaminelli (2013) com a administração de 2,5mg/kg de rotenona (i.p) por 15 dias em ratos e com o trabalho de Liu e colaboradores (2015) utilizando um modelo de contato ambiental em camundongos, utilizando a dose de 5mg/kg durante 28 dias. Esses trabalhos também demonstraram que a rotenona induz uma diminuição dos neurônios dopaminérgicos e dos níveis de monoaminas levando provavelmente aos déficits motores observados no presente estudo.

Também foi observado no presente estudo uma diminuição da velocidade média de

locomoção dos animais após 14 dias de indução do modelo, indicando um quadro de bradicinesia nos animais expostos à rotenona. Até o presente momento não há estudos avaliando o impacto da rotenona na velocidade do movimento de roedores, contudo Wang e colaboradores (2017) demonstraram que a rotenona é capaz de induzir a diminuição da velocidade do movimento num modelo de parkinsonismo induzido por rotenona em peixe *zebrafish*. A bradicinesia está associada às alterações nos núcleos basais, fraqueza muscular, tremor de repouso e rigidez (BERARDELLI, 2001), assim, a lentidão dos movimentos observada, se deve provavelmente à diminuição dos neurônios dopaminérgicos e níveis de monoaminas induzidos pela rotenona.

Os pacientes com DP apresentam anormalidades posturais e de equilíbrio como quedas frequentes, sensação de desequilíbrio ao caminhar e dificuldade de transição entre posições, como sentar e se levantar (ALWARDAT *et al.*, 2019; PERERA *et al.*, 2018; RAHMATI *et al.*, 2019). Em modelos experimentais com rotenona pode-se avaliar alterações na postura e equilíbrio utilizando o teste do comportamento de *rearing* (FLEMING *et al.*, 2004; CANNON *et al.*, 2009), onde as patas dianteiras utilizadas para os animais iniciarem os movimentos requerem deslocamento de peso, e assim, reajuste postural, como os necessários aos humanos ao caminhar (SHI *et al.*, 2004). A dificuldade em iniciar passos a partir da postura em pé ou a recuperação do centro de gravidade está relacionada à degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra (MEREDITH; KANG, 2006).

No presente estudo foi observado um déficit na estabilidade postural dos animais no teste do comportamento de *rearing* após 21 dias de administração da rotenona e este resultado está de acordo com estudo de Cannon e colaboradores (2009) e também com os achados do trabalho de Ogunraku e colaboradores (2019), que demonstrou que a administração intraperitoneal de rotenona (2,5mg/kg) por 25 dias em ratos, induz uma diminuição no número *rearings* no teste do comportamento de *rearing*. O teste não foi repetido semanalmente para verificar a linha do tempo de surgimento das alterações posturais em decorrência de estar sujeito a adaptação, podendo interferir nos resultados.

O teste do rotarod é usado para a avaliação da coordenação motora e o equilíbrio de roedores, que são indicadores básicos da função motora normal (BOHLEN *et al.*, 2009). O teste do rotarod foi realizado após os dias 0, 3, 7, 14 e 21 da administração de rotenona, a fim de estabelecer o período o início das alterações na coordenação motoras dos animais. Foram observados déficits na coordenação motora dos animais, com diminuição no tempo para queda, no teste do rotarod após 14 e 21 dias de indução do modelo, resultados que estão de acordo com o de Gaballah e colaboradores (2016), que demonstraram que a rotenona é capaz

de induzir déficit na coordenação motora no teste do rotarod após 21 dias de administração subcutânea numa dose de 1,5mg/kg e o trabalho de Zaitone e colaboradores (2018) que mostra que a administração subcutânea de 1mg/kg de rotenona a cada 48 horas, totalizando 9 injeções, também induz déficit na coordenação motora.

A apomorfina é um agonista dopaminérgico de ação rápida e curta duração, agindo nos receptores D1 e D2 cerebrais, utilizada no tratamento da DP (FERRAZ, 1999). Experimentalmente a apomorfina é utilizada com sucesso na averiguação da relação entre déficits motores induzidos por rotenona e a diminuição do conteúdo de dopamina nos núcleos da base, em modelos experimentais de parkinsonismo (CANNON *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2015).

No presente estudo não foram observadas melhoras no desempenho dos animais no teste do comportamento de *rearing* após a administração de apomorfina. Entretanto, no estudo de Cannon e colaboradores (2009) foi demonstrada a responsividade do déficit no comportamento de *rearing* à apomorfina, e o trabalho de Teerapattarakan e colaboradores (2018) mostra a melhora dos déficits motores causados pela administração intraperitoneal de rotenona (2,5mg/kg) por 20 dias após a administração de apomorfina, indicando a relação do déficit postural observado nesse teste e dos déficits motores causados pela rotenona com a degeneração de neurônios pré-sinápticos dopaminérgicos e a consequente diminuição do conteúdo de dopamina.

Contudo, no presente estudo, observou-se um aumento do tempo de latência para queda no teste do rotarod após a administração de apomorfina, indicando que esse déficit de coordenação motora observado no teste do rotarod induzido pela administração de rotenona está relacionado a diminuição do conteúdo de dopamina.

A injeção intracerebral de 6-OHDA também é capaz de acarretar déficits motores na atividade locomotora vertical, na coordenação motora e na estabilidade postural provavelmente devido à neurodegeneração dopaminérgica e consequente diminuição do conteúdo de dopamina (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; SOUSA, 2016), contudo os déficits motores observados no modelo de parkinsonismo induzido pela 6-OHDA não são progressivos (ZENG; GENG; JIA, 2018). A injeção aguda do MPTP é capaz de acarretar déficits motores na atividade, na coordenação motora e na estabilidade postural devido à morte de neurônios dopaminérgicos e consequente diminuição do conteúdo de dopamina, porém esses déficits não são progressivos (MEREDITH *et al.*, 2008), ainda não está completamente esclarecido se o modelo crônico de exposição ao MPTP que apresenta sintomas não motores é capaz de induzir déficits motores substanciais (VINGILL, 2018).

Os pacientes com DP também apresentam diversos sintomas não motores que pioram com a progressão da doença e podem ser mais incapacitantes que os acometimentos motores, geralmente com início anterior ao surgimento de sintomas motores (FERESHTEHNEJAD *et al.*, 2019; SCHRAG *et al.*, 2015). Assim, qualquer modelo da DP que tenta mimetizar os casos idiopáticos da doença deveria incorporar esses componentes extra-nigriais e sintomatologia não motora (MORAIS *et al.*, 2012a). Neste trabalho, evidenciamos as alterações não motoras similares as que ocorrem na DP.

As alterações olfatórias são comuns na DP, e podem anteceder os sintomas motores por anos, aparecendo cerca de 5 a 10 anos antes do surgimento desses, devido a prematura deposição de corpúsculos de Lewy no bulbo olfatório (KONNO *et al.*, 2017). A avaliação de déficits olfatórios na clínica é em geral realizadas através de testes que avaliam a identificação, discriminação e detecção de odores (XIE *et al.*, 2013). Os testes de discriminação olfatória envolvem elementos além das funções olfatórias, requerendo processamento cognitivo e de memória, já os testes de detecção de odores servem para uma avaliação bruta dos limites do função olfatória (FULLARD; MORLEY; DUDA, 2017).

O teste da discriminação olfativa baseia-se na observação de que roedores adultos preferem permanecer em ambientes impregnados com o seu próprio cheiro do que em ambientes inodoros (CARR *et al.*, 1976). No presente estudo observamos que não houve diferença no desempenho da discriminação olfatória após 7 dias de administração de rotenona, essa só foi observada após 21 dias de indução do modelo. Contudo Morais e colaboradores (2012) demonstraram que a rotenona é capaz de induzir um déficit no teste de discriminação olfatória após 7 dias de administração, utilizando um modelo de administração sistêmica por via oral numa dose de 30mg/kg. Trabalhos prévios com rotenona e 6-OHDA (uma toxina dopaminérgica) intraventriculares demonstraram prejuízo na discriminação olfatória nos cursos finais da doença (AURICH *et al.*, 2017; MENDONÇA, 2017) semelhante ao encontrado no presente trabalho.

O teste do *pellet* enterrado é baseado na tendência natural do animal de usar a função olfatória para forrageamento, e é usado para avaliar a habilidade de detecção de cheiros voláteis (YANG; CRAWLEY, 2009). No presente trabalho foi observado um déficit na capacidade de detecção de odores após 7 e 21 dias de administração de rotenona, indicativo de hiposmia, antecedendo os déficits motores. Até o presente momento esse é o primeiro estudo a demonstrar um déficit olfatório induzido por rotenona por administração intraperitoneal em ratos, bem como o primeiro a demonstrar déficit na detecção de cheiro voláteis apenas após 7 dias de administração. Liu e colaboradores (2015) demonstraram que a

rotenona é capaz de induzir déficit na detecção de cheiros voláteis, do teste do *pellet* enterrado em um modelo de contato ambiental em camundongos, numa dose de 5mg/kg, contudo apenas após duas semanas de administração.

Podemos inferir que os déficits olfatórios observados no presente estudo podem estar relacionados às alterações nos níveis de monoaminas. A 5-HT desempenha papel fundamental no processamento olfatório, as projeções serotoninérgicas são necessárias para um funcionamento normal da circuitaria do bulbo olfatório e o déficit de 5-HT pode ser atribuído a diminuição dessa substância nos núcleos da rafe e da onde partem as fibras serotoninérgicas que vão para o bulbo olfatório (FULLARD *et al*, 2017; SAITO *et al.*, 2016). O déficit de 5-HT no bulbo olfatório induzido por rotenona em associação com déficit olfatório já foram anteriormente demonstrados por Morais e colaboradores (2012) e no presente estudo embora a diminuição no conteúdo de 5-HT não tenha sido significativa, observou-se a perda de cerca de 50% do conteúdo dessa monoamina em relação ao controle, podendo ser uma possível explicação para esses déficits.

Em relação ao déficit de detecção olfatória observado antes do déficit motor, podemos supor que podem se dever à prematura deposição de corpúsculos de Lewy no bulbo olfatório alterando o funcionamento da circuitaria bulbar, uma vez que a rotenona é capaz de induzir a formação desses agregados proteicos intracelulares, e já está bem documentado que déficits olfatórios pré motores observados na DP refletem a prematura deposição de corpúsculos de Lewy no bulbo olfatório (LIMA, 2012). O mesmo resultado não foi observado na discriminação olfatória por provavelmente envolver outros elementos cognitivos, como a memória olfativa (LIU *et al.*, 2018) que em 7 dias de administração ainda não estariam comprometidos.

A injeção intracerebral de 6-OHDA também é capaz acarretar déficits olfatórios, na detecção e discriminação de cheiros, (MENDONÇA, 2017) contudo tais déficits não são progressivos e são observados apenas quando já ocorrem déficits motores. O déficit olfatório causado pelo MPTP em modelos animais ainda não está totalmente esclarecido, um vez que o protocolo que apresentou tal alteração foi através da injeção intranasal podendo assim refletir um prejuízo na mucosa nasal (TITOVA *et al.*, 2017).

A depressão ocorre em cerca de 80% dos pacientes com DP, podendo se apresentar anteriormente aos sintomas motores, e estar relacionado a danos no sistema serotoninérgico, bem como em mecanismos límbicos noradrenérgicos e dopaminérgicos (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006; MEIRELES; MASSANO, 2012).

A anedonia, perda do prazer, é um sintoma da depressão em humanos e se caracteriza pela capacidade prejudicada de sentir prazer em situações que geralmente são consideradas gratificantes (MUSSARI, 2018) e uma das maneiras de avaliá-la em modelos animais é por meio do teste de preferência por sacarose, no qual ratos com comportamento tipo-depressivo apresentam redução do consumo de sacarose (STREKALOVA *et al.*, 2004). No presente estudo observamos uma redução significativa da preferência por sacarose após 14 e 21 dias de administração de rotenona, indicando um quadro de anedonia. Nossos resultados corroboram com o observado por Morais e colaboradores (2012) que demonstraram que a exposição à 2,5 mg/kg de rotenona (i.p) por 10 dias é capaz de induzir um déficit na preferência de consumo por sacarose, e esse déficit foi associado a diminuição dos níveis de dopamina e serotonina. Esse quadro se teve portanto alterações nos níveis de monoaminas, Madiha e Haider (2019) demonstraram em seu trabalho que a administração subcutânea de rotenona (1,5mg/kg) é capaz de induzir comportamento do tipo depressivo observado através do teste de preferência por sacarose, associado a uma diminuição do conteúdo estriatal de dopamina e serotonina e o tratamento com o agente neuroprotetor, a curcumina, protegeu os animais da diminuição do conteúdo de monoaminas e preveniu o comportamento tipo depressivo, evidenciando a relação entre a diminuição desses neurotransmissores e comportamento tipo depressivo.

O comprometimento cognitivo é um dos mais frequentes sintomas não motores presentes na clínica, ocorrendo principalmente nos estágios mais avançados da doença, afetando cerca de 80% dos pacientes com DP após 20 anos da doença (MEIRELES; MASSANO, 2012). Esse comprometimento é caracterizado clinicamente por demência progressiva, prejuízos a memória e danos à função visoespacial (LYONS; PAHWA, 2011). Desse modo ao fim de 21 dias de administração da rotenona, foram realizados os testes para avaliação da memória. O teste do labirinto em Y foi utilizado para a avaliação do comprometimento da memória operacional ou de trabalho, que se baseia na tendência natural dos animais explorarem ambientes novos, envolvendo o córtex pré-frontal e hipocampo (DELLU *et al.*, 1994). E foi observado que a rotenona conseguiu induzir um déficit na memória de trabalho. O teste da esQUIVA passiva do tipo “step-down” avalia déficits de memória aversiva e se baseia no comportamento natural dos roedores explorarem todo o aparato, descendo a plataforma, porém aprendendo a evitar o choque produzido na área gradeada, esta memória aversiva depende principalmente de áreas como hipocampo, córtex parietal, estriado e amígdala (IZQUIERDO *et al.*, 1992; IZQUIERDO; MEDINA, 1997; LORENZINI, 1996). No presente estudo foi observado um déficit significativo na retenção da memória aversiva (memória tardia). Esses achados corroboram com os de Moreira e

colaboradores (2012) que demonstraram que a injeção bilateral intranigral rotenona é capaz de induzir um déficit na memória aversiva no teste da esquiva ativa de duas vias.

Podemos inferir que esses déficits de memória podem ser em parte ocasionados pela diminuição dos níveis de dopamina, uma vez que esta monoamina possui papel chave na regulação de certos estágios da aprendizagem e memória e da plasticidade sináptica (CALABRESI *et al.*, 2007; JAY, 2003). A dopamina desempenha um importante papel na modulação da memória de trabalho via interações com circuitos no córtex pré-frontal e diversos trabalhos relatam ainda a importância de receptores do tipo D1 e D2 na modulação desse tipo de memória (LIGGINS, 2009; SOLLMANN; SEIFTER, 1938). Alguns trabalhos relatam ainda a importância dos receptores dopaminérgicos na amígdala basolateral e seu envolvimento nos comportamentos de medo e ansiedade (DE LA MORA *et al.*, 2010).

Alterações na função gastrointestinal são um dos mais comuns sintomas não motores na DP, normalmente envolvendo náuseas e constipação, atingindo cerca de 60% dos pacientes com DP (LYONS; PAHWA, 2011; POSTUMA; BERG, 2019; TYSNES; STORSTEIN, 2017). Esses sintomas parecem ocorrer devido a diversas alterações do Sistema Nervoso Entérico (SNE), como a deposição de α -sinucleína nos neurônios e glia do SNE que leva a distúrbios da sinalização nervosa comprometendo a contratilidade intestinal e alterações na microbiota (CHIANG; LIN, 2019; KLINGELHOEFER; REICHMANN, 2017; PEREZ-PARDO *et al.*, 2017). Alterações no esvaziamento gástrico tem um grande impacto negativo na qualidade de vida de pacientes com doença de Parkinson bem como no tratamento da doença, uma vez que substâncias como a levodopa usada no tratamento da DP são degradadas no estômago, se o esvaziamento gástrico diminui e exposição da levodopa ao ambiente estomacal aumenta e a quantidade do fármaco disponível para o organismo é reduzida (DELENCLOS *et al.*, 2017; LYONS; PAHWA, 2011).

No presente estudo foi observado que a rotenona foi capaz de induzir um retardo no esvaziamento gástrico de líquidos observado através do retardo de esvaziamento do isótopo estável $^{13}\text{CO}_2$, que se iniciou antes do surgimento dos achados motores. No teste foi observada uma alteração no perfil de esvaziamento a partir do terceiro dia de administração de rotenona, que aumentaram significativamente com os dias de administração. Essa mudança é caracterizada pela diminuição da quantidade total de $^{13}\text{CO}_2$ (área sob a curva) após, diminuição do pico de liberação de $^{13}\text{CO}_2$ (c-máx) e um atraso no tempo do esvaziamento (t-máx). Esses déficits se mantiveram presentes nos resultados dos testes realizados após os intervalos de administração da rotenona, demonstrando que não se devem apenas ao afeito agudo da administração da rotenona. O retardo do esvaziamento de líquidos

observado no presente trabalho se deve provavelmente ao aumento da retenção gástrica induzida pela administração de rotenona após 21 dias observada no teste do esvaziamento do corante. Essa retenção não se alterou com administração previa do inibidor da bomba de prótons omeprazol, descartando a influência a mudança de pH no retardo do esvaziamento do corante. Também foi observado uma mudança no padrão de distribuição do corante no intestino, sugerindo uma disfunção da motilidade gastrointestinal que poderia explicar o aumento da retenção gástrica, porém mais estudos seriam necessários.

Greene e colaboradores (2009) demonstraram que a administração (i.p) de rotenona 3mg/kg por 28 dias pode acometer o sistema gastrointestinal em roedores, reduzindo a atividade dos neurônios inibitórios que inervam o colón proximal e retardando o esvaziamento gástrico de sólidos. Estudos também sugerem uma relação entre alterações no padrão de contratilidade do colón com a diminuição do conteúdo de dopamina e degeneração dos neurônios dopaminérgicos do sistema nervoso entérico (TASSELLI *et al.*, 2013). No colón, a dopamina endógena atua inibindo a contração muscular se ligando aos receptores D1 e D2 (LI, 2006). O trabalho de Liu e colaboradores (2015) demonstrou que a rotenona é capaz de induzir alterações na motilidade intestinal através da diminuição da contagem de bolos fecais expelidos após apenas uma semana de exposição ao pesticida, e essa alteração foi relacionada ao aumento da deposição de alfa-sinucleína no sistema nervoso entérico do íleo. Os estudos de Bu e colaboradores (2019) mostraram que a estimulação elétrica do colón proximal é capaz de reverter o atraso do trânsito intestinal causado pela administração da rotenona, atribuindo, assim, esse déficit a alterações na sinalização de neurônios excitatórios e inibitórios do SNE. Assim podemos supor que uma vez que a rotenona causa alterações na sinalização excitatória e inibitória no SNE acarretados por alterações como a deposição de alfa-sinucleína nessas células, levando a alterações da contratilidade intestinal e aumento da retenção gástrica e por consequência um retardo no esvaziamento gástrico. Contudo os mecanismos envolvidos no retardo de esvaziamento observado do presente estudo precisam ser melhor entendidos.

Os achados no presente estudo estão de acordo com a hipótese mais recente e aceita mundialmente do início da DP, o modelo *Bottom-up* proposto por Braak, em que alterações fisiopatológicas da DP se iniciaria no trato gastrointestinal e se disseminaria para o sistema nervoso central via nervo vago (BRAAK *et al.*, 2006). A injeção intracerebral de 6-OHDA também é capaz de induzir alterações gastrointestinais, contudo em um modelo *top-down* (LECLAIR *et al.*, 2020), demonstrando que as alterações gastrointestinais no modelos de Parkinson não se devem à ação direta de toxinas e sim a outros mecanismos, como estresse

oxidativo, diminuição de inervação dopaminérgica e inflamação (SAMPATH, 2016; COLUCCI *et al.*, 2012), uma vez que a 6-OHDA é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, e demonstra também a ampla conexão entre o cérebro e o TGI.

O presente estudo mostrou que a administração de rotenona diminuiu significativamente os níveis de DA e DOPAC no corpo estriado, e embora não tenha se observado significância estatística também foi observado uma depleção quase pela metade do conteúdo de DA no mesencéfalo e de 5-HT no bulbo olfatório. Nossos dados corroboram com os trabalhos prévios realizados por Alam e Schmidt (2002) e Cannon (2009) que sugerem que os neurônios dopaminérgicos sejam afetados primeiramente pela rotenona e isso levaria ao déficit motor, o que também corrobora com os dados motores observados no presente trabalho.

Os baixos níveis de dopamina também pode ser a explicação para a os déficits psicossomáticos e cognitivos observados. Como dito anteriormente, a DA desempenha um importante papel na modulação da memória de trabalho e aversiva. Lee e colaboradores (2015) avaliaram em seu estudo o efeito da diminuição de dopamina e a interconexão entre comportamento motor e depressão em ratos.

No presente estudo também foi observado que a exposição à rotenona por 21 dias causou neurodegeneração dopaminérgica observável através da diminuição da imunorreatividade para o marcador dopaminérgico tirosina hidroxilase (TH) no estriado e substância negra. Esse achado está de acordo com os estudos de Alam e Schmidt (2002) e Cannon (2009) que demonstraram a neurodegeneração no modelo de parkinsonismo induzido por rotenona (i.p) por 21 dias. A diminuição da imunorreatividade para TH explica a diminuição da concentração de dopamina e seus metabolitos observados. Essa neurodegeneração pode estar relacionada com a neuroinflamação observada no presente trabalho, demonstrada pela microgliose e astrogliose observada no estriado. Assim como pelo estresse oxidativo observado no bulbo olfatório e mesencéfalo. Esses achados estão de acordo com os trabalhos Ojha e colaboradores (2015) que demonstraram que a administração de rotenona 2,5mg/kg por 4 semanas levou a perda de neurônios dopaminérgicos associado ao aumento dos níveis neurônios positivos para GFAP e iba-1 no estriado e mesencéfalo e de peroxidação lipídica do mesencéfalo em roedores. O trabalho de Javed e colaboradores (2016) demonstrou que a rotenona levou a perda de neurônios dopaminérgicos no estriado e substância negra associado à microgliose e astrogliose no estriado e aumento da peroxidação lipídica e níveis de nitrito no mesencéfalo e estriado.

A rotenona se aloja nas células levando à inibição do complexo I da cadeia

transportadora de elétrons mitocondrial, induzindo uma cascata de eventos relacionada a estresse oxidativo e inflamação, acarretando morte celular por crise bioenergética, diminuindo o armazenamento de dopamina, levando à estresse oxidativo e inflamação (DARBINYAN *et al.*, 2017; SONIA *et al.*, 2012; THAKUR; NEHRU, 2013; YUAN *et al.*, 2015). A crise bioenergética ocasionada pelo dano mitocondrial acarreta reação microglial e ativação de astrócitos (BERNDT; HOLZHÜTTER; BULIK, 2013; JOHNSON; BOBROVSKAYA, 2015).

No presente estudo observou-se que o surgimento de todos os sintomas motores avaliados só foi observado a partir de um período de 14 dias de administração, estabelecendo um marco temporal bem definido para essa sintomatologia motora. Foi observado que o déficit de detecção olfatória após apenas 7 dias de administração, e retardo no esvaziamento gástrico de líquidos após 3 e 7 dias de exposição à rotenona, se constituindo assim como os primeiros achados de parkinsonismo observado no presente modelo, e este período pode ser usado como marco para início de tratamento com drogas elegíveis para neuroproteção. O presente trabalho demonstra ainda englobar diversos sintomas não motores, como déficits de memória e comportamento do tipo depressivo e achados histopatológicos como neurodegeneração dopaminérgica, neuroinflamação e estresse oxidativo, que são similares à fisiopatologia da DP. Vale ressaltar que os déficits motores e não não-motores observados pioram com o tempo de administração. Assim nosso trabalho demonstrou que a rotenona é capaz de induzir um modelo de parkinsonismo robusto, com achados motores e não motores numa linha temporal bem definida associada a uma fisiopatologia similar à da DP, assim representa uma excelente ferramenta na busca de novas terapias para a DP, bem como propicia meios para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos sintomas não motores da DP, com segurança aos pesquisadores.

6. CONCLUSÃO

A administração intraperitoneal de rotenona na dose de 2,75mg/kg por 21 dias induz parkinsonismo experimental em ratos numa linha temporal bem definida e esses achados se devem provavelmente à diminuição estriatal de dopamina, neurodegeneração, neuroinflamação e estresse oxidativo. Assim concluímos que a rotenona causa neurodegeneração e alterações motoras e não motoras por mecanismos que envolvem inflamação e estresse oxidativo numa linha temporal que pode ser similar a clínica da doença, sendo assim um bom modelo de parkinsonismo que pode ser utilizado na busca novas de novas substâncias neuroprotetoras bem como na compreensão da patogênese dessa doença.

REFERÊNCIAS

ALAM, M.; SCHMIDT, W. J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 136, n. 1, p. 317–324, 2002. DOI: 10.1016/S0166-4328(02)00180-8.

ALMEIDA, Maíra Nogueira De. Eficiência de um inseticida Botânico no Controle de Ninfas de *Euphalerus clitoriae* (Hemiptera: Psyllidae). **Revista Controle Biológico**, Campinas, v. 2, p. 17–21, 2010.

ALWARDAT, Mohammad; SCHIRINZI, Tommaso; DI, Giulia; FRANCO, Donatella. The effect of postural deformities on back function and pain in patients with Parkinson ' s disease. [S. l.], v. 44, p. 419–424, 2019. DOI: 10.3233/NRE-182637.

AURICH, Mariana F.; RODRIGUES, Lais S.; TARGA, Adriano D. S.; NOSEDA, Ana Carolina D.; CUNHA, Flávia D. W.; LIMA, Marcelo M. S. Olfactory impairment is related to REM sleep deprivation in rotenone model of Parkinson's disease. **Sleep Science**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 47–54, 2017. DOI: 10.5935/1984-0063.20170008.

BABA, M.; NAKAJO, S.; TU, P. H.; TOMITA, T.; NAKAYA, K.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q.; IWATSUBO, T. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **The American journal of pathology**, [S. l.], v. 152, n. 4, p. 879–84, 1998. DOI: 10.1086/281267. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1858234&tool=pmcentrez&render type=abstract>.

BAGLIO, Francesca; BLASI, Valeria; FALINI, Andrea; FARINA, Elisabetta; MANTOVANI, Federica; OLIVOTTO, Fabrizio; SCOTTI, Giuseppe; NEMNI, Raffaello; BOZZALI, Marco. Functional brain changes in early Parkinson's disease during motor response and motor inhibition. **Neurobiology of Aging**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 115–124, 2011. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.12.009. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.12.009>.

BENABID, Alim Louis; CHABARDES, Stephan; MITROFANIS, John; POLLAK, Pierre. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 67–81, 2009. DOI: 10.1016/S1474-4422(08)70291-6. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70291-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70291-6).

BERARDELLI, A. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. **Brain**, [S. l.], v. 124, n. 11, p. 2131–2146, 2001. DOI: 10.1093/brain/124.11.2131. Disponível em: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/124.11.2131>.

BERNDT, Nikolaus; HOLZHÜTTER, Herrmann Georg; BULIK, Sascha. Implications of enzyme deficiencies on mitochondrial energy metabolism and reactive oxygen species formation of neurons involved in rotenone-induced Parkinson's disease: A model-based analysis. **FEBS Journal**, [S. l.], v. 280, n. 20, p. 5080–5093, 2013. DOI: 10.1111/febs.12480.

BERRIOS, German E. Introdução à “Paralisia agitante”, de James Parkinson (1817). **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 114–121, 2016. DOI: 10.1590/1415-4714.2016v19n1p114.9.

BETARBET, Ranjita; SHERER, Todd B.; MACKENZIE, Gillian; GARCIA-OSUNA, Monica; PANOVA, Alexander V; GREENAMYRE, J. Timothy. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 3, n. 12, p. 1301–1306, 2000. DOI: 10.1038/81834.

BOHLEN, Martin; CAMERON, Andy; METTEN, Pamela; CRABBE, John C.; WAHLSTEN, Douglas. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination. **Journal of Neuroscience Methods**, [S. l.], v. 178, n. 1, p. 10–14, 2009. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.11.001.

BOVOLENTA, Tânia Maria; FELÍCIO, André Carvalho. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. **Einstein (São Paulo)**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 7–9, 2016. DOI: 10.1590/S1679-45082016ED3780. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082016000300001&lng=en&tlng=en.

BRAAK, Heiko; DE VOS, Rob A. I.; BOHL, Jürgen; DEL TREDICI, Kelly. Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 396, n. 1, p. 67–72, 2006. DOI: 10.1016/j.neulet.2005.11.012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Políticas de Saúde. Boletim Epidemiológico. **Ministério da Saúde**, [S. l.], 2006.

BU, Jin; QIAO, Xian; HE, Yunduan; LIU, Jinsong. Colonic electrical stimulation improves colonic transit in rotenone-induced Parkinson's disease model through affecting enteric neurons. **Life Sciences**, [S. l.], v. 231, n. April, p. 116581, 2019. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116581. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116581>.

C. SAMPATH, R. KALPANA, T. ANSAH, C. CHARLTON, A. HALE, K. M. CHANNON, S. SRINIVASAN, P. R. Gangula. Impairment of Nrf2- and Nitrergic-Mediated Gastrointestinal Motility in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Diseases. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

CALABRESI, Paolo; PICCONI, Barbara; TOZZI, Alessandro; DI FILIPPO, Massimiliano. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 211–219, 2007. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.001.

CANNON, Jason R.; TAPIAS, Victor M.; NA, Hye Mee; HONICK, Anthony S.; DROLET, Robert E.; GREENAMYRE, J. Timothy. A high reproducibile rotenone model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 279–290, 2009. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.01.016.A.

CARR, WJ; YEE, L.; GABLE, D.; MARASCO, E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **J Comp Physiol Psychol.**, [S. l.], v. 90, n. 9, p. 821–828, 1976.

CERSOSIMO, Maria G.; RAINA, Gabriela B.; PELLENE, Luis A.; MICHELI, Federico E.; CALANDRA, Cristian R.; MAIOLA, Ricardo. Weight Loss in Parkinson's Disease: The Relationship with Motor Symptoms and Disease Progression. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2018, n. iii, p. 1–6, 2018. DOI: 10.1155/2018/9642524.

CHAUDHURI, K. Ray; HEALY, Daniel G.; SCHAPIRA, Anthony HV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 235–245, 2006. DOI: 10.1016/S1474-4422(06)70373-8. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442206703738>.

CHEN, Jack J. Parkinson's disease: health-related quality of life, economic cost, and implications of early treatment. **The American journal of managed care**, [S. l.], v. 16 Suppl I, p. S87–S93, 2010.

CHIANG, Han-Lin; LIN, Chin-Hsien. Altered Gut Microbiome and Intestinal Pathology in Parkinson's Disease. **Journal of Movement Disorders**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 67–83, 2019. DOI: 10.14802/jmd.18067.

CLARKE, C. E.; VIEREGGE, P.; KHOSHNOOD, B.; DESCHASEAUX-VOINET, C. Effects of dyskinesias in Parkinson's disease on quality of life and health-related costs: a prospective European study. **European Journal of Neurology**, [S. l.], p. 956–963, 2005.

COLUCCI, Mario et al. Intestinal dysmotility and enteric neurochemical changes in a Parkinson's disease rat model. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, [S. l.], v. 169, n. 2, p. 77–86, 2012. DOI: 10.1016/j.autneu.2012.04.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2012.04.005>.

CUMMING, Kirsten; MACLEOD, Angus D.; MYINT, Phyo K.; COUNSELL, Carl E. Early weight loss in parkinsonism predicts poor outcomes. **Neurology**, [S. l.], v. 91, n. 6, p. 287, 2018. DOI: 10.1212/WNL.0000000000005937.

DALL'ANTONIA, Irene; ŠONKA, Karel; DUŠEK, Petr. Olfaction and Colour Vision: What Can They Tell Us about Parkinson's Disease? **Prague medical report**, [S. l.], v. 119, n. 2–3, p. 85–96, 2018. DOI: 10.14712/23362936.2018.8.

DARBINYAN, L. V.; HAMBARDZUMYAN, L. E.; SIMONYAN, K. V.; CHAVUSHYAN, V. A.; MANUKYAN, L. P.; SARKISIAN, V. H. Rotenone impairs hippocampal neuronal activity in a rat model of Parkinson's disease. **Pathophysiology**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 23–30, 2017. DOI: 10.1016/j.pathophys.2017.01.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.01.001>.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.

DE LA MORA, Miguel Pérez; GALLEGOS-CARI, Andrea; ARIZMENDI-GARCÍA, Yexel; MARCELLINO, Daniel; FUXE, Kjell. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in Neurobiology*, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 198–216, 2010. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2009.10.010.

DELENCLOS, Marion; JONES, Daryl R.; MCLEAN, Pamela J.; UITTI, Ryan J.; CLINIC, Mayo; CLINIC, Mayo; CLINIC, Mayo; CLINIC, Mayo. Biomarkers in Parkinson's disease: Advances and strategies Marion. *Department of Health and Human Services*, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2015.09.048.Biomarkers. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5120398/pdf/nihms830772.pdf>.

DELGADO, Isabella Fernandes; PAUMGARTTEN, Francisco José Roma. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 180–186, 2004. DOI: 10.1590/S0102-311X2004000100034. Disponível em: http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2004000100034&lng=en&nrm=iso&tlng=pt%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2004000100034&lng=en&nrm=iso&tlng=pt.

DELLU, F.; MAYO, W.; VALLEE, M.; LEMOAL, M.; SIMON, H. Reactivity to Novelty During Youth as a Predictive Factor of Cognitive Impairment in the Elderly - A Longitudinal-Study in Rats. [S. l.], v. 653, n. 1–2, p. 51–56, 1994.

DORSEY, ER; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, JP; BIGLAN, KM; HOLLOWAY, RG; KIEBURTZ, K. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, [S. l.], v. 68, p. 384–386, 2007. DOI: 10.1212/01.wnl.0000271777.50910.73.

DRECHSEL, D. A.; PATEL, M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, [S. l.], v. 44, n. 11, p. 1873–1886, 2008.

DUTY, Susan; JENNER, Peter. Animal models of Parkinson's disease: A source of

novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 164, n. 4, p. 1357–1391, 2011. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x.

ELBAZ, A.; CARCAILLON, L.; KAB, S.; MOISAN, F. Epidemiology of Parkinson's disease. **Revue neurologique**, [S. l.], v. 172, n. 1, p. 14–26, 2015. DOI: 10.1016/j.neurol.2015.09.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2015.09.012>.

ELKOUZI, Ahmad. **Parkinson Foundation**. 2017. Disponível em: <http://www.parkinson.org/Understanding-Parkinsons/Causes-and-Statistics/Statistics>. Acesso em: 28 abr. 2018.

ELLENBROEK, B.; COOLS, A. R. The paw test: an animal model for neuroleptic drugs which fulfils the criteria pharmacological isomorphism. **Life Science**, [S. l.], v. 42, n. c, p. 1205–1213, 1988.

EMBORG, Marina E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods**, [S. l.], v. 139, n. 2, p. 121–143, 2004. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2004.08.004.

ESTATÍSTICA, (IBGE) Instituto Brasileiro de Geografia e. Censo 2016. [S. l.], 2016.

FARGEL, Matthias; GROBE, Bernd; OESTERLE, Eberhard; HASTEDT, Claudia; RUPP, Markus. Treatment of Parkinson's disease: A survey of patients and neurologists. **Clinical Drug Investigation**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 207–218, 2007. DOI: 10.2165/00044011-200727030-00004.

FARIA, Neice Müller Xavier; FACCHINI, Luiz Augusto; FASSA, Anaclaudia Gastal; TOMASI, Elaine. Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. **Cadernos de Saúde Pública**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 1298–1308, 2004. DOI: 10.1590/S0102-311X2004000500024.

FERESHTEHNEJAD, Seyed Mohammad; YAO, Chun; PELLETIER, Amelie; MONTPLAISIR, Jacques Y.; GAGNON, Jean François; POSTUMA, Ronald B. Evolution of prodromal Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: A prospective study. **Brain**, [S. l.], v. 142, n. 7, p. 2051–2067, 2019. DOI: 10.1093/brain/awz111.

FERRAZ, Henrique Ballalai. Tratamento da Doença de Parkinson. **Rev Neurociências**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 6–12, 1999. Disponível em:

http://revistaneurociencias.com.br/edicoes/1999/RN_07_01/Pages_from_RN_07_01-2.pdf%5Cnpapers3://publication/uuid/C2589D24-4ACF-4987-A223-C09E98B3AC9C.

FLEMING, Sheila M.; ZHU, Chunni; FERNAGUT, Pierre Olivier; MEHTA, Arpesh; DICARLO, Cheryl D.; SEAMAN, Ronald L.; CHESSELET, Marie Françoise. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. **Experimental Neurology**, [S. l.], v. 187, n. 2, p. 418–429, 2004. DOI: 10.1016/j.expneurol.2004.01.023.

FRITSCH, Thomas; SMYTH, Kathleen A.; WALLENDAL, Maggie S.; HYDE, Trevor; LEO, Gary; GELDMACHER, David S. Parkinson disease: Research update and clinical management. **Southern Medical Journal**, [S. l.], v. 105, n. 12, p. 650–656, 2012. DOI: 10.1097/SMJ.0b013e318273a60d.

FULLARD, Michelle E.; MORLEY, James F.; DUDA, John E. Olfactory Dysfunction as an Early Biomarker in Parkinson's Disease. **Neuroscience Bulletin**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 515–525, 2017. DOI: 10.1007/s12264-017-0170-x.

GABALLAH, Hanaa Hibishy; ZAKARIA, Soha Said; ELBATSH, Maha M.; TAHOON, Nahid M. Modulatory effects of resveratrol on endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis and oxido-inflammatory markers in a rat model of rotenone-induced Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 251, p. 10–16, 2016. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.03.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.023>.

GABLEHOUSE. Staffing, Spending, and funding of state inland fisheries programs. **Fisheries**, [S. l.], v. 30, n. May 2016, p. 19–26, 2005. DOI: 10.1577/1548-8446(2005)30. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1577/1548-8446\(2005\)30\[11:HRIWS\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1577/1548-8446(2005)30[11:HRIWS]2.0.CO;2).

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J Neural Transm**, [S. l.], v. 103, p. 987–1041, 1996. DOI: 10.1007/BF01291788.

GIASSON, B. I.; LEE. A new link between pesticides and Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 317–324, 2016. DOI: 10.1007/s12035-012-8267-8.

GRANDI, Laura Clara; DI GIOVANNI, Giuseppe; GALATI, Salvatore. Animal models of early-stage Parkinson's disease and acute dopamine deficiency to study compensatory neurodegenerative mechanisms. **Journal of Neuroscience Methods**, [S. l.], v. 308, n. August, p. 205–218, 2018. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2018.08.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.08.012>.

GREENAMYRE, J. Timothy; CANNON, Jason R.; DROLET, Robert; MASTROBERARDINO, Pier-giorgio. Lessons from the rotenone of Parkinson's disease. **Trends in pharmacological sciences**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 141–142, 2011. DOI: 10.1016/j.tips.2009.12.006.Lessons.

GREENE, James G.; NOORIAN, Ali Reza; SRINIVASAN, Shathi. Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 2166–2171, 2009. DOI: 10.1021/nl061786n.Core-Shell.

GUIMARÃES, Joana; MOURA, Eduardo; SILVA, Elisabete; AGUIAR, Paulo; GARRETT, Carolina; VIEIRA-COELHO, Maria Augusta. Locus coeruleus is involved in weight loss in a rat model of Parkinson's disease: An effect reversed by deep brain stimulation. **Brain Stimulation**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 845–855, 2013. DOI: 10.1016/j.brs.2013.06.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2013.06.002>.

GUMBER, Anil; RAMASWAMY, Bhanu; THONGCHUNDEE, Oranuch. <p>Effects of Parkinson's on employment, cost of care, and quality of life of people with condition and family caregivers in the UK: a systematic literature review</p>. **Patient Related Outcome Measures**, [S. l.], v. Volume 10, p. 321–333, 2019. DOI: 10.2147/prom.s160843.

GUO, Xiaoyan et al. Gender and onset age-related features of non-motor symptoms of patients with Parkinson's disease - A study from Southwest China. **Parkinsonism and Related Disorders**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 961–965, 2013. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2013.06.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.06.009>.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKYD; FERREIRA, MB; MEDINA, JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behav Neural Biol**, [S. l.], v. 58, n.

1, p. 16–26, 1992.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, JH. Separate mechanisms for short-and long-term memory. **Neurobiol. Learn. Mem.**, [S. l.], v. 68, p. 285–316, 1997.

JAY, Thérèse M. Dopamine: A potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 69, n. 6, p. 375–390, 2003. DOI: 10.1016/S0301-0082(03)00085-6.

JOHNSON, Michaela E.; BOBROVSKAYA, Larisa. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: Their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. **NeuroToxicology**, [S. l.], v. 46, p. 101–116, 2015. DOI: 10.1016/j.neuro.2014.12.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2014.12.002>.

JOST, Wolfgang H.; REICHMANN, Heinz. “An essay on the shaking palsy” 200 years old". **Journal of Neural Transmission**, [S. l.], v. 124, n. 8, p. 899–900, 2017. DOI: 10.1007/s00702-017-1684-0.

KATZENSCHLAGER, Regina; LEES, Andrew J. Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. **Journal of Neurology**, [S. l.], v. 249, n. 0, p. 1–1, 2002. DOI: 10.1007/s00415-002-1204-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-002-1204-4>.

KLINGELHOEFER, Lisa; REICHMANN, Heinz. **The Gut and Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. v. 134 DOI: 10.1016/bs.irm.2017.05.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irm.2017.05.027>.

KONNO, Takuya; AL-SHAIKH, Rana Hanna; DEUTSCHLÄNDER, Angela B.; UTTI, Ryan J. Biomarkers of Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease. **International Review of Neurobiology**, [S. l.], v. 133, p. 259–289, 2017. DOI: 10.1016/bs.irm.2017.05.020.

LANG, Anthony E. Reflection and Reaction Neuroprotection in Parkinson's disease : and now for something completely different? **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 5, n. December, p. 990–991, 2006.

LECLAIR-VISONNEAU, Laurène; NEUNLIST, Michel; DERKINDEREN, Pascal; LEBOUVIER, Thibaud. The gut in Parkinson's disease: Bottom-up, top-down, or neither?

Neurogastroenterology and Motility, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 1–6, 2020. DOI: 10.1111/nmo.13777.

LEE, Joshua; LINSTER, Christiane; DEVORE, Sasha. Odor preferences shape discrimination learning in rats. **Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 127, n. 4, p. 37–54, 2015. DOI: 10.1016/bs.mcb.2015.01.016.Observing.

LEES, Andrew. An essay on the shaking palsy. [S. l.], n. April, p. 1–67, 2018. DOI: 10.1007/s00702-017-1684-0.

LEITE, CATALINA. Governo Bolsonaro já registrou 745 novos agrotóxicos; número é o maior em 15 anos. **O povo**, Fortaleza, p. 1, 2020. Disponível em: <https://www.opovo.com.br/noticias/brasil/2020/08/10/governo-bolsonaro-ja-registrou-745-novos-agrotoxicos--numero-e-o-maior-em-15-anos.html>.

LEMA TOMÉ, Carla M.; TYSON, Trevor; REY, Nolwen L.; GRATHWOHL, Stefan; BRITSCHGI, Markus; BRUNDIN, Patrik. Inflammation and α -Synuclein's Prion-like Behavior in Parkinson's Disease—Is There a Link? **Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 561–574, 2013. DOI: 10.1007/s12035-012-8267-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-012-8267-8>.

LEVY, Oren A.; MALAGELADA, Cristina; GREENE, Lloyd A. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. **Apoptosis**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 478–500, 2009. DOI: 10.1007/s10495-008-0309-3.Cell.

LEWIS, Mechelle M.; DU, Guangwei; SEN, Suman; KAWAGUCHI, Atsushi; TRUONG, Young; LEE, Seonjoo; MAILMAN, Richard B.; HUANG, Xuemei. Differential involvement of striato- and cerebello-thalamo- cortical pathways in tremor-and akinetic/rigid-predominant Parkinson's disease. **Neuroscience**, [S. l.], v. 177, p. 230–239, 2011. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.12.060.Differential.

LI, Z. S. Physiological Modulation of Intestinal Motility by Enteric Dopaminergic Neurons and the D2 Receptor: Analysis of Dopamine Receptor Expression, Location, Development, and Function in Wild-Type and Knock-Out Mice. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 2798–2807, 2006. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4720-05.2006. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4720-05.2006>.

LIGGINS, J. T. P. The roles of dopamine D1 and D2 receptors in working memory function. **McGill Science Undergraduate Research Journal**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 39–45, 2009. DOI: 10.1177/0269881103017001688.

LIMA. Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease - A Review of Clinical and Experimental Studies. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 439–449, 2012. DOI: 10.2174/187152712800792893.

LIU, Gary; PATEL, Jay M.; TEPE, Burak; MCCLARD, Cynthia K.; SWANSON, Jessica; QUAST, Kathleen B.; ARENKIEL, Benjamin R. An objective and reproducible test of olfactory learning and discrimination in mice. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], v. 2018, n. 133, p. 1–8, 2018. DOI: 10.3791/57142.

LIU, Yan; SUN, Jian Dong; SONG, Lian Kun; LI, Jing; CHU, Shi Feng; YUAN, Yu He; CHEN, Nai Hong. Environment-contact administration of rotenone: A new rodent model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 294, p. 149–161, 2015. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.07.058. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.058>.

LORENZINI, C. .. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional incativations study. **Brain Res.**, [S. l.], v. 730, p. 32–39, 1996.

LYONS, Kelly E.; PAHWA, Rajesh. The impact and management of nonmotor symptoms of Parkinson's disease. **The American journal of managed care**, [S. l.], v. 17 Suppl 1, n. october, p. S308-314, 2011. DOI: 52475 [pii]. Disponível em: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medl&NEWS=N&AN=22087551%5Cnhttp://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L560054097%5Cnhttp://sfx.bibl.ulaval.ca:9003/sfx_local?sid=EMBASE&issn=19362692&id=doi:&atitle=The.

MA, Kai et al. Weight loss and malnutrition in patients with Parkinson's Disease: Current knowledge and future prospects. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. JAN, p. 1–19, 2018. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00001.

MADIHA, Syeda; HAIDER, Saida. Curcumin restores rotenone induced depressive-like symptoms in animal model of neurotoxicity: assessment by social interaction test and

sucrose preference test. **Metabolic Brain Disease**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 297–308, 2019. DOI: 10.1007/s11011-018-0352-x.

MCCLAY, William. Rotenone Use in North America (1988–2002). **Fisheries**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 29–31, 2005. DOI: 10.1577/1548-8446(2005)30[29:ruina]2.0.co;2.

MEIRELES, Joana; MASSANO, João. Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease: Clinical features, diagnosis, and management. **Frontiers in Neurology**, [S. l.], v. MAY, n. September 2011, p. 1–15, 2012. DOI: 10.3389/fneur.2012.00088.

MENDONÇA, Ana Paula Fontenele Menezes. **Resveratrol exerce efeito neuroprotetor em animais parkinsonianos via inibição da inflamação e aumento da proteína transportadora de dopamina (DAT)**. 2017. Universidade Federal do Ceará., [S. l.], 2017.

MEREDITH, Gloria E. G. E.; SONSALLA, P. K. Patricia K.; CHESSELET, M. F. Marie-francoise. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. **Acta neuropathologica**, [S. l.], v. 115, n. 4, p. 385–398, 2008. DOI: 10.1007/s00401-008-0350-x. Animal. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/K72262180175567N.pdf%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2562277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MEREDITH, Gloria E.; KANG, Un Jung. Behavioral models of Parkinsons disease in rodents: A new look at an old problem. **Movement Disorders**, [S. l.], v. 21, n. 10, p. 1595–1606, 2006. DOI: 10.1002/mds.21010.

MEREDITH, Gloria E.; TOTTERDELL, Susan; POTASHKIN, Judith a; SURMEIER, D. James. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. **Parkinsonism Relat Disord.**, [S. l.], v. 14, n. Suppl 2, p. 1–7, 2008. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2008.04.012. Modeling.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento (BR). **Estabelece os prazos para aprovação tácita para os atos públicos de liberação de responsabilidade da Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conforme caput do art. 10 do Decreto nº 10.178, de 18 de dezemb. 2019.** Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-43-de-21-de-fevereiro-de->

2020-244958254. Acesso em: 15 ago. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), Secretaria de Políticas de Saúde. **Tratamento de Parkinson no SUS terá dois novos remédios.** 2017. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/11/tratamento-de-parkinson-no-sus-tera-dois-novos-remedios>.

MORAIS, Livia H.; LIMA, Marcelo M. S.; MARTYNHAK, Bruno J.; SANTIAGO, Ronise; TAKAHASHI, Tatiane T.; ARIZA, Deborah; BARBIERO, Janaína K.; ANDREATINI, Roberto; VITAL, Maria A. B. F. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 1081–1090, 2012. a. DOI: 10.1016/S1734-1140(12)70905-2.

MORAIS, Livia H.; LIMA, Marcelo M. S.; MARTYNHAK, Bruno J.; SANTIAGO, Ronise; TAKAHASHI, Tatiane T.; ARIZA, Deborah; BARBIERO, Janaína K.; ANDREATINI, Roberto; VITAL, Maria A. B. F. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 1081–1090, 2012. b. DOI: 10.1016/S1734-1140(12)70905-2. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70905-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70905-2).

MOREIRA, Camila G.; BARBIERO, Janaína K.; ARIZA, Deborah; DOMBROWSKI, Patrícia A.; SABIONI, Pamela; BORTOLANZA, Mariza; DA CUNHA, Claudio; VITAL, Maria A. B. F.; LIMA, Marcelo M. S. Behavioral, neurochemical and histological alterations promoted by bilateral intranigral rotenone administration: A new approach for an old neurotoxin. **Neurotoxicity Research**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 291–301, 2012. DOI: 10.1007/s12640-011-9278-3.

MUANGPAISAN, Weerasak; MATHEWS, Aju; HORI, Hiroyuki; SEIDEL, David. A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. **Journal of the Medical Association of Thailand**, [S. l.], v. 94, n. 6, p. 749–755, 2011.

MUSSARI, Martina Giulia. **Basi neurobiologiche dell'apatia e dell'anedonia nella malattia di parkinson.** 2018. Università di Parma, [S. l.], 2018.

NUSSBAUM, R. L.; ELLIS, C. E. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 348, p. 1356–64, 2003. DOI:

10.1056/NEJM2003ra020003.

OBESO, J. A. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Movement Disorders**, [*S. l.*], v. 32, n. 9, p. 1264–1310, 2017. DOI: 10.1002/mds.27115.

OGUNRUKU, Omodesola; OGUNYEMI, Bolanle; OBOH, Ganiyu; BABATUNDE, Oluwaseun; BOLIGON, Aline. Modulation of dopamine metabolizing enzymes and antioxidant status by Capsicum annum Lin in rotenone-intoxicated rat brain. [*S. l.*], v. 6, n. July, p. 795–802, 2019. DOI: 10.1016/j.toxrep.2019.07.012.

OLANOW, C. Warren; BRUNDIN, Patrik. Parkinson's Disease and Alpha Synuclein: Is Parkinson's Disease a Prion-Like Disorder? **Movement Disorders**, [*S. l.*], v. 28, n. 1, p. 31–40, 2013. DOI: 10.1002/mds.25373.

PAK, Kyoungjune; SHIN, Hae Kyung; KIM, Eun Joo; LEE, Jae Hyeok; LYOO, Chul Hyung; SON, Jongsang; LEE, Myung Jun. Weight loss is associated with rapid striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, [*S. l.*], v. 51, p. 67–72, 2018. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2018.02.044. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.02.044>.

PAL, Rituraj; MANUEL, Miranda;; MAHESH, Narayan; Nitrosative stress-induced Parkinsonian Lewy-like aggregates prevented through polyphenolic phytochemical analog intervention. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [*S. l.*], v. 404, n. 1, p. 324–329, 2011. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.117. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.117>.

PEREIRA, Duarte; GARRETT, Carolina. Risk factors for Parkinson disease: an epidemiologic study. **Acta Médica Portuguesa**, [*S. l.*], v. 23, n. 1, p. 15–24, 2010. DOI: 20353703. Disponível em: <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/599>.

PERERA, Thushara et al. Balance control systems in Parkinson's disease and the impact of pedunculopontine area stimulation. [*S. l.*], 2018. DOI: 10.1093/brain/awy216.

PEREZ-PARDO, Paula; KLIEST, Tessa; DODIYA, Hemraj B.; BROERSEN, Laus M.;

GARSSEN, Johan; KESHAVARZIAN, Ali; KRANEVELD, Aletta D. The gut-brain axis in Parkinson's disease: Possibilities for food-based therapies. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 817, n. March, p. 86–95, 2017. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.05.042. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.042>.

POSTUMA, Ronald B.; BERG, Daniela. Prodromal Parkinson's Disease: The Decade Past, the Decade to Come. **Movement Disorders**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 665–675, 2019. DOI: 10.1002/mds.27670.

RAHMATI, Zahra; SCHOUTEN, Alfred C.; BEHZADIPOUR, Saeed; TAGHIZADEH, Ghorban. Disentangling stability and flexibility degrees in Parkinson's disease using a computational postural control model. [S. l.], v. 0, p. 1–14, 2019.

RATHORE, Minakshi; BHATNAGAR, Pradeep; MATHUR, D.; SAXENA, G. N. Burden of organochlorine pesticides in blood and its effect on thyroid hormones in women. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 295, n. 1–3, p. 207–215, 2002. DOI: 10.1016/S0048-9697(02)00094-3.

REZAEI, Zeinab; MARANDI, Sayed Mohammad; ALAEI, Hojjatallah; ESFARJANI, Fahimeh; FEYZOLLAHZADEH, Sadegh. Effects of Preventive Treadmill Exercise on the Recovery of Metabolic and Mitochondrial Factors in the 6-Hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 908–917, 2019. DOI: 10.1007/s12640-019-0004-x.

ROBERTSON, D. Ross; SMITH-VANIZ, William F. Rotenone: An essential but demonized tool for assessing marine fish diversity. **BioScience**, [S. l.], v. 58, n. 2, p. 165–170, 2008. DOI: 10.1641/B580211.

ROSS, Christopher A.; SMITH, Wanli W. Gene-environment interactions in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, [S. l.], v. 13, n. SUPPL. 3, p. 309–315, 2007. DOI: 10.1016/S1353-8020(08)70022-1.

SAITO, Yuko; SHIOYA, Ayako; SANO, Terunori; SUMIKURA, Hiroyuki; MURATA, Miho; MURAYAMA, Shigeo. Lewy body pathology involves the olfactory cells in Parkinson's disease and related disorders. **Movement Disorders**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 135–138, 2016. DOI: 10.1002/mds.26463.

SALARI, S.; BAGHERI, M. In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. **Physiological Research**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 17–24, 2019. DOI: 10.33549/physiolres.933895.

SANTOS, Susanne Fonseca; DE OLIVEIRA, Hadassa Loth; YAMADA, Elizabeth Sumi; NEVES, Bianca Cruz; PEREIRA, Antonio. The gut and Parkinson's disease - A bidirectional pathway. **Frontiers in Neurology**, [S. l.], v. 10, n. JUN, p. 1–8, 2019. DOI: 10.3389/fneur.2019.00574.

SANTOS, VIVIANI LARA. **PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA DOENÇA DE PARKINSON NO BRASIL Trabalho**. 2015. CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA, [S. l.], 2015.

SARAVANAN, Karuppagounder S.; SINDHU, Kizhakke M.; MOHANAKUMAR, Kochupurackal P. Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. **Brain Research**, [S. l.], v. 1049, n. 2, p. 147–155, 2005. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.04.051.

SCHOBBER, Andreas. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 318, n. 1, p. 215–224, 2004. DOI: 10.1007/s00441-004-0938-y.

SCHRAG, Anette; HORSFALL, Laura; WALTERS, Kate; NOYCE, Alastair; PETERSEN, Irene. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: A case-control study. **The Lancet Neurology**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 57–64, 2015. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70287-X. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70287-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70287-X).

SHI, Li Hong; WOODWARD, Donald J.; LUO, Fei; ANSTROM, Kristin; SCHALLERT, Timothy; CHANG, Jing Yu. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. **Brain Research**, [S. l.], v. 1013, n. 1, p. 98–106, 2004. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.03.053.

SIQUEIRA, Soraia Lemos D. E. **Agrotóxicos E Saúde Humana : Agrotóxicos E Saúde Humana** : [S. l.], 2006.

SMITH, A. G.; GANGOLLI, S. D. Organochlorine chemicals in seafood: Occurrence and health concerns. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 767–779, 2002. DOI: 10.1016/S0278-6915(02)00046-7.

SMITH, DI; JOHNSON, Ms; NAGY, Tr. Precision and accuracy of bioimpedance spectroscopy for determination of in vivo body composition in rats. **International journal of body composition research**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 21–26, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668348><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2722071>.

SOLLMANN, Torald; SEIFTER, Joseph. The pharmacology of memory. [S. l.], p. 209–215, 1938.

SONIA ANGELINE, M.; CHATERJEE, P.; ANAND, K.; AMBASTA, R. K.; KUMAR, P. Rotenone-induced parkinsonism elicits behavioral impairments and differential expression of parkin, heat shock proteins and caspases in the rat. **Neuroscience**, [S. l.], v. 220, p. 291–301, 2012. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.021>.

SOUSA, PRISCILA CARACAS VIEIRA DE. **Efeito neuroprotetor da troxerrutina no parkinsonismo experimental induzido por 6-ohda em ratos**. 2016. Universidade Federal do Ceará, [S. l.], 2016. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ceas.12013><https://www.researchgate.net/publication/317087330><https://repositories.lib.utexas.edu/handle/2152/39127><https://cris.brighton.ac.uk/ws/portalfiles/portal/4755978/Julius+Ojebode%27s+Thesis.pdf><http://Ausir.salford.a>.

SOUZA, Cheylla Fabricia M.; ALMEIDA, Helayne Carolyne P.; SOUSA, Jomário Batista; COSTA, Pedro Henrique; SILVEIRA, Yonara Sonaly S.; BEZERRA, João Carlos L. A doença de Parkinson e o processo de envelhecimento motor: uma revisão de literatura. **Rev Neurocienc**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 718–723, 2011.

SPOTTKE, Annika E. et al. Cost of illness and its predictors for Parkinson's disease in Germany. **PharmacoEconomics**, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 817–836, 2005. DOI: 10.2165/00019053-200523080-00007.

STOCCHI, Fabrizio; TAGLIATI, Michele; OLANOW, C. Warren. Treatment of

levodopa-induced motor complications. **Movement Disorders**, [S. l.], v. 23, n. SUPPL. 3, 2008. DOI: 10.1002/mds.22052.

STREKALOVA, Tatyana; SPANAGEL, Rainer; BARTSCH, Dusan; HENN, Fritz A.; GASS, Peter. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 2007–2017, 2004. DOI: 10.1038/sj.npp.1300532.

TASSELLI, M. et al. Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. **Neurogastroenterology and Motility**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 183–193, 2013. DOI: 10.1111/nmo.12070.

TAVARES, Luís. **Neuroproteção : Abordagem na Doença de Parkinson**. 2015. Universidade da Beira do Interior, [S. l.], 2015.

TEERAPATTARAKAN, Narudol; BENYA-APHIKUL, Hattaya; TANSAWAT, Rossarin; WANAKHACHORNKRAI, Oraphan; TANTISIRA, Mayuree H.; RODSIRI, Ratchanee. Neuroprotective effect of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa233. **Phytomedicine**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.04.028. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.028>.

TEIVE, H. A. G. Etiopatogenia da Doença de Parkinson. **Revista Neurociências**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 201–214, 2005.

TEXEIRA, Róbson Ricardo. **Estudo da atividade inseticida e dos constituintes voláteis das partes aéreas (Folhas e Cascas) de *Gallesia gorazema* Moq. por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas**. 1996. Universidade Federal de Viçosa, [S. l.], 1996.

THAKUR, P.; NEHRU, B. Anti-inflammatory properties rather than anti-oxidant capability is the major mechanism of neuroprotection by sodium salicylate in a chronic rotenone model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, [S. l.], v. 231, p. 420–431, 2013. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.11.006>.

TITOVA, Nataliya; SCHAPIRA, Anthony H. V.; CHAUDHURI, K. Ray; QAMAR,

Mubasher A.; KATUNINA, Elena; JENNER, Peter. **Nonmotor Symptoms in Experimental Models of Parkinson's Disease**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. v. 133 DOI: 10.1016/bs.irm.2017.05.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irm.2017.05.018>.

TRIGO-DAMAS, Ines; DEL REY, Natalia Lopez Gonzalez; BLESA, Javier. Novel models for parkinson's disease and their impact on future drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 229–239, 2018. DOI: 10.1080/17460441.2018.1428556. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1428556>.

TYSNES, Ole Bjørn; STORSTEIN, Anette. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, [S. l.], v. 124, n. 8, p. 901–905, 2017. DOI: 10.1007/s00702-017-1686-y.

VENDEROVA, Katerina; PARK, David S. Programmed cell death in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 8, p. 1–23, 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a009365.

VILLAR, Maria Luiza Domingues. **Conteúdo endógeno de Rotenona e Pachyrhizina em Pachyrhizus tuberosus (Lam.) Spreng**. 1991. Universidade Estadual de Campinas, [S. l.], 1991.

VINGILL, Siv; CONNOR-ROBSON, Natalie; WADE-MARTINS, Richard. Are rodent models of Parkinson's disease behaving as they should? **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 352, p. 133–141, 2018. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.10.021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.021>.

WANG, Yali; LIU, Wenwen; YANG, Jing; WANG, Fen; SIMA, Yizhen; ZHONG, Zhao min; WANG, Han; HU, Li Fang; LIU, Chun Feng. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. **NeuroToxicology**, [S. l.], v. 58, p. 103–109, 2017. DOI: 10.1016/j.neuro.2016.11.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.11.006>.

WEIR, Sharada; SAMNALIEV, Mihail; KUO, Tzu Chun; TIERNEY, Travis S.; WALLESER AUTIERO, Silke; TAYLOR, Rod S.; SCHRAG, Anette. Short- and long-term cost and utilization of health care resources in Parkinson's disease in the UK. **Movement Disorders**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 974–981, 2018. DOI: 10.1002/mds.27302.

WINTER, Yaroslav et al. Costs of Parkinson's disease in Eastern Europe: A Czech cohort study. **Parkinsonism and Related Disorders**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 51–56, 2010. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2009.07.005.

WIRDEFELDT, Karin; ADAMI, Hans-Olov; COLE, Philip; TRICHOPOULOS, Dimitrios; MANDEL, Jack. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 26, n. S1, p. 1–58, 2011. DOI: 10.1007/s10654-011-9581-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10654-011-9581-6>.

WOLTERS, Erik Ch. Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, [S. l.], v. 15, n. SUPPL. 3, p. S6–S12, 2009. DOI: 10.1016/S1353-8020(09)70770-9. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70770-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70770-9).

WU, Yan Na; JOHNSON, Steven W. Rotenone potentiates NMDA currents in substantia nigra dopamine neurons. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 421, n. 2, p. 96–100, 2007. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.05.030.

XIE, Fang; FANG, Cheng; SCHNITTKKE, Nikolai; SCHWOB, James E.; DING, Xinxin. Mechanisms of permanent loss of olfactory receptor neurons induced by the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile: Effects on stem cells and noninvolvement of acute induction of the inflammatory cytokine IL-6. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 272, n. 3, p. 598–607, 2013. DOI: 10.1016/j.taap.2013.07.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.020>.

YANG, Mu; CRAWLEY, Jacqueline N. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. **Curr Protoc Neurosci.**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 8.24.1-8.24.12, 2009. DOI: 10.1002/0471142301.ns0824s48.

YONG, Voon Wei et al. Progressive and accelerated weight and body fat loss in Parkinson's disease: A three-year prospective longitudinal study. **Parkinsonism and Related Disorders**, [S. l.], v. 77, n. June, p. 28–35, 2020. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2020.06.015.

YUAN, Yu he; YAN, Wen fen; SUN, Jian dong; HUANG, Ju yang; MU, Zheng; CHEN, Nai Hong. The molecular mechanism of rotenone-induced α -synuclein aggregation:

EMPHASIZING the role of the calcium/GSK3 β pathway. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 233, n. 2, p. 163–171, 2015. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.11.029. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.11.029>.

ZAITONE, Sawsan A.; AHMED, Eman; ELSHERBINY, Nehal M.; MEHANNA, Eman T.; EL-KHERBETAWY, Mohammed K.; ELSAYED, Mohamed H.; ALSHAREEF, Duha M.; MOUSTAFA, Yasser M. Caffeic acid improves locomotor activity and lessens inflammatory burden in a mouse model of rotenone-induced nigral neurodegeneration: Relevance to Parkinson's disease therapy. **Pharmacological Reports**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.pharep.2018.08.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.08.004>.

ZAMINELLI, Tiago. Efeito tipo-antidepressivo e anitoxidante do ibuprofeno no Modelo da doença de Parkinson induzido por administração de rotenona intraperitoneal em ratos. [S. l.], p. 66, 2013.

ZENG, Xian Si; GENG, Wen Shuo; JIA, Jin Jing. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN Neuro**, [S. l.], v. 10, 2018. DOI: 10.1177/1759091418777438.

ZHANG, Qiu Shuang; HENG, Yang; MOU, Zheng; HUANG, Ju Yang; YUAN, Yu He; CHEN, Nai Hong. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S. l.], v. 38, n. 10, p. 1317–1328, 2017. a. DOI: 10.1038/aps.2017.49. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2017.49>.

ZHANG, Zhen Nian et al. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. **Brain Research**, [S. l.], v. 1655, n. June 2016, p. 104–113, 2017. b. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.11.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.020>.