



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Nei Daniel de Souza Peres

**Influência do sexo sobre as alterações motoras e emocionais induzidas pela
administração intranasal de dibam em camundongos**

Florianópolis

2021

Nei Daniel de Souza Peres

Influência do sexo sobre as alterações motoras e emocionais induzidas pela administração intranasal de dibam em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel Prediger

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Peres, Nei Daniel de Souza Peres

Influência do sexo sobre as alterações motoras e emocionais induzidas pela administração intranasal de dibam em camundongos / Nei Daniel de Souza Peres Peres ; orientador, Rui Daniel Prediger, 2021.

85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Dibam. 3. Pesticidas. 4. Depressão. 5. Doença de Parkinson. I. Prediger, Rui Daniel. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Neurociências. III. Título.

Nei Daniel de Souza Peres

Influência do sexo sobre as alterações motoras e emocionais induzidas pela administração intranasal de dibam em camundongos.

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa, Dra. Marissa Giovanna Schamne

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas - UEPG

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira

Programa de Pós-graduação em Neurociências – Centro de Ciências Biológicas -
UFSC

Prof. Dr. Nelson de Mello

Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Rui Daniel Prediger

Orientador

Florianópolis, 2021.

*À Sirlei, Carlos e Ana.
Minha família.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, por permitir que nascesse em mim a paixão pelo conhecimento, pelas descobertas e pela ciência, por sempre acreditar nas minhas empreitadas, pelo incentivo e por todo o suporte que só um ambiente de muito amor, carinho e compreensão poderia proporcionar.

Ao professor Dr. Rui Daniel Prediger, por ter me aceitado em seu laboratório, pela sua amizade, paciência e sabedoria dos seus ensinamentos que tanto contribuíram para a elaboração deste trabalho e sem dúvida serão levados e aplicados por toda a minha carreira científica.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, pela sua dedicação em proporcionar um ensino de excelência, por estarem sempre dispostos à discussão científica e repassar seus conhecimentos levando em conta a pluralidade desta área multidisciplinar tão relevante.

Aos professores Dr. Aderbal Silva Aguiar Júnior, Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira Dr^a. Manuella Pinto Kaster, Dr. Marcelo Farina, Dr^a. Marissa Schamne, Dr. Nelson Mello, por terem contribuído tanto na avaliação do projeto quanto no aprimoramento deste trabalho.

Às colegas de laboratório que se tornaram amigas e amigo para a vida toda, Ana, Andréia, Ângela, Bruna, Cibele, Dayse, Fernanda, Gislaine, Juliana, Katiane, Marcela, Marcelo, Marina, Naiani e Samantha. Pelo convívio agradável e por também terem contribuído para o meu aprendizado durante este processo.

Aos colegas do PPG Neuro que também se tornaram grandes amigos, são tantos que certamente não recordarei todos, porém seus rostos certamente me remontam à boas lembranças.

Aos funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina, que com dedicação e eficiência mantém o primor do ensino e pesquisa desta instituição tão prestigiada.

Às agências de fomento FAPESC, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro a este trabalho e meu aprendizado.

E por último, porém sem renegar a máxima importância a que devo neste trabalho, aos animais de laboratório que participaram desta pesquisa, e tantos outros que estão por aí, salvando milhões de vidas, todos os dias.

Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.

Carl Sagan

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) atinge aproximadamente 1-2% da população mundial acima dos 60 anos. Os principais sintomas da DP são alterações motoras (rigidez, tremores e bradicinesia) que se manifestam quando 60-70% dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal estão degenerados. A depressão, além de ser um sintoma não motor, é a principal comorbidade da DP, podendo ter início anos antes do aparecimento dos sintomas motores, afetando entre 35-40% dos pacientes, sendo a sua prevalência superior em mulheres. Além disso, a exposição a contaminantes ambientais, como o fungicida dimetilditiocarbamato de sódio (dibam), aumenta os riscos do desenvolvimento da DP e a sua administração intranasal (i.n.) em roedores induz prejuízos motores e neurodegeneração dopaminérgica semelhantes aos observados na DP. O objetivo principal do presente estudo foi investigar a influência do sexo sobre o desenvolvimento de alterações motoras e emocionais em camundongos induzidas pelo dibam. Camundongos Swiss adultos machos e fêmeas receberam a administração i.n. de dibam (1 mg/narina) em dois dias consecutivos e foram submetidos durante 14 dias a duas baterias de testes comportamentais (grupos independentes de animais) para a avaliação de alterações motoras (testes do escore neurológico de severidade, campo aberto, haste vertical e rotarod) e emocionais (testes da suspensão pela cauda, preferência por sacarose e nado forçado). Os resultados indicam que o protocolo utilizado de tratamento com dibam não alterou a função motora e os comportamentos do tipo-hedônicos dos animais, independente do sexo destes. Por outro lado, foi observada uma maior vulnerabilidade das fêmeas ao desenvolvimento de comportamentos do tipo-depressivo avaliados no teste do nado forçado. O presente estudo é pioneiro em demonstrar a influência do sexo sobre o desenvolvimento de sintomas não motores da DP em camundongos expostos ao dibam pela via i.n.. Os resultados obtidos reforçam a importância da utilização de fêmeas no estudo dos sintomas depressivos em modelos animais da DP.

Palavras-chave: Dibam; Intranasal; Sexo; Macho; Fêmea; Camundongo; Depressão; Doença de Parkinson.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) affects approximately 1-2% of the world population over 60 years. The main symptoms of PD are motor impairments (resting tremors, rigidity and bradykinesia) that manifest when about 60-70% of dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway are degenerated. Depression is a non-motor symptom and the main comorbidity of PD that can begin many years before the onset of motor symptoms, affecting about 35-40% of patients, with a higher prevalence in women. In addition, exposure to environmental contaminants, such as the sodium dimethyldithiocarbamate fungicide (dibam), increases the risks of developing PD and the intranasal (i.n.) administration of dibam in rodents induces motor deficits and dopaminergic neurodegeneration similar to those seen in PD. The main objective of the present study was to investigate the influence of sex on the development of motor and emotional changes in mice induced by dibam. Adult Swiss male and female mice received i.n. administration of dibam (1 mg / nostril) on two consecutive days and during 14 days the animals were submitted to two batteries of behavioral tasks (independent groups of animals) for the evaluation of motor (neurological severity score, open field, pole and rotarod tests) and emotional (tail suspension, sucrose preference and forced swimming tests) alterations. The results indicate that the current protocol of dibam exposure did not alter the motor function and the hedonic-like behaviors of the animals, regardless of their sex. On the other hand, a higher vulnerability of females to the development of depressive-like behaviors was observed in the forced swimming test. The present study is the pioneer in demonstrating the influence of sex on the development of non-motor symptoms of PD in mice exposed to dibam. These results reinforce the importance of using females in the study of depressive symptoms in animal models of PD.

Keywords: Dibam; Intranasal; Sex; Male; Female; Mouse; Depression; Parkinson's disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação anatomopatológica da substância negra em indivíduos com e sem o diagnóstico da doença de Parkinson.	17
Figura 2 - Representação esquemática dos núcleos da base responsáveis pelo controle motor em condição normal e na doença de Parkinson.....	19
Figura 3 – Taxas de incidência e prevalência da doença de Parkinson em homens e mulheres.....	22
Figura 4 – Principais efeitos deletérios neuronais causados por alguns pesticidas em comparação com o MPTP.....	27
Figura 5 – Moléculas de ditiocarbamatos capazes de formar complexos metálicos com efeitos deletérios em funções celulares.....	28
Figura 6 – Representação esquemática dos mecanismos de ação do Dibam em um neurônio dopaminérgico.....	30
Figura 7 - Ilustração das vias de condução de xenobióticos ao SNC após a exposição intranasal.....	37
Figura 8 – Linha do tempo experimental do protocolo 1 utilizado para a avaliação motora.	47
Figura 9 – Linha do tempo experimental do protocolo 2 utilizado para a avaliação dos comportamentos tipo-depressivo e anedônico.....	48
Figura 10 - Ilustração representando a troca de garrafas no teste de preferência pela sacarose.....	54
Figura 11 – Efeitos dos primeiros 8 dias após a exposição ao Dibam, no estado neurológico geral, aspectos motores e comportamento tipo ansioso de camundongos fêmeas e machos.....	57
Figura 12 – Efeitos tardios a partir do dia 9 após a exposição ao Dibam, no estado neurológico geral, aspectos motores e comportamento tipo ansioso de camundongos fêmeas e machos.....	59
Figura 13 – Efeitos dos primeiros 7 dias após a exposição ao Dibam em parâmetros relacionados ao comportamento tipo-depressivo e ansioso, além de aspectos locomotores.....	61
Figura 14 – Efeitos tardios da exposição ao Dibam em parâmetros relacionados ao comportamento tipo-depressivo.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sumário dos estudos investigando os efeitos da administração intranasal de diferentes pesticidas em roedores.....	40
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da função neurológica geral dos animais realizada através do ENS	51
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDH – Aldeído desidrogenase

ANOVA – Análise de variância

BHE – Barreira hematoencefálica

CEUA – Comissão de Ética Para Uso de Animais

Dibam – Dimetilditiocarbamato de sódio

DMDC – Dimetilditiocarbamato

DOPAC – Ácido 3,4-diidroxifenilacético

DOPAL – 3,4-diidroxifenil acetaldeído

DP – Doença de Parkinson

EDL – Estriado dorsolateral

EPI – Equipamento de proteção individual

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GPE – Globo pálido externo

GPi – Globo pálido interno

i.p. – Intraperitoneal

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

iMAO – Inibidor da monoaminaoxidase

ISRS – Inibidor seletivo de recaptção de serotonina

LEXDON – Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas

LPS - Lipopolisacarídeo

Maneb – etileno bis-ditiocarbamato de manganês

MAO – Monoaminaoxidase

MPTP – 1-metil,4-fenil,1,2,3,6-tetrahidropiridina

NST – Núcleo subtalâmico

OMS – Organização Mundial da Saúde

SNC – Sistema nervoso central

SN_{PC} – Substância negra parte compacta

Str – Estriado

TCE – Traumatismo cranioencefálico

TH – Tirosina hidroxilase

Th – Tálamo

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

VMAT – Transportador vesicular de monoaminas

Ziram – Dimetilditiocarbamato de zinco

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	29
1.2 A DOENÇA DE PARKINSON.....	15
1.1.1 Breve histórico	15
1.1.2 Fisiopatologia	18
1.1.3 Epidemiologia.....	20
1.1.4 Etiologia	22
1.1.5 Sintomas	31
1.2 DEPRESSÃO: SINTOMA E COMORBIDADE NA DP	32
1.3 EXPOSIÇÃO INTRANASAL A XENOBIÓTICOS E A HIPÓTESE DA VETORIZAÇÃO OLFATÓRIA NA DOENÇA DE PARKINSON	36
1.3.1 Exposição aos pesticidas como fator de risco para a DP.....	37
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	45
3 OBJETIVOS	45
1.1 3.1 OBJETIVO GERAL.....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 ANIMAIS.....	46
4.2 ADMINISTRAÇÃO I.N. DO DIBAM	46
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL	47
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	49
4.4.1 Rotarod	49
4.4.2 Escore neurológico de severidade (ENS)	50
4.4.3 Teste do campo aberto	52
4.4.4 Teste da haste vertical	52
4.4.5 Borrifagem com sacarose	53
4.4.6 Suspensão pela cauda.....	53
4.4.7 Teste de preferência pela sacarose	53
4.4.8 Nado forçado.....	54
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
5 RESULTADOS	56
5.1 PARÂMETRO MOTOR	56
5.2 COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO	60
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	66

8 PERSPECTIVAS.....	67
9 REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.2 A DOENÇA DE PARKINSON

1.1.1 Breve histórico

A doença de Parkinson (DP) foi uma das primeiras doenças neurológicas a ser descrita. Em 1817, o médico inglês James Parkinson realizou a primeira caracterização da doença como um distúrbio neurológico no estudo intitulado “Ensaio da paralisia agitante” (do inglês, “*An assay on the shaking palsy*”). O estudo consistiu no relato de seis pacientes com a percepção e funções cognitivas normais, porém, com sintomas motores semelhantes entre si, incluindo a lentidão nos movimentos (bradicinesia), perda da autonomia na execução dos movimentos, tremores em repouso nos membros superiores, disfunção postural e marcha festinante. Parkinson também postulava que a paralisia descrita tinha sua possível origem à partir de traumatismos na coluna cervical, especificamente na junção com a medula oblonga (PARKINSON, 2002; TEIVE, 1998). Ao longo da história, acompanhando os avanços da investigação científica até os dias atuais, muitos estudos revelaram a complexidade da doença, descrevendo novas características como manifestações clínicas, alterações neuropatológicas, sistêmicas e biomoleculares.

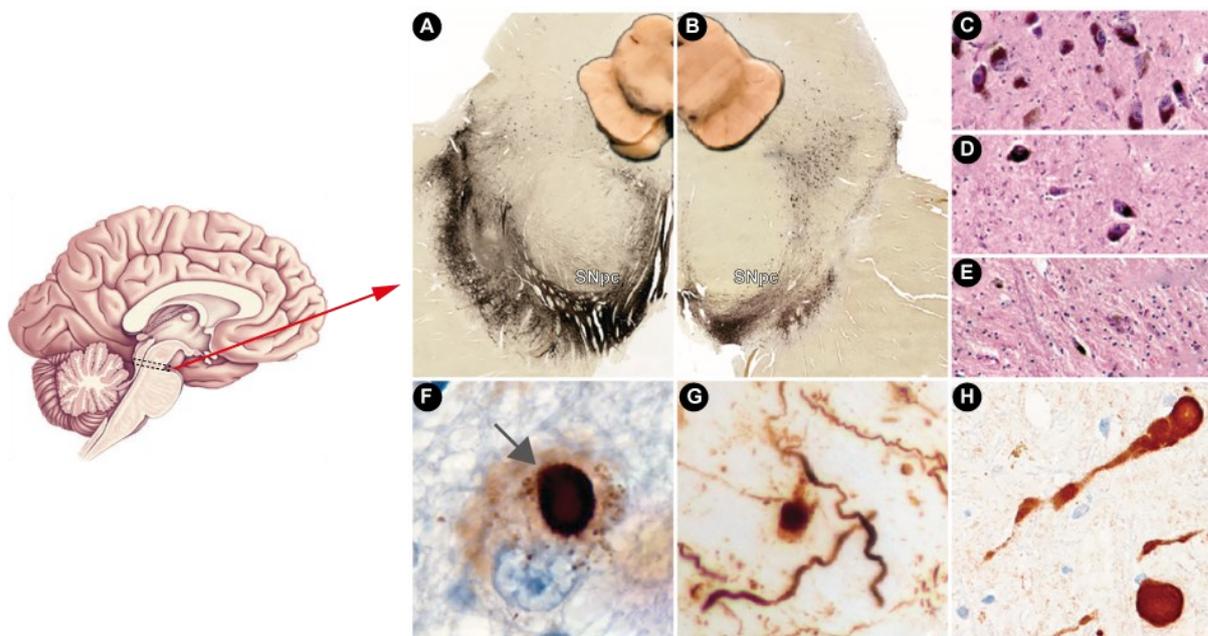
No final no século XIX, cinquenta anos após a descrição pioneira realizada por James Parkinson, o médico francês Jean-Martin Charcot, considerado um dos fundadores da neurologia moderna, em um de seus vários estudos sobre as doenças do sistema nervoso central (SNC), fez a primeira distinção da DP em relação à esclerose múltipla, que também causava sintomas semelhantes. Charcot observou que os tremores dos pacientes com a DP eram de maior amplitude na condição de repouso, enquanto que na esclerose múltipla os tremores eram constantes (CHARCOT, 1886). Charcot ainda viria a contribuir com o estudo da doença notando que alguns pacientes com suspeita da DP também apresentavam características atípicas como a postura ereta ao invés de curvada e ausência de tremor. Também propôs o primeiro tratamento farmacológico para a DP através do uso de extratos da planta *Atropa belladonna*, que possui dentre os seus princípios ativos a atropina, uma substância com efeitos anticolinérgicos, ou seja, apresenta ação antagonista dos receptores muscarínicos para acetilcolina (CHARCOT, 1886). Seu estudo levou tanto

à compreensão da multiplicidade de mecanismos patológicos quanto à existência de prejuízos cognitivos e estabeleceu a caracterização de sinais cardinais da doença, como a bradicinesia, tremor de repouso e rigidez muscular, que são utilizados até a atualidade no diagnóstico clínico da DP (PRZEDBORSKI, 2017; TEIVE, 1998).

Em 1894, o neurologista Édouard Brissaud (1852 – 1909), um dos alunos e sucessores de Charcot no Departamento de Neurologia do Hospital La Salpêtrière em Paris, sugeriu pela primeira vez em uma de suas palestras que a substância negra poderia estar envolvida na fisiopatologia da DP (BRISAUD, 1899; MARQUES, *et al.*, 2018). Esta suposição teve como base um estudo neuropatológico conduzido em 1893 por Paul Blocq (1860 – 1896) e Georges Marinesco (1863 – 1938) num paciente com Parkinsonismo unilateral sob a supervisão de Charcot, onde encontraram um tuberculoma encapsulado na região contralateral do mesencéfalo, lesionando parte da substância negra (BLOCQ; MARINESCO, 1893; HOLDORFF, 2019). Esta afirmação viria a ser confirmada vinte e cinco anos depois na tese de doutorado de Konstantin Trétiakoff (1892 – 1958) através de uma análise anatomopatológica post mortem de 54 encéfalos de pacientes com doenças neurológicas no laboratório do La Salpêtrière sob a supervisão de professor Pierre Marie (1853 – 1940), outro ex-aluno de Charcot. Foi observada uma diminuição significativa da região pigmentada da substância negra (Figura 1, A e B) e também a presença de corpos de Lewy (TRETIAKOFF, 1919). Estas estruturas neurofibrilares foram descritas pioneiramente pelo neurologista alemão Fritz Henrich Lewy (1885 – 1950) em 1912, que as observou no citoplasma de neurônios do núcleo dorsal do nervo vago e substância inominada (LEWY, 1912). Embora tenha citado a observação dessas estruturas em pacientes Parkinsonianos, não atentou para o fato de que a presença dos corpos de Lewy poderiam representar um marcador neuropatológico da DP (HOLDORFF, 2019; PRZEDBORSKI, 2017).

Estas descobertas feitas no Hospital Salpêtrière no final do século XIX e início do século XX foram decisivas para a compreensão das principais características neuropatológicas da DP. A substância negra parte compacta (SNpc) é uma região rica em neurônios dopaminérgicos contendo neuromelanina, um subproduto resultante da atividade catecolaminérgica (BOGERTS, 1981). Estes neurônios se destacam das demais regiões adjacentes pela sua coloração particularmente escura (Figura 1, A). Na DP, ocorre a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc, diminuindo também a sua pigmentação (SCHAPIRA, 2009).

Figura 1 – Representação anatomopatológica da substância negra em indivíduos com e sem o diagnóstico da doença de Parkinson.



Legenda: A despigmentação de neurônios dopaminérgicos contendo neuromelanina pode ser observada através da comparação entre as fatias transversais da SNpc de uma pessoa saudável (A) e de um indivíduo com diagnóstico da DP. Nos quadros C ao E podem ser observadas fatias com marcações imuno-histoquímicas seletivas para tirosina hidroxilase (TH), enzima essencial para síntese de dopamina, indicando a distribuição normal de neurônios dopaminérgicos em um indivíduo saudável (C) e a neurodegeneração em diferentes estágios da doença (D-E). Imunomarcações para os corpos de Lewy podem ser observados em forma intracelular no quadro F (flecha) com pequenos pontos granulares mais difusos do mesmo conteúdo ao redor (F-G). Os corpos de Lewy também podem se distribuir pelos axônios, como observado na figura H. *Fonte:* (BEAR, 2017; POEWE *et al.*, 2017).

Na década de 1950, chamada de “era de ouro” da psicofarmacologia, com o avanço nos estudos sobre sinapses químicas e o desenvolvimento de drogas com ação monoaminérgica (LOPEZ-MUNOZ; ALAMO, 2009), um trabalho conduzido pelo farmacologista sueco Arvid Carlsson (1923-2018) e colaboradores apontou pela primeira vez a dopamina como um neurotransmissor de fato, não apenas como um precursor na síntese de noradrenalina. No mesmo estudo foi demonstrada a correlação entre atividade dopaminérgica no SNC e atividade motora através da injeção intravenosa de reserpina (5 mg/kg), um inibidor do transportador vesicular de monoaminas (VMAT) que leva a depleção de dopamina no estriado destes animais, resultando em hipolocomoção, sendo esta revertida através da administração de L-diidroxifenilalanina (L-DOPA), um precursor da dopamina (CARLSSON, 1959).

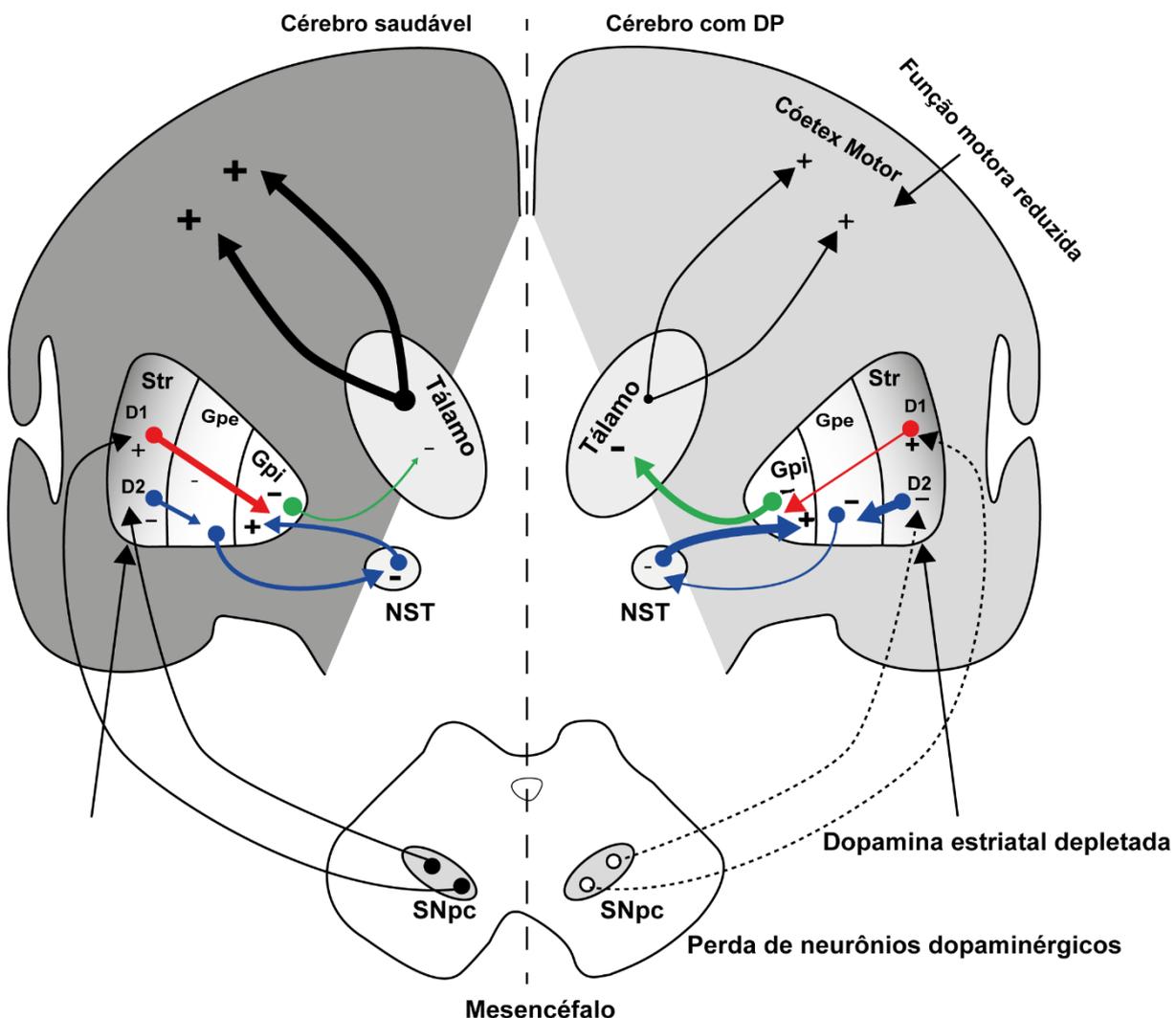
Posteriormente, este precursor foi utilizado pelo médico grego George Cotzias (1918 – 1977) para o tratamento dos sintomas motores dos pacientes Parkinsonianos, obtendo bons resultados e consolidando a L-DOPA como o principal fármaco usado no tratamento da DP (GOETZ, 2011).

1.1.2 Fisiopatologia

Atualmente é conhecido que a neurotransmissão dopaminérgica em estruturas que compõem os núcleos da base apresenta um papel chave no controle dos movimentos voluntários, sendo que a redução nos níveis de dopamina no estriado está diretamente envolvida no aparecimento dos sintomas motores da DP. A SNpc envia projeções neuronais dopaminérgicas para os núcleos da base que modulam a execução dos movimentos voluntários e estão divididas em três vias principais: direta, indireta e hiperdireta. Na via direta, a facilitação do movimento se dá pela ativação do tálamo que envia sinais excitatórios ao córtex. Esta sinalização é estimulada pela ativação de receptores dopaminérgicos estriatais do tipo D1. Na via indireta, os sinais excitatórios no estriado vindos do tálamo são inibidos através da ativação dos receptores D2 para dopamina. A via hiperdireta envia sinais do córtex diretamente para o núcleo subtalâmico (NST) onde, assim como na via indireta, a execução do movimento é inibida (BLANDINI *et al.*, 2000; NAMBU *et al.*, 1996).

Quando ocorre a degeneração de neurônios dopaminérgicos na DP, as vias direta e indireta são as mais afetadas. Na via direta, os sinais talâmicos excitatórios são reduzidos e na via indireta ocorre a redução dos neurônios inibitórios via receptores D2, levando a uma ativação excessiva da substância negra parte reticulata (SNpr), resultando em déficits motores (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática dos núcleos da base responsáveis pelo controle motor em condição normal e na doença de Parkinson.



Legenda: Funcionamento normal dos núcleos da base representados pelo desenho esquemático à esquerda. Os neurônios dopaminérgicos aferentes da substância negra parte compacta (SNpc) se conectam e ativam neurônios GABAérgicos com expressão majoritária de receptores dopaminérgicos do tipo D1, que inibem os neurônios com maior expressão dos receptores D2. Esta estrutura no estriado (Str) após ser ativada pela SNpc, se projeta de forma direta (seta vermelha) ao globo pálido interno (GPI) provocando a inibição desta estrutura e favorecendo a atividade motora, pois o GPI mantém um sinal de inibição tônica (seta verde) do tálamo (Th). Na via indireta, as projeções estriatais contendo neurônios com expressão de receptores inibitórios D2 (seta azul) se conectam ao globo pálido externo (GPe). Esta estrutura mantém a inibição tônica do núcleo subtálamico (NST) e quando recebe sinais inibitórios do estriado, libera o NST que ativa o GPI para manter a inibição tônica do tálamo. Na representação do circuito de um paciente com a DP ao lado direito, a diminuição do aporte de dopamina na via direta, diminui o sinal de inibição do estriado ao GPI que resulta em um sinal mais robusto de inibição do tálamo. Enquanto na via indireta a baixa disponibilidade de dopamina nos receptores D2 no

estriado resulta em maior sinal de inibição ao GPe, conseqüentemente, o sinal de inibição ao NST enfraquece, fazendo com que a estrutura ative o tálamo de forma mais intensa. Esta alteração promove o aparecimento de movimentos involuntários. *Fonte:* Adaptado de (PRZEDBORSKI, 2017; SUBRAMANIAM; FEDEROFF, 2017).

Vários mecanismos intracelulares estão envolvidos no processo de morte celular na DP. A formação dos corpos de Lewy, que apesar de não ser um marcador específico para a DP, pois também são observados em idosos saudáveis, está entre os principais mecanismos de neurodegeneração da doença. Os agregados de proteínas que formam os emaranhados são compostos principalmente por α -sinucleína e ubiquitina que se acumulam na DP devido à falhas nos mecanismos de homeostase proteica celular, que podem ocorrer pelo déficit no processo de degradação, superprodução, ou pela má formação destas proteínas (EMMANOULIDOU; STEFANIS; VEKRELLIS, 2010; SOLDNER *et al.*, 2016; SPILLANTINI *et al.*, 1997).

O processo de degradação da α -sinucleína é realizado pelo sistema ubiquitina-proteassoma e autofagia lisossomal (BRUNDIN *et al.*, 2008). Diversas evidências apontam para a existência de um ciclo vicioso entre disfunção mitocondrial e alterações nos sistemas de degradação proteica, que levam ao acúmulo desta proteína. As alterações nas cadeias de transporte de elétrons induzem ao stress oxidativo mitocondrial, resultando na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que interagem com os sistemas de manutenção da proteostase no citoplasma. (PARK; DAVIS; SUE, 2018; SCHAPIRA, 2007). O aumento de EROs pode também iniciar o processo de morte celular por meio da ativação de caspases que, por sua vez, ativam a micróglia que atua de forma ambivalente, eliminando os detritos gerados pela apoptose dos neurônios dopaminérgicos, mas por outro lado, liberando mediadores imunes e citocinas inflamatórias que ampliam o processo neurodegenerativo (ROCHA; DE MIRANDA; SANDERS, 2018).

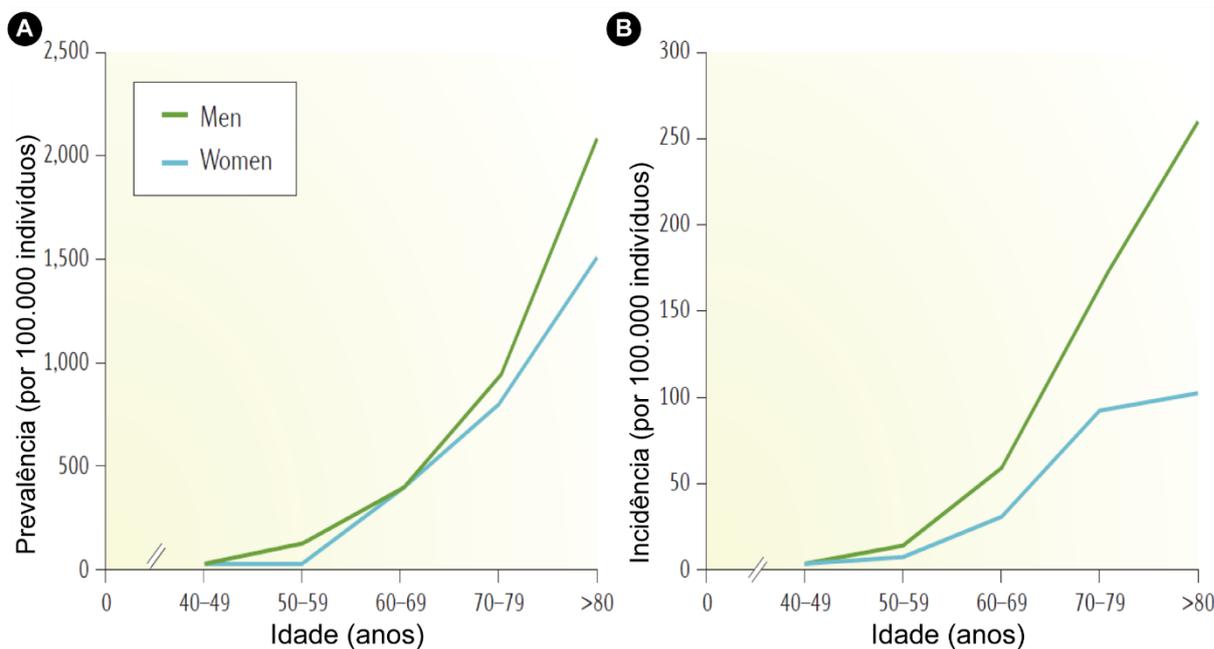
1.1.3 Epidemiologia

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial também vêm crescendo as taxas de doenças associadas ao envelhecimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica que a expectativa de vida populacional entre os anos 2000 e 2016 aumentou em média 5,5 anos (WHO, 2018a). Na população brasileira, até 2030, é esperado um número de aproximadamente 35 milhões de pessoas acima

dos 65 anos de idade (IBGE, 2020). Atualmente, estima-se que a prevalência da DP pode chegar a 0,3% na população mundial, chegando a 1-2% em indivíduos acima dos 65 anos de idade (LEE; GILBERT, 2016). Estudos epidemiológicos destacam a DP como a segunda doença neurodegenerativa mais comum relacionada a idade no mundo, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer (RAY DORSEY *et al.*, 2018). Quanto a sua incidência, a doença varia de 5 a 35 novos casos para cada 100 mil habitantes. A estimativa entre o ano de 2007 e 2030 é de que dobre o número de pessoas com a DP (DORSEY *et al.*, 2007). No Brasil, um estudo realizado em 2006 em uma cidade do interior do estado de Minas Gerais, mostrou que 3,3% de indivíduos acima dos 65 anos preencheram critérios diagnóstico para DP (BARBOSA *et al.*, 2006). Devido à diferentes populações estudadas e desenhos metodológicos nos estudos, é comum ocorrer este tipo de variação (TWELVES; PERKINS; COUNSELL, 2003).

Entre subgrupos, a DP idiopática é rara nos indivíduos abaixo dos 50 anos, com maior incidência apenas em casos de origem genética (POEWE *et al.*, 2017). A chance de mortalidade não aumenta nos primeiros 10 anos após o início da doença, porém, o risco aumenta significativamente a partir da segunda década (PINTER *et al.*, 2015). A incidência pode variar entre grupos étnicos, genótipos e regiões geográficas, entre os sexos, sendo que tanto a incidência quanto a prevalência da doença é maior em homens a partir dos 65-70 anos, com a incidência podendo ser até duas vezes maior nos homens do que nas mulheres (Figura 3). Existem duas grandes hipóteses (não excludentes) para a atribuição dessa discrepância: (i) hormônios femininos como o estrogênio poderiam atuar com ação neuroprotetora nas mulheres; (ii) homens estão mais susceptíveis à exposição ocupacional à agentes tóxicos como pesticidas (POEWE *et al.*, 2017; VAN DEN EEDEN, 2003).

Figura 3 – Taxas de incidência e prevalência da doença de Parkinson em homens e mulheres.



Legenda: Prevalência da doença de Parkinson por idade em mulheres e homens a cada 100.000 pessoas (A). Incidência da doença de Parkinson entre os sexos a cada 100.000 pessoas (B). *Fonte:* Adaptado de (POEWE *et al.*, 2017).

1.1.4 Etiologia

Apesar do grande número de estudos sobre a DP realizados nos últimos duzentos anos, a sua etiologia primária permanece desconhecida. Este fato expõe a complexidade da doença, onde o envelhecimento é o principal fator de risco (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). Atualmente, é aceita a hipótese de que a DP seja uma doença multifatorial (JOHNSON *et al.*, 2019). A combinação de fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e a interação destes fatores entre si, parecem estar relacionados com o seu desenvolvimento (GORECKI *et al.*, 2020; JOHNSON *et al.*, 2019; LILL, 2016).

1.1.4.1 Genética

As pesquisas sobre os genes que participam ativamente na fisiopatologia da DP remontam há apenas pouco mais de duas décadas, quando foi descrita pela primeira vez uma mutação no gene autossômico dominante SNCA, responsável pela

codificação da α -sinucleína (POLYMEROPOULOS, 1997). Desde então, foram descritas diversas variantes nucleotídicas envolvidas na DP (KLEIN; WESTENBERGER, 2012).

Mutações associadas ao alto risco de desenvolvimento da doença são chamadas de monogênicas e são responsáveis por até 10% dos casos da DP, que em sua maioria têm início precoce antes dos 50 anos de idade (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). O espectro das variantes genéticas está entre sequências raras penetrantes até sequências mais comuns de efeito moderado, com variação de sintomas e fisiopatologia (LILL, 2016). Desta maneira, cada variante pode apresentar mecanismos específicos. Por exemplo, o gene SNCA leva à produção da proteína α -sinucleína malformada e, por consequência, problemas de degradação proteica (KIM; ALCALAY, 2017).

Os fatores epigenéticos fazem parte de uma das propostas atuais nas pesquisas sobre a DP. Estão relacionados com a interação entre a expressão gênica e a interação do indivíduo com seu ambiente. Nestes casos, a hipótese é a de que genes não responsáveis pelos casos monogênicos, porém ligados à DP, podem sofrer mudanças epigenéticas através de fatores ambientais (MARSIT, 2015).

1.1.4.2 Ambientais

Quando James Parkinson fez o primeiro relato de pacientes com sintomas motores da doença na Inglaterra, o país passava pela primeira revolução industrial, com milhares de pessoas em jornadas exaustivas de trabalho e expostas a diversos tipos de insalubridade. A hipótese de que isso possa ter alguma correlação com o aparecimento de indivíduos com sintomas motores ou ser apenas uma coincidência, ainda precisa ser elucidada. Com o aumento significativo da produção industrial e agrícola, a humanidade passou a ficar mais exposta às toxinas ambientais, seja de forma passiva, autoinduzida (consumo de medicamentos, produtos cosméticos e de higiene, alimentos ultraprocessados, entre outros) ou ocupacional.

Estudos epidemiológicos indicam que fatores ambientais estão fortemente ligados ao aumento do risco para o desenvolvimento da DP, sendo que aproximadamente 90% dos casos da doença não possuem causa genética identificável (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016; KLEIN; WESTENBERGER, 2012).

Alguns tipos de parkinsonismo podem ser induzidos através da intoxicação aguda por substâncias. Determinados fármacos bloqueadores de canais de cálcio (como fármacos antivertiginosos) ou que diminuem o subsídio dopaminérgico (como alguns antipsicóticos e antieméticos), podem levar ao aparecimento do parkinsonismo farmacológico de efeito transitório (GRANDI; DI GIOVANNI; GALATI, 2018; KLIVENYI; VECSEI, 2011).

Dentre as causas ambientais, a hipótese de que a exposição à agentes químicos e pesticidas aumentaria o risco para desenvolvimento da DP é estudada desde a década de 1980. Na Califórnia, usuários de um tipo modificado de heroína passaram a apresentar sintomas motores da doença, os quais eram revertidos após a administração de L-dopa. Posteriormente, identificou-se que nesta heroína existia um contaminante, o 1-metil,4-fenil,1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que ao atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) é metabolizado pelos astrócitos através da monoamina oxidase (MAO), formando MPP+, um metabólito tóxico seletivo para transportadores de dopamina. Uma vez no meio intracelular, o MPP+ induz efeito oxidativo, capaz de induzir disfunção sináptica, neurodegeneração dopaminérgica e, conseqüente, parkinsonismo em humanos, sendo amplamente usado como modelo animal para estudo da DP (CICCHETTI; DROUIN-OUELLET; GROSS, 2009; LANGSTON *et al.*, 1983).

Estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação positiva entre a exposição crônica (20-30 anos) a diversos tipos de metais pesados, como mercúrio, chumbo, manganês, cobre, ferro, alumínio, bismuto, titânio e zinco, e o desenvolvimento da DP (BJORKLUND *et al.*, 2018; GORELL *et al.*, 1999; KUHN *et al.*, 1998). Cada metal possui sua forma singular de interação nas células do SNC, além disso, diferentes metais podem interagir de forma sinérgica entre si ou em combinação com outras substâncias como os pesticidas (PAPP *et al.*, 2006; PENG *et al.*, 2007). No entanto, a maioria das interações resultam em conseqüências deletérias ligadas ao estresse oxidativo, efeito do qual os neurônios dopaminérgicos são particularmente sensíveis, pois no SNC o processo de metabolização e *clearence* da dopamina está mais propenso a geração de EROs (BJORKLUND *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm relacionado o convívio e trabalho em área rural e exposição ocupacional a pesticidas com o aumento do risco para o desenvolvimento da DP (BRECKENRIDGE *et al.*, 2016; GUNNARSSON; BODIN, 2019; YAN *et al.*,

2018). Alguns pesticidas têm seu efeito conhecido em neurônios dopaminérgicos e são utilizados como modelos animais para o estudo da DP, como o paraquat, a rotenona e o maneb (etileno bis-ditiocarbamato de manganês) (CICCHETTI; DROUIN-OUELLET; GROSS, 2009).

A rotenona é uma toxina relativamente antiga, usada na pesca por índios da Amazônia que utilizam macerações de raízes de plantas comuns das regiões tropicais contendo o princípio ativo, diluindo o conteúdo em cursos d'água, para intoxicar e imobilizar peixe e assim facilitar a pesca (CLARK, 1929). Atualmente é utilizada como inseticida na agricultura, seu mecanismo de toxicidade consiste em inibir o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e, por consequência, desencadeia um processo de estresse oxidativo, liberando espécies reativas no meio intracelular e causando efeitos deletérios (Fig. 4) (BISBAL; SANCHEZ, 2019).

O paraquat é um herbicida não seletivo de contato, comumente empregado no combate de plantas daninhas em lavouras e dessecação de cultivos para antecipação de colheitas, visando manter a qualidade das sementes. O herbicida age na planta através do bloqueio da cadeia de transporte de elétrons no cloroplasto, impedindo o processo de redução do NADP⁺ para NADPH₂ levando ao acúmulo de radicais livres na organela (KAPPES *et al.*, 2012).

Em células humanas, o paraquat também age de forma tóxica favorecendo processos oxidativos. Possui estrutura molecular semelhante ao MPP⁺ e, possivelmente, atravessa a BHE através de transportadores de aminoácidos, sendo carregado para dentro de neurônios de maneira sódio-dependente (SHIMIZU *et al.*, 2001). Uma vez no interior da célula, o paraquat age no ciclo redox causando indiretamente a disfunção mitocondrial (MILLER, G. W., 2007). Outro estudo também mostrou que a neurotoxicidade do paraquat envolve a indução da via apoptótica através da proteína Bak (FEI *et al.*, 2008). Estudos mostram que a administração sistêmica de paraquat é capaz de induzir a degeneração em neurônios dopaminérgicos na SNpc e, conseqüente, disfunção motora em camundongos (BASTÍAS-CANDIA; ZOLEZZI; INESTROSA, 2018).

O maneb é um fungicida não específico de ação múltipla da classe dos ditiocarbamatos. No SNC, já foi demonstrado que este composto provoca disfunção mitocondrial através da inibição do complexo III da organela (ZHANG *et al.*, 2003). O maneb é capaz de causar morte de neurônios dopaminérgicos (BARLOW *et al.*, 2005) e em roedores foi observada a diminuição da atividade locomotora após a

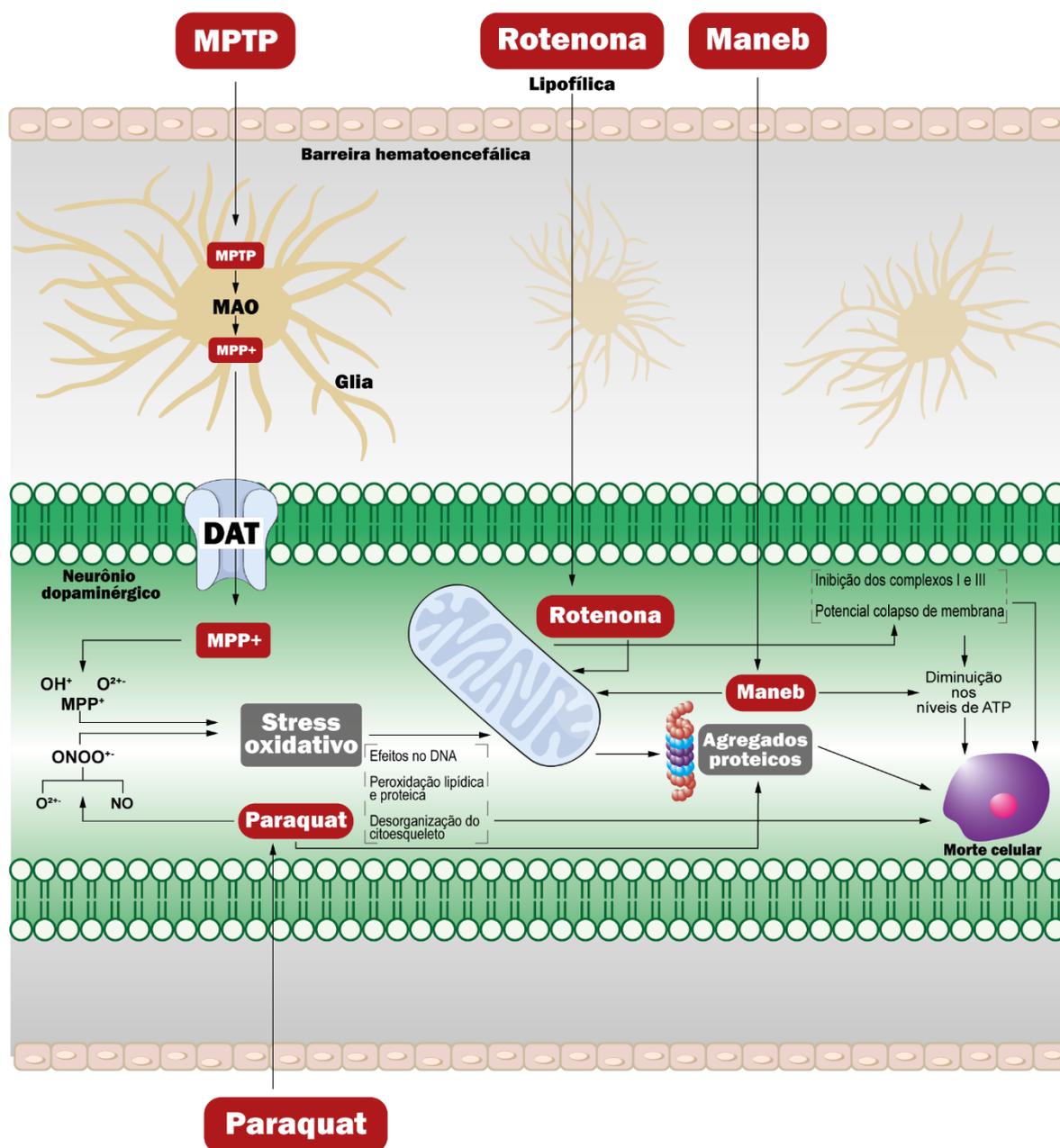
administração aguda via intraperitoneal (i.p.) do pesticida (MORATO; LEMOS; TAKAHASHI, 1989).

Quando administrado em concomitância com o paraquat, o potencial neurotóxico do maneb em neurônios dopaminérgicos é potencializado, mostrando um efeito sinérgico entre os dois pesticidas (THIRUCHELVAM *et al.*, 2000). Um estudo recente realizado no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) demonstrou que a exposição ao maneb e paraquat durante o período neonatal e na vida adulta de camundongos induziu neurodegeneração da SNpc, bem como déficits motores nos animais (COLLE *et al.*, 2020).

Além do maneb, existem outros compostos químicos na classe dos ditiocarbamatos, entre eles estão os dimetilditiocarbamatos (DMDC), que possuem estrutura molecular muito semelhantes (Fig. 5). Estes compostos são produzidos a partir do ácido carbâmico, como o dimetilditiocarbamato de zinco (ziram) e dimetilditiocarbamato de sódio (dibam), sendo utilizados na agricultura devido as suas propriedades antifúngicas (AZEVEDO, 2017).

A ação antifúngica destes compostos ocorre a partir da formação de uma camada protetora na superfície vegetal, privando o fungo de metais essenciais para sua sobrevivência, podendo ser empregado de forma preventiva ou combativa. Apresentam como mecanismo comum a formação de quelatos com metais, tendo como principal característica a formação de complexos metálicos, no caso do maneb com íons de manganês e o ziram com íons de zinco (AZEVEDO, 2017; RODRIGUES, 2006).

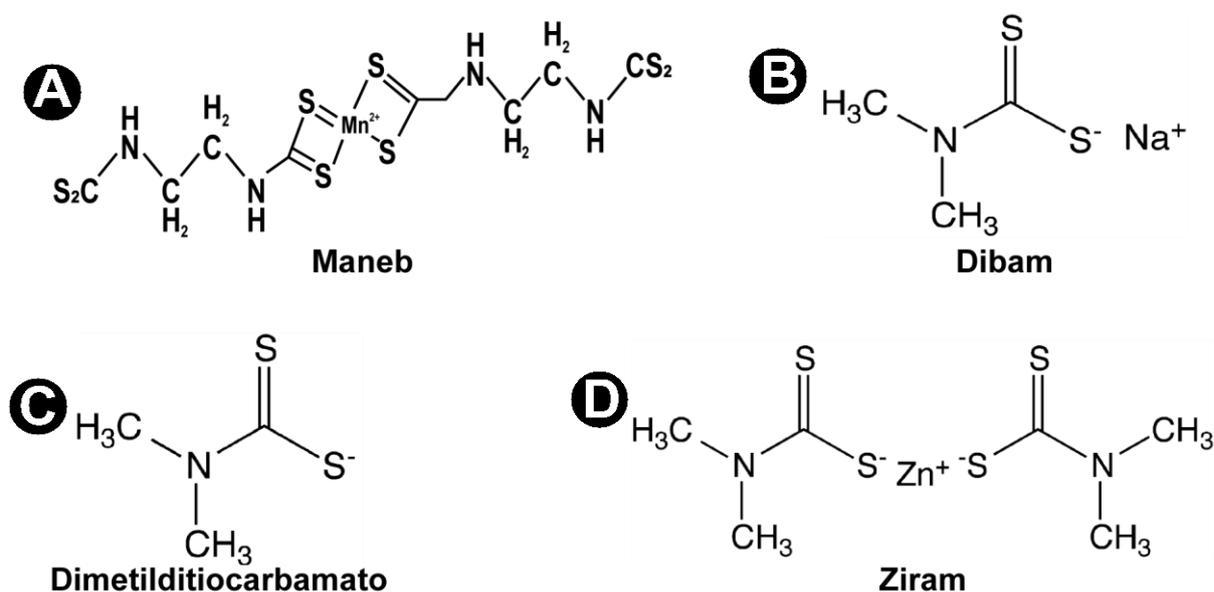
Figura 4 – Principais efeitos deletérios neuronais causados por alguns pesticidas em comparação com o MPTP.



Legenda: Ilustração esquemática dos mecanismos de neurotoxicidade de algumas das toxinas mais utilizadas para reproduzir mecanismos que também ocorrem na doença de Parkinson. Os mecanismos exatos pelos quais essas toxinas atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) ainda não são totalmente esclarecidos. Devido a sua elevada lipossolubilidade, a rotenona atravessa a BHE por difusão lipídica, enquanto o paraquat utiliza transportadores de aminoácidos e transportadores dependentes de sódio. Pouco se sabe sobre a capacidade do maneb de atravessar a BHE, porém, muitos estudos comprovam seu efeito no SNC através da aplicação sistêmica. O MPTP, utilizado neste esquema para fim de comparação com os efeitos dos pesticidas, pode ser considerado uma pró-neurotoxina, pois a sua molécula precisa ser metabolizada pela monoaminoxidase (MAO) nos astrócitos, produzindo o MPP⁺, que ao entrar no neurônio através de transportadores de dopamina

(DAT), exerce seus efeitos tóxicos. Com exceção do paraquat, todas as outras toxinas têm como alvo os complexos mitocondriais. A rotenona é mais seletiva para o complexo I, enquanto o maneb possui maior afinidade para o complexo III. A disfunção mitocondrial exercida pelo paraquat pode ser um efeito secundário resultante de seu efeito redox no citosol. *Fonte: Adaptado de* (CICCHETTI; DROUIN-OUellet; GROSS, 2009).

Figura 5 – Moléculas de ditiocarbamatos capazes de formar complexos metálicos com efeitos deletérios em funções celulares.



Fonte: Adaptado de (DENNIS; VALENTINE, 2015; UVERSKY, 2004).

Em humanos e animais, o contato com estes pesticidas pode ser nocivo, pois os metais acumulados a partir de suas reações podem ser transportados para dentro da célula, este aumento das concentrações metálicas intracelulares desencadeia processos de estresse oxidativo interferindo na atividade da enzima E1 ligase (DENNIS; VALENTINE, 2015). Esta enzima participa no processo de poliubiquitinação que precede a degradação de proteínas pelo proteassoma. Já foi observado que o ziram leva ao aumento nos níveis de α -sinucleína em neurônios dopaminérgicos, todavia, sem levar à formação dos agregados e corpos de Lewy (CHOU *et al.*, 2008a).

Também é conhecido o mecanismo pró-oxidativo apresentado pelo ziram através da inibição da enzima aldeído desidrogenase (ALDH), enzima essencial para a detoxificação de diversos aldeídos através da oxidação dependente de NADP⁺.

Entre os substratos da ALDH está o 3,4-diidroxifenil acetaldeído (DOPAL), um metabólito tóxico formado pela MAO e, posteriormente, convertido em ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), no processo de metabolização da dopamina, o qual possui menor toxicidade. O resultado da inibição da ALDH é o acúmulo de DOPAL, que é capaz de promover a produção de EROs, modificação, acúmulo e agregação de proteínas e dano mitocondrial liberando metabólitos altamente reativos. Pelo fato do DOPAL ser um metabólito bastante presente em neurônios dopaminérgicos, o acúmulo deste metabólito pode estar relacionado com a morte destes neurônios e a patogênese da DP (CASIDA *et al.*, 2014; DOORN *et al.*, 2013; GOLDSTEIN *et al.*, 2013).

Apesar da semelhança com a molécula e alguns efeitos do ziram, a reação do dibam é mais abrangente. O íon de Na⁺ é trocado pelo metal de afinidade mais próximo disponível em seu meio, sendo que o íon de cobre apresenta maior afinidade pela molécula. O primeiro registro de produto contendo dibam é de 1949, desde então vem sendo utilizado no controle populacional de várias espécies de bactérias, fungos, nematódeos e moluscos. Através de seu efeito quelante, o composto também pode ser utilizado em estações industriais de tratamento de água residual, absorvendo metais pesados e na fabricação da borracha, como catalizador no processo de vulcanização (ABDOLLAHI; KHAKSAR, 2014; AZEVEDO, 2017; DANIEL, KENYON, 2007).

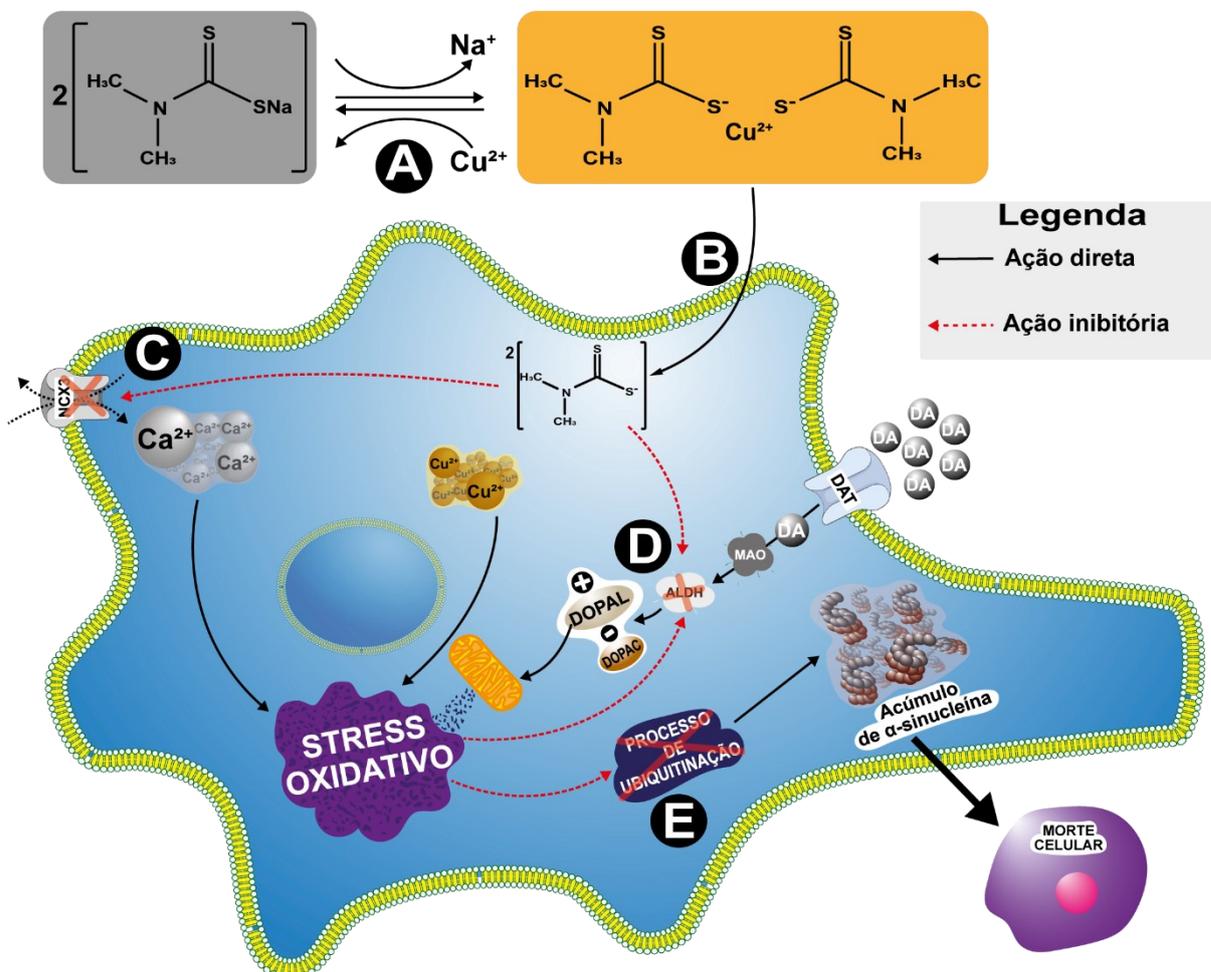
Resíduos de dibam e outros ditiocarbamatos podem ser detectados em produtos à base de látex em contato com a pele, como luvas, preservativos e equipamentos médicos. Testes *in vitro* com estes resíduos comprovaram o potencial mutagênico destas substâncias, apesar deste efeito ainda ser inconclusivo nos testes *in vivo* (TINKLER; GOTT; BOOTMAN, 1998).

Assim como outros ditiocarbamatos, o dibam pode exercer seus efeitos tóxicos através de diversos mecanismos. Em um estudo com células HEK293 foi observado que o dibam aumenta as concentrações intracelulares de cobre, o que pode desencadear processos oxidativos e consequente inibição das vias de degradação proteica, como a atividade da enzima E1 ligase (DENNIS; VALENTINE, 2015).

Além da toxicidade sistêmica do dibam, o potencial neurotóxico também foi observado. Testes realizados *in vivo* por um grupo de pesquisa da Califórnia identificaram anormalidades motoras causadas por disfunção na via nigroestriatal em

camundongos C57BL6 tratados diariamente por duas semanas via i.p. com o pesticida (CHOU *et al.*, 2008a).

Figura 6 – Representação esquemática dos mecanismos de ação do dibam em um neurônio dopaminérgico.



Legenda: (A) No ambiente, as moléculas de dibam são capazes de trocar o íon de Na^+ por íons de outros metais, sendo o cobre com mais afinidade, formando complexos com pontes metálicas de ligação. (B) Estes complexos metálicos são capazes de atravessar a membrana celular, acumulando os íons metálicos que acabam oxidando no citosol. (C) Dentro da célula, a molécula de dibam é capaz de inibir o transportador de $\text{Na}^+ / \text{Ca}^+$, como consequência, o cálcio acumulado promove o stress oxidativo celular. (D) A molécula de dibam também promove a inibição da enzima aldeído desidrogenase (ALDH), esta enzima é responsável pela neutralização de metabólitos tóxicos resultantes das reações intracelulares, como a metabolização de dopamina onde são produzidos o 3,4-diidroxifenil acetaldeído (DOPAL), mais tóxico e 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), menos tóxico. Com a atividade reduzida da ALDH, há um maior acúmulo de DOPAL, favorecendo os processos oxidativos e disfunção mitocondrial. (E) Com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio decorrentes das reações desencadeadas pelo Dibam, o processo de ubiquitinação, responsável pela degradação proteica, fica defasado, favorecendo processos apoptóticos e morte celular. *Fonte:* O autor.

A toxicidade do dibam foi também descrita por Wang e colaboradores após a exposição subaguda de *Caenorhabditis elegans* ao dibam. Neste estudo foi observado que concentrações acima de 1 mg/L de dibam associado ao cobre mostrou-se mais tóxica do que a exposição a apenas quelatos de cobre, chumbo ou ditiocarbamato associado ao chumbo, causando alterações de sobrevivência, crescimento, comportamento locomotor e níveis de EROs nos nematódeos (WANG *et al.*, 2020).

1.1.5 Sintomas

A DP em seus mais de 200 anos de história clínica sempre foi considerada como uma doença do movimento, pois a principal característica associada ao paciente envolve a redução dos seus movimentos voluntários e a perda da autonomia para executá-los. Esta condição é decisiva para o diagnóstico clínico e o foco dos seus principais tratamentos (POEWE *et al.*, 2017).

A manifestação dos principais sintomas motores, no entanto, só acontece quando a degeneração dopaminérgica nigroestriatal atinge 60-70% da via, ao passo que no estriado, o conteúdo de dopamina está depletado em 70-80% (BRAAK, *et al.*, 2004). Enquanto os sintomas motores não se tornam evidentes até uma degeneração dopaminérgica pronunciada, o processo neurodegenerativo ocorre muitos anos antes em outros sistemas de neurotransmissores, como em neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe, neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus*, neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert, sistema GABAérgico, glutamatérgico, núcleo dorsal do vago e outras regiões como o bulbo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (BRAAK, *et al.*, 2003; BRAAK; GHEBREMEDHIN; TREDICI, 2004; TREDICI; BRAAK, 2013).

A primeira caracterização da DP feita por James Parkinson descreveu sintomas motores sem prejuízo cognitivo pelos pacientes acometidos. Esta afirmação foi refutada posteriormente por Charcot, onde incluiu alguns déficits em funções cognitivas, como a memória (GOETZ, 2011). No início do século XXI, uma nova compreensão sobre o curso temporal da DP foi introduzida por Braak e colaboradores. Nesta caracterização a dinâmica dos sintomas acompanha o decurso temporal e espacial da distribuição dos corpos de Lewy no SNC, sendo classificada em seis

estágios. Estas alterações se iniciam com sintomas olfatórios, evoluindo para alterações cognitivas como a memória operacional, passando para alterações emocionais, manifestando sintomas de ansiedade e depressão, até o aparecimento dos sintomas motores. Esta caracterização temporal é comumente relatada na literatura científica como “Hipótese de Braak”, onde o processo patológico decorre em áreas distintas do SNC subjacentes de cada estágio (BRAAK *et al.*, 2003; BRAAK; GHEBREMEDHIN; TREDICI, 2004; CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006).

A degeneração de neurônios dopaminérgicos na DP não ocorre exclusivamente na via nigroestriatal, se estende também para as vias mesolímbica e mesocortical, que por sua vez projetam conexões com diversas estruturas cerebrais, como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal (BRAAK; GHEBREMEDHIN; TREDICI, 2004). Estas áreas participam da regulação de funções cognitivas e emocionais (GOLDMAN; SIEG, 2020).

Nas fases iniciais, o processo neurodegenerativo também se estende para outras áreas além das vias dopaminérgicas, acometendo outros sistemas neurotransmissores e, por consequência, o aparecimento dos sintomas não motores. Dentre estes se destacam os distúrbios do sono (BHATTACHARYA *et al.*, 2020; RIEDEL *et al.*, 2010), alterações olfatórias (DOTY, 2012) e cognitivas (prejuízos na aprendizagem, memória e atenção) (GOLDMAN; SIEG, 2020; HANAGASI; TUFEKCIOGLU; EMRE, 2017) e os transtornos de ansiedade e humor, principalmente depressão (SCHRAG; TADDEI, 2017). Estes sintomas caracterizam a fase prodrômica da doença, onde um dos grandes desafios no manejo clínico é a percepção destes sintomas pela equipe de saúde, familiares e pelo próprio paciente. Este fato deve ser levado em conta, a qualidade de vida de muitos pacientes começa a ser afetada nesta fase (MARTINEZ-MARTIN, 2011).

Entre as alterações da fase prodrômica da DP, a depressão representa um dos sintomas não motores e ao mesmo tempo comorbidade mais frequente (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006).

1.2 DEPRESSÃO: SINTOMA E COMORBIDADE NA DP

O diagnóstico da depressão, tanto como sintoma, como comorbidade, baseia-se em grupos de sintomas clínicos tendo como referência os critérios estabelecidos pelo Manual Diagnóstico da Sociedade Americana de Psiquiatria (DSM-5). Segundo

estes critérios, um indivíduo para ser diagnosticado com depressão deve apresentar pelo menos 5 sintomas em uma lista de 10 sintomas com duração mínima de 15 dias, durante a maior parte do dia. A lista de sintomas inclui:

- 1) humor deprimido evidente;
- 2) diminuição no interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades;
- 3) diminuição ou aumento no apetite, associado com alterações no peso sem dieta alimentar aparente;
- 4) insônia ou hipersonia;
- 5) agitação ou retardo psicomotor;
- 6) sensação de fadiga;
- 7) sentimento excessivo de inutilidade ou culpa;
- 8) diminuição na capacidade de concentração e tomada de decisões;
- 9) pensamentos recorrentes de morte ou ideação suicida.

É necessário que ao menos um dos dois primeiros sintomas da lista esteja presente e que o conjunto de sintomas causem prejuízos no contexto social do indivíduo e que estes critérios não estejam incluídos em conjunto com outro transtorno psiquiátrico como a esquizofrenia ou transtorno de humor bipolar (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

A primeira hipótese com evidência sólida sobre a neurobiologia da depressão levou em conta o sistema monoaminérgico como fundamental no aparecimento de sintomas depressivos. Esta hipótese surgiu na década de 1950 após a observação de que a reserpina, que era utilizada como um fármaco anti-hipertensivo, causava entre seus efeitos adversos alguns sintomas depressivos (FREIS, 1954). A hipótese monoaminérgica foi ainda reforçada com o desenvolvimento dos fármacos antidepressivos que atuam aumentando os níveis de monoaminas no SNC, com os antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS) e inibidores da monoaminaoxidase (iMAO) (PEREIRA; HIROAKI-SATO, 2018).

Atualmente, já está bem estabelecido que o transtorno depressivo maior pode ser resultado de disfunção de circuitarias que modulam o humor e as emoções, incluindo o hipocampo, o córtex pré-frontal e a amígdala (MAYBERG, 2003).

A disfunção no sistema dopaminérgico (principal sistema acometido na DP) também tem papel central na depressão, sendo que em indivíduos não deprimidos a via dopaminérgica mesocortical atua na predição e realização de recompensa

(SCHULTZ, 1998). A dopamina é necessária para a atribuição da saliência para um incentivo motivacional transformando a percepção ligada à recompensa em um comportamento motivado (BERRIDGE; ROBINSON, 1998). O sistema mesocortical dopaminérgico é ativado durante a excitabilidade motivacional e responsividade para um estímulo motivacional condicionado. Além disso, fármacos neurolépticos (ex: haloperidol) utilizados para o tratamento de esquizofrenia atuam bloqueando os receptores dopaminérgicos e que costumam ter o parkinsonismo como efeito colateral, também atenuam seletivamente a excitação motivacional direcionada, resultando no embotamento do comportamento motivado à um objetivo, geralmente induzidos por reforçadores ambientais (SALAMONE *et al.*, 2003; WISE, 1982). O comportamento motivado embotado é uma característica muito comum da anedonia, sintoma bastante presente tanto no transtorno depressivo maior quanto na DP (SZCZYPIŃSKI; GOLLA, 2018).

Sintomas depressivos como a anedonia juntamente com a dificuldade de tomar decisões, sentimento de tristeza e desamparo e a falta de sono são sintomas comuns em pacientes com a DP (BROWN; MACCARTHY, 1990; FARABAUGH *et al.*, 2012; LEENTJENS *et al.*, 2003; MAYEUX *et al.*, 1986). Estes sintomas precisam ser levados em consideração durante o tratamento, pois são os fatores de maior impacto na qualidade de vida dos pacientes (MARTINEZ-MARTIN, 2011).

Existem duas linhas que investigam o aparecimento da depressão como comorbidade na DP. Uma delas traz à tona a maneira de enfrentamento do paciente com relação à mudança no estilo de vida ocasionado pela doença, onde a perda de qualidade de vida e desmoralização do paciente frente ao estigma social são as principais causas (ALTHAUS *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2021).

Outra linha que investiga os sintomas depressivos nas primeiras fases da DP indica que estes podem ser resultado das alterações neuroanatômicas e neuroquímicas que ocorrem devido à neurodegeneração subjacente à doença (MCDONALD; RICHARD; DELONG, 2003; OSSOWSKA; LORENC-KOCI, 2013). Mesmo com a alta prevalência da depressão em pacientes com a DP (40 a 50%), caracterizando-a como o sintoma não motor mais prevalente, esta condição frequentemente tem seu diagnóstico e tratamento deixado em segundo plano (MARTINEZ-MARTIN, 2011). A neurobiologia da depressão na DP é complexa, pois assim como no espectro dos transtornos de humor, esta resulta de alterações na

neurotransmissão dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica causadas pelo processo neurodegenerativo (MAYEUX, 1990; SAGNA; GALLO; PONTONE, 2014).

Para o diagnóstico da depressão na DP são adotados os mesmos critérios do espectro do transtorno depressivo maior. Esta prática na clínica dificulta a compreensão e o tratamento da comorbidade, pois não leva em conta as características singulares da comorbidade resultante do déficit do funcionamento das vias dopaminérgicas.

A fisiopatologia da depressão na DP pode ser diferente dos mecanismos que são responsáveis pelos sintomas depressivos observados na população em geral (LIEBERMAN, 2006). A combinação de apatia, anedonia e alterações no lobo frontal do cérebro podem contribuir para o diagnóstico da depressão na DP. Também já foi postulada a hipótese de que a anedonia e a depressão são de fato dois sintomas não motores independentes na DP (ERRO *et al.*, 2015; MATHEUS *et al.*, 2016).

Os modelos animais baseados em exposição à toxinas podem oferecer evidências importantes no estudo de aspectos não motores da DP (MADIHA; HAIDER, 2019; OLIVEIRA DE CARVALHO *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2020). O comportamento tipo-depressivo pode ser observado em animais após a exposição sistêmica ao MPTP ou em lesões específicas com a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (FUJITA *et al.*, 2020; MARQUES *et al.*, 2019). Porém, a lesão seletiva na via nigroestriatal, comumente utilizada em modelos animais da DP, pode não induzir o comportamento tipo-depressivo (DRUI *et al.*, 2014). A disfunção dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico observados tanto no transtorno depressivo maior quanto na DP pode também ser observada em modelos animais utilizando a 6-OHDA e MPTP (TAYLOR *et al.*, 2009).

O risco do desenvolvimento de depressão é maior em mulheres, em indivíduos com idade entre 40-69 anos, em pacientes tratados com L-DOPA por longos períodos e em pacientes com a função cognitiva prejudicada (BECKER *et al.*, 2011; TANDBERG *et al.*, 1997).

Diversos estudos em modelos animais já investigaram as diferenças entre machos e fêmeas. Um estudo que utilizou a administração i.p. de altas doses de MPTP (10 mg/kg) durante 5 dias resultou em uma maior taxa de mortalidade de camundongos C57BL/6 fêmeas em comparação aos machos. Nesse estudo também foi demonstrado que as fêmeas estão susceptíveis a prejuízos motores com a aplicação de doses menores (1 mg/kg) de MPTP administradas cronicamente

(ANTZOULATOS *et al.*, 2011). Por outro lado, um estudo do nosso laboratório demonstrou que camundongos C57BL/6 fêmeas são mais sensíveis que machos ao desenvolvimento de comportamentos não motores relacionados a anedonia e depressão após a administração intranasal (i.n.) de MPTP (SCHAMNE *et al.*, 2018).

1.3 EXPOSIÇÃO INTRANASAL A XENOBIÓTICOS E A HIPÓTESE DA VETORIZAÇÃO OLFATÓRIA NA DOENÇA DE PARKINSON

O contato humano com substâncias exógenas ao organismo (xenobióticos) é bastante comum. Diariamente fazemos uso de produtos industrializados, dos quais muitos deles entram em contato direto com o corpo. São diversas as maneiras pelas quais os xenobióticos podem entrar e interagir com o organismo, seja pela via oral, gastrointestinal, respiratória, dérmica ou i.n. Através da via sistêmica a concentração e a toxicidade podem ser controladas e reduzidas através da função metabólica do fígado (DOTY, 2012).

O acesso dessas substâncias ao SNC é controlado pela BHE que dificulta a entrada de muitos desses xenobióticos. Na medida em que as funções protetivas do organismo são reduzidas com o envelhecimento ou de algumas doenças como a DP, a BHE pode ter sua vulnerabilidade aumentada (BARTELS *et al.*, 2009; KORTEKAAS *et al.*, 2005).

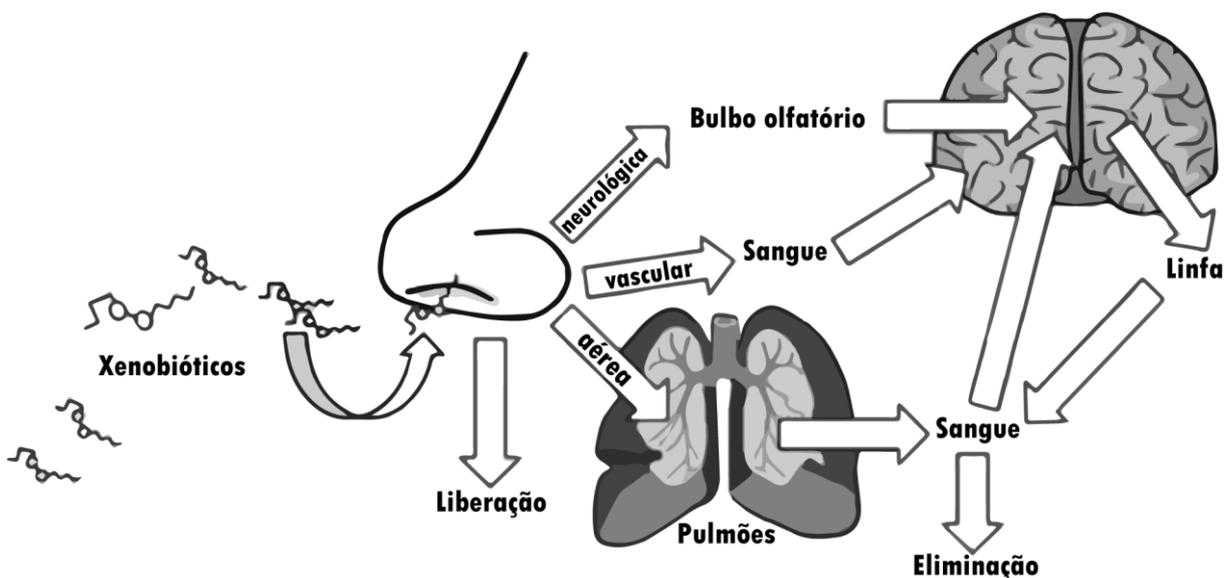
Entre os principais sistemas sensoriais, a olfação é um dos mais antigos do ponto de vista evolutivo. A ramificação dos nervos do bulbo olfatório é complexa, pois se conecta a diferentes estruturas do SNC, como o trato olfatório, núcleo olfatório anterior, córtex piriforme, amígdala e hipotálamo, as quais desempenham diferentes papéis no processamento e percepção do olfato. A substância negra também está conectada ao sistema olfativo, enviando projeções dopaminérgicas para o bulbo olfatório (HÖGLINGER *et al.*, 2015; SMITH; BHATNAGAR, 2019).

O declínio da capacidade olfativa pode estar relacionado com o avanço da idade (DOTY; KAMATH, 2014), porém a perda da capacidade olfatória também está associada ao processo neurodegenerativo observado em diversas doenças como Alzheimer, Parkinson e Huntington. Neurotoxinas como o MPTP também estão associadas à disfunção olfatória, comportamento do tipo depressivo e prejuízos de

memória e aprendizagem em roedores, após a sua administração i.n., corroborando a hipótese da vetorização olfatória (PREDIGER *et al.*, 2012, 2006).

Segundo a hipótese da vetorização olfatória, a via de administração i.n. de substâncias é um método eficaz para a administração de medicamentos e toxinas com o objetivo de atingir o SNC. O transporte de substâncias da via i.n. para o SNC é feito através de nervos, vasos sanguíneos, fluido cerebrospinal e o sistema linfático (Fig. 7), que contornam os obstáculos da BHE (DHURIA; HANSON; FREY, 2010). Ainda não está bem estabelecido o mecanismo pelo qual as substâncias conseguem acessar o SNC através da cavidade nasal, porém sabe-se que algumas estruturas estão envolvidas nesta via de acesso. Entre estas estruturas estão o nervo olfatório, o nervo trigêmeo, vasos de irrigação sanguínea, líquido cefalorraquidiano e sistema linfático local.

Figura 7 - Ilustração das vias de condução de xenobióticos ao SNC após a exposição intranasal.



Legenda: Xenobióticos podem acessar o SNC através da via vascular, entrando em contato direto com o sangue, via aérea, passando pelos pulmões e percorrendo o sangue, e pela via neurológica, percorrendo os neurônios do bulbo olfatório até chegar nas vias centrais. *Fonte:*(PREDIGER *et al.*, 2012).

1.3.1 Exposição aos pesticidas como fator de risco para a DP

O uso de pesticidas para o controle fitossanitário na agricultura nacional é bastante comum. Segundo o boletim anual do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e

dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), de produção, importação, exportação e vendas de pesticidas no Brasil, durante o ano de 2016 foram comercializadas 462.811,57 toneladas de 325 agentes ativos no mercado nacional (IBAMA, 2016). Os trabalhadores rurais, principalmente de baixa renda, representam a população mais exposta aos efeitos tóxicos dos pesticidas. Estudos apontam que este efeito seja resultante da inadequação da indústria agroquímica para a estrutura geral das unidades produtivas de agricultura familiar, fazendo com que os produtos sejam transportados, armazenados e aplicados de maneira inadequada, aumentando assim os riscos de intoxicação aguda e crônica (ABREU; ALONZO, 2016).

Acompanhando a alta taxa de consumo dos pesticidas agrícolas, o número de casos de intoxicação por estas substâncias no ano de 2015 chegou a 3337 com 97 óbitos. A maior taxa de óbitos entre casos registrados de exposição aguda humana por agentes tóxicos, segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX, 2015). Entre as mais variadas causas de intoxicação por pesticidas, a OMS reconhece a ingestão destes agentes como a principal forma de tentativas de suicídio (WHO, 2018b).

A intoxicação aguda ou crônica por pesticidas e alterações na saúde mental dos agricultores têm sido alvo de estudos epidemiológicos que apontam para um maior risco no desenvolvimento de processos neurodegenerativos e doenças psiquiátricas nesta população (BESELER *et al.*, 2006; BLANC-LAPIERRE *et al.*, 2012).

Na Europa, através do decreto nº 2012-665 de 4 de maio de 2012, o governo francês reconheceu a DP como consequência direta da exposição ocupacional de trabalhadores agrícolas aos pesticidas em um período de pelo menos 10 anos (ELBAZ; MOISAN, 2016; FRANÇA, 2012).

No sul do Brasil, um estudo descritivo conduzido no estado do Paraná relatou um número expressivo de pacientes Parkinsonianos que exerceram atividades na agricultura e tiveram contato direto ou indireto com pesticidas, sem uso de equipamentos de proteção individual (EPI), sendo a forma mais comum de aplicação do produto com máquina costal (VASCONCELLOS *et al.*, 2019).

No estado do Rio Grande do Sul, um estudo observacional que acompanhou 150 pacientes com DP por 6 anos relatou diferenças entre o grupo de pacientes com histórico de exposição por pelo menos 10 anos aos pesticidas com relação aos demais grupos expostos a outros tipos de substâncias como álcool, cigarro e cafeína. Os

pacientes expostos aos pesticidas tiveram maior pontuação na escala UPDRS – III que avalia sintomas da DP, além da taxa de mortalidade nesse grupo ser duas vezes maior em comparação com os demais (SCHNEIDER MEDEIROS *et al.*, 2020).

A exposição aos pesticidas pela via i.n. pode induzir prejuízos neurobiológicos e comportamentais mais leves em comparação a aplicação de outras toxinas como a 6-OHDA, lipopolissacarídeo (LPS) e MPTP diretamente em estruturas do SNC. Porém, estudos com exposição aos pesticidas por esta via têm demonstrado efeitos em comum de alguns pesticidas quando aplicados pela via i.n. sendo importantes para o entendimento dos mesmos. Déficit em comportamentos de locomoção e memória, aumento de marcadores para stress oxidativo e alterações do imunoconteúdo para TH foram observadas em diversas estruturas do SNC, como demonstrado no sumário de resultados no Quadro 1.

Quadro 1 – Sumário de estudos apresentando efeitos de diferentes tipos de pesticidas administrados pela via intranasal em roedores.

Pesticida	Espécie	Método de exposição	Resumo de resultados	Referência
Rotenona	Camundongo C57BL/6 macho	Aplicação i.n. de 6,26 mg/ml para dose de 2,5 mg/kg em um volume de 10 μ durante 30 dias.	Não foram observadas alterações na atividade locomotora, níveis de dopamina e TH.	(ROJO <i>et al.</i> , 2007)
Rotenona	Camundongo BALB/c fêmea	Aplicação i.n. de 0,35 mg/kg em narina direita com uma micropipeta.	Déficit olfatório no teste de esquiva do ácido butírico. Diminuiu a modulação inibitória de células mitraes. Reduziu o imunoconteúdo positivo para TH e também induziu estresse mitocondrial no bulbo olfatório.	(SASAJIMA <i>et al.</i> , 2015)
Glifosato	Camundongo CF-1 macho	Aplicação i.n. de 1 mg/narina em um volume de 10 μ l por dia, 3 dias por semana durante 4 semanas.	Queda na atividade locomotora no teste do campo aberto. Maior comportamento tipo-ansioso no teste do labirinto em cruz elevado e aumento de tigmotaxia. Prejuízo na memória de reconhecimento no teste de reconhecimento de objeto.	(BAIER <i>et al.</i> , 2017)

Rotenona	Camundongo BALB/c fêmea	Aplicação i.n. de 0,35 mg/kg em narina direita com uma micropipeta.	Além de reproduzir o observado no estudo anterior, como déficit olfatório no teste de esquiva do ácido butírico, redução da atividade inibitória das células mitrais e redução de conteúdo positivo para TH no bulbo olfatório, também reduziu imunomarcação para TH no estriado e SN e diminuiu projeções dendríticas no bulbo olfatório.	(SASAJIMA <i>et al.</i> , 2017)
Rotenona	Ratos Wistar machos	Aplicação i.n. de 2,5 mg/kg em um volume de 10µl por narina em dias alternados, durante 14 dias.	Diminuição na densidade de neurônios dopaminérgicos e astrócitos nos bulbos olfatórios, ativação da microglia na camada glomerular, aumento da fosforilação de α -sinucleína e seu acúmulo nos corpos da camada mitral.	(VORONKOV <i>et al.</i> , 2017)
Glifosato	Camundongo CF-1 macho	Aplicação i.n. de 1 mg/narina em um volume de 10 µl por dia, 3 dias por semana durante 4 semanas.	Sem alterações no consumo de água e comida e nos parâmetros comportamentais de bem-estar, seguindo uma tabela de observação funcional. Em animais expostos ao	(GALLEGOS <i>et al.</i> , 2020)

			glifosato ocorreu aumento de astrócitos no núcleo olfatório anterior, prejuízo no balanço redox e alteração nas atividades de enzimas envolvidas nas vias colinérgicas e glutamatérgicas em diferentes áreas do SNC.	
Paraquat	Camundongo C57BL/6 macho	Aplicação i.n. de 25, 50, 75 mg/ml para dose de 10, 20, 30mg/kg, respectivamente em um volume de 10 μ durante 30 dias.	Não foram observadas alterações na atividade locomotoras, níveis de dopamina e TH.	(ROJO <i>et al.</i> , 2007)
Deltametrina	Ratos Wistar machos	Aplicação i.n. de 0,5 mg/ml em um volume de 50 μ g/narina, uma vez por semana durante 3 semanas.	Prejuízo em memória aversiva condicionada ao contexto e de reconhecimento de objeto, redução de imunoreatividade para TH na SNpc e VTA, aumento de imunoreatividade para TH no estriado dorsal, sem alterações motoras em teste de catalepsia e campo aberto.	(SOUZA <i>et al.</i> , 2018)

Dibam	Camundongos Swiss machos	Aplicação i.n. de 1 mg/ml em um volume de 10 µl/narina durante 1, 2 e 4 dias consecutivos.	<ul style="list-style-type: none"> • 1 aplicação: não foram observadas alterações comportamentais. • 2 aplicações: observado déficit neurológico transitório na primeira semana pós-aplicação, com remissão na segunda semana. • 4 aplicações: observados déficits motores e neurológicos induzidos por até 7 dias, aumento de EROs no BO, 2 h após as aplicações, aumento do imunoconteúdo para TH no estriado, aumento no metabolismo de serotonina e noradrenalina no BO 1 dia após as aplicações. Tratamento com L-DOPA e Apomorfina melhoraram o déficit locomotor induzido pelo dibam. 	(MACK, <i>et al.</i> , 2018)
-------	--------------------------	--	---	------------------------------

Dibam	Camundongos Swiss machos	Tratamento com melatonina i.p. (3, 10, 30 mg/kg), 1 h antes da aplicação i.n. de dibam, 1 mg/ml em um volume de 10 µl/narina durante 4 dias consecutivos.	Melatonina protegeu contra déficit motor e neurológico induzido pelo dibam. Previniu aumento de marcadores de stress oxidativo e alterações no imunoconteúdo de TH no estriado, também protegeu contra o aumento de de 4-hidroxinonenal, TNF, marcadores de estresse oxidativo e inflamação no bulbo olfatório.	(MACK, <i>et al.</i> , 2020)
Rotenona	Camundongos C57BL/6J machos	Aplicação i.n. de 0,35 mg/kg na narina direita durante 7 dias.	Foram observados, prejuízo na memória de aversão ao sabor amargo, prejuízo na depressão de longa duração (LTD), porém sem afetar a potenciação de longa duração (LTP) em neurônios piramidais da camada V do córtex insular, na mesma região, sinais inibitórios espontâneos e sinais GABA inibitórios tônicos foram diminuídos. Sinais de LTD foram restaurados em camundongos tratados com agonista do receptor GABA _A , muscimol.	(TOYODA <i>et al.</i> , 2020)

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Existe uma vasta literatura demonstrando que a exposição a xenobióticos aumenta os riscos para o desenvolvimento da DP e que a administração i.n. de diferentes pesticidas promove alterações comportamentais e moleculares semelhantes às observadas na DP. Além disso, já está estabelecido que existem diferenças epidemiológicas, sintomáticas e neuropatológicas tanto na depressão como comorbidade da DP quanto no espectro dos transtornos depressivos entre mulheres e homens.

Diante deste cenário, é de grande relevância científica que se possa estudar aspectos relacionados ao desempenho motor e comportamento tipo-depressivo em modelos animais da DP através da exposição i.n. aos pesticidas. Sendo assim, hipotetizamos que camundongos fêmeas sejam mais susceptíveis ao desenvolvimento de alterações em resposta comportamentais relacionadas à depressão após a administração i.n. do dibam.

3 OBJETIVOS

1.1 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência do sexo sobre o desenvolvimento de sintomas motores e emocionais da DP induzidos pela administração i.n. de dibam em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os possíveis prejuízos motores causados pela administração i.n. de dibam em camundongos fêmeas e machos avaliados através dos testes: score neurológico de severidade, campo aberto, haste vertical e rotarod.
- Investigar os possíveis comportamentos do tipo depressivo causados pela administração i.n. de dibam em camundongos fêmeas e machos avaliados através dos testes: consumo de sacarose, borrifagem com sacarose e nado forçado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos realizados neste trabalho passaram pela avaliação e aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo número 3325270918.

O presente estudo foi realizado utilizando camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas e machos, com idade entre 90 e 100 dias, pesando 40 a 60 g fornecidos pelo biotério central da UFSC. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas retangulares com dimensões de 49 x 34 x 16 cm em até 10 animais por gaiola com o grupo exposto e controle na mesma caixa, separados por sexo e mantidos em gabinetes ventilados (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), onde era fornecido livre acesso a comida e água. O biotério exclusivo para camundongos foi mantido a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro escuro de 12 horas e acendimento automático das luzes às 7 horas.

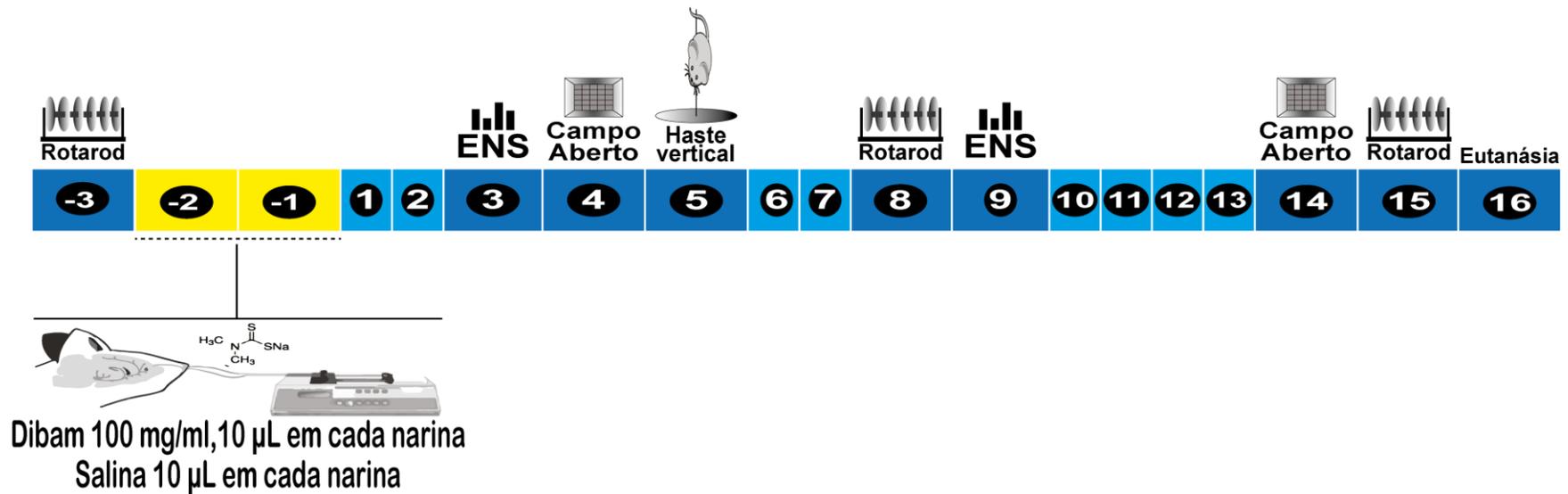
4.2 ADMINISTRAÇÃO I.N. DO DIBAM

A administração i.n. do dibam foi realizada de acordo com o protocolo previamente padronizado por Mack et al. (2018). O dibam (dimetilditiocarbamato de sódio, D156604 Sigma-Aldrich) foi dissolvido em solução de NaCl 0,9% em uma concentração de 100 mg/mL. Logo após os animais serem anestesiados com isoflurano 0.96%, um tubo de polietileno (PE10) foi introduzido aproximadamente 7 mm em uma das narinas com o animal em decúbito ventral. Com o auxílio de uma microseringa de 10 μl , acoplada a uma bomba de infusão, o dibam foi aplicado em um volume de 10 μL com 100 mg/mL, que corresponde a uma dose de 1 mg/narina ou controle (NaCl 0,9%), sendo aplicado a uma taxa de infusão de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. O mesmo procedimento foi realizado na narina contralateral após o animal recuperar a função cardiorrespiratória normal, após um intervalo de 5 min (MACK *et al.*, 2018). Este procedimento foi repetido após 24 h, totalizando duas administrações de dibam em cada narina.

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

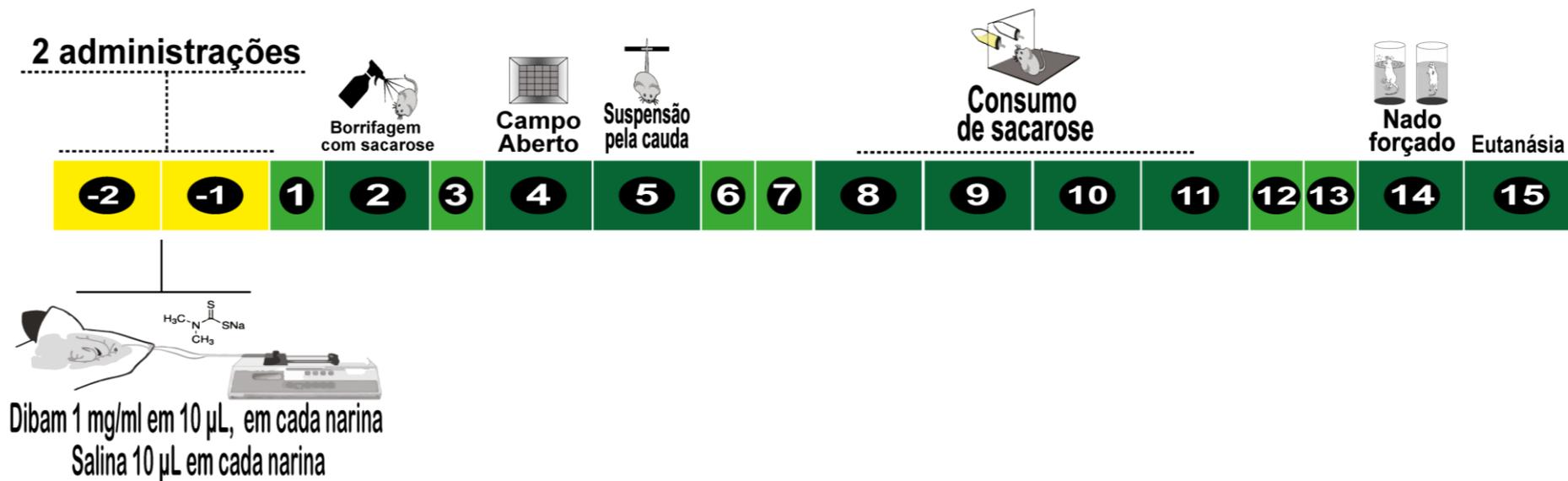
O presente estudo foi dividido em dois protocolos experimentais, sendo estes realizados com o objetivo de avaliar a influência do sexo dos animais sobre os efeitos da administração i.n. do dibam sobre as funções motoras (protocolo 1) e emocional (protocolo 2).

Figura 8 – Linha do tempo experimental do protocolo 1 utilizado para a avaliação motora.



Legenda: Representação gráfica da linha do tempo com as avaliações de comportamento motor. Os animais foram submetidos a duas administrações de dibam (1 mg/narina) por dois dias consecutivos (dias -2 e -1) foram consideradas avaliações de efeito agudo, os testes realizados nos primeiros 5 dias após as administrações e avaliações de efeito tardio, os testes realizados a partir do dia 8.

Figura 9 – Linha do tempo experimental do protocolo 2 utilizado para a avaliação dos comportamentos tipo-depressivo e anedônico.



Legenda: Representação gráfica da linha do tempo com as avaliações relacionadas aos comportamentos tipo-depressivo, anedônico e ansioso, e avaliação de aptidão motora. Os animais foram submetidos a duas administrações consecutivas de dibam (1 mg/narina). Foram consideradas avaliações de efeito agudo, os testes realizados nos primeiros 5 dias após as administrações e avaliações de efeito tardio, os testes realizados a partir do dia 8.

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Com o objetivo de reduzir possíveis vieses e conduzir a exposição dos grupos aos mesmos fatores de forma homogênea, algumas medidas foram adotadas. Assim como em *trials* clínicos, em pesquisas com animais, a randomização dos grupos é uma importante iniciativa em busca da reprodutibilidade, assim como reduz o possível viés de escolha do pesquisador, proporcionando maior qualidade ao experimento (HIRST *et al.*, 2014; SCHULZ *et al.*, 1995). Para a triagem dos grupos, os animais foram enumerados com uma fita adesiva na cauda, logo após, os números foram digitados na plataforma *random.org* em forma de lista, que atribuiu de forma automática e randômica, os números aos grupos (controle e dibam). Para que os animais fossem expostos de forma homogênea aos mesmos fatores estressantes decorrentes do manuseio, o n amostral de cada grupo foi dividido pela metade, desta forma foi logisticamente possível conduzir os procedimentos com todos os grupos no mesmo dia, com diferença de uma semana entre cada metade dos grupos.

Todos os testes comportamentais foram realizados no período diurno, em salas adequadas com isolamento acústico, e controle de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (10 lux, com exceção do escore neurológico de severidade e teste do campo aberto que foram executados em 75 lux).

4.4.1 Rotarod

O aparato do teste é composto por um cilindro metálico ligado a um motor de passo programado para trabalhar em diferentes velocidades. O cilindro possui um padrão de ranhuras que favorecem a aderência nas patas dos animais. O cilindro é separado em 4 baias de acrílico fosco com medidas iguais, dimensionadas para o tamanho dos camundongos.

A avaliação do rotarod consistiu em um teste basal de aptidão motora ao aparelho, 24 h antes das administrações. Foram incluídos no estudo os animais que conseguiram permanecer no aparato durante 5 min a uma velocidade constante de 5 rpm com até 3 tentativas (nenhum animal necessitou ser excluído na avaliação basal do rotarod). Nas avaliações realizadas nos dias 8 e 15 após as administrações utilizou-se uma velocidade inicial de 5 rpm com aceleração constante de 0,1 revolução/s ,

chegando a uma velocidade máxima de 40 rpm com uma latência de 300 s para a queda (SHIOTSUKI *et al.*, 2010).

4.4.2 Escore neurológico de severidade (ENS)

O ENS consiste na avaliação de 10 parâmetros clínicos neurológicos individuais, onde são observadas algumas características motoras, fisiológicas e estado de alerta, que refletem o estado neurológico do animal. O ENS foi desenvolvido a partir da Escala de Glasgow, que é amplamente utilizada para avaliar o estado neurológico de pacientes que sofreram um traumatismo cranioencefálico (TCE).

Os 10 parâmetros avaliados no teste demonstram-se de maneira sensível e representativa das tarefas com maior importância e comprometimento em casos de TCE (FLIERL *et al.*, 2009). Com base na descrição de Flier e colaboradores, no ano de 2010 foi padronizado no Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON, UFSC), um protocolo de ENS que se aplica à camundongo, utilizando os aparatos ilustrados na figura 7 (SCHWARZBOLD *et al.*, 2010).

Escore de 1 ponto são atribuídos ao animal que apresente a ausência de comportamento ou a inaptidão de realizar alguma das tarefas descritas na tabela 1. Assim, a pontuação máxima de 10 pontos neste teste indica maior comprometimento neurológico do animal.

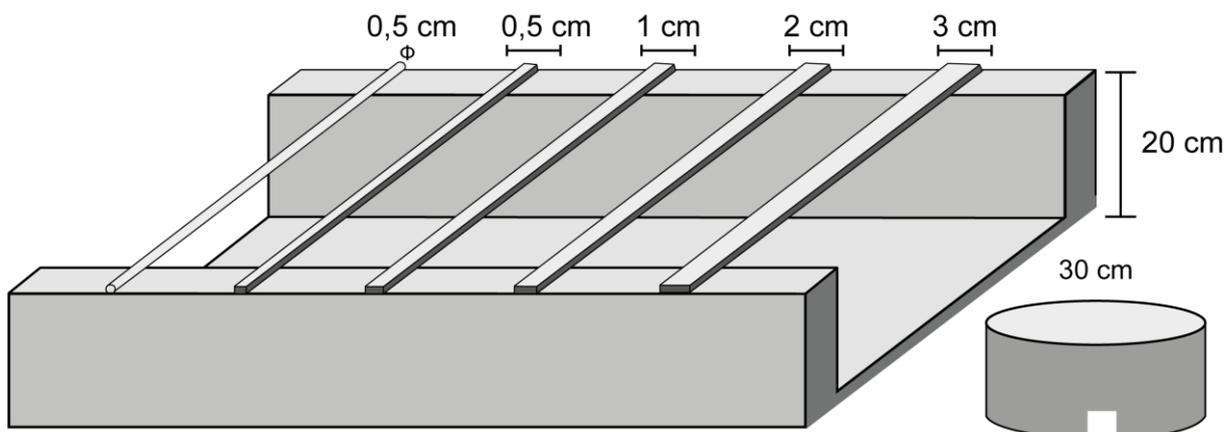
Tabela 1 - Avaliação através do ENS

Parâmetros	Pontuação	
	Apto	Inapto
Sair do círculo (até 3 min)	0	1
Comportamento exploratório	0	1
Agarrar na grade da caixa (paresia)	0	1
Andar em linha reta	0	1
Andar na trave de 3 cm (até 1 min)	0	1
Andar na trave de 2 cm (até 1 min)	0	1
Andar na trave de 1 cm (até 1 min)	0	1
Equilíbrio em trave de 0,7 cm (até 10 s)	0	1
Equilíbrio em trave redonda (até 10 s, 3 tentativas)	0	1
Reflexo de sobressalto	0	1
Escore máximo	10	

Fonte: (SCHWARZBOLD *et al.*, 2010)

Para considerar que o animal obteve sucesso nas tarefas de equilíbrio, o camundongo deve se apoiar na haste com ambas as patas anteriores e possuir seu tronco e patas posteriores próximas a haste. Apenas “segurar” a haste com uma ou ambas as patas anteriores, é considerada uma falha no teste. São dadas três tentativas para que se avalie o cumprimento das tarefas, pois representa a o desafio mais difícil para o camundongo durante o teste.

Figura 8 – Aparato de avaliação do estado neurológico de severidade.



Legenda: Ilustração com as medidas utilizadas no aparato de avaliação do escore neurológico de severidade. *Fonte:* (SCHWARZBOLD *et al.*, 2010).

4.4.3 Teste do campo aberto

Para avaliar a atividade locomotora dos animais foi utilizado o teste do campo aberto, que consiste em uma arena cercada de bordas opacas contendo uma área central que geralmente é aversiva para os animais. O aparato é constituído de acrílico, com a base na cor cinza, nas medidas de 40 cm x 40 cm x 30 cm. No dia 4 após a segunda administração i.n. de dibam, os animais foram expostos de forma individual ao campo aberto para explorar livremente em um período de 5 minutos. A atividade locomotora foi monitorada por uma câmera posicionada acima das arenas para monitorar a atividade dos animais e coletar imagens para posterior análise dos índices de distância total percorrida (em metros), tempo de imobilidade (em segundos) e número de entradas no centro, no software AnyMaze®.

4.4.4 Teste da haste vertical

Este teste é comumente utilizado para avaliar o comportamento motor de bradicinesia em modelos animais da DP observando o giro que o animal realiza para descer uma haste, este comportamento é muito sensível às alterações na função nigroestriatal, uma vez que pacientes com a DP também possuem dificuldade de realizar um giro no próprio eixo. O aparato consiste em uma haste de madeira com 1 cm de diâmetro e 50 cm de altura conectada à uma plataforma preenchida com maravalha. O animal foi posicionado no topo da haste com a cabeça para cima, onde

ao soltar a cauda do animal, o tempo para formar um giro de 180° com a cabeça para baixo e descer foram registrados (OGAWA *et al.*, 1985).

4.4.5 Borrifagem com sacarose

O teste da borrifada com sacarose é utilizado para avaliar alguns aspectos do comportamento de autolimpeza dos animais após a borrifada de uma solução de sacarose a 10% em seu dorso. O gatilho de motivação ao comportamento de limpeza acontece devido à viscosidade da solução de sacarose, onde o pelo do animal fica viscoso/molhado. Ao iniciar a limpeza, o animal percebe a palatabilidade da solução borrifada, reforçando este comportamento (WILLNER, 2005)

O teste ocorreu em uma sala acusticamente isolada, com iluminação de cor vermelha onde os animais foram posicionados de maneira individual em tubos de acrílico onde a solução de água com sacarose a 10% foi borrifada duas vezes no dorso dos animais. Os animais foram testados em duplas e todo o procedimento foi monitorado e gravado em um sistema digital de gravação de vídeo.

Foram analisados o tempo que o animal levou para iniciar a autolimpeza e o tempo total gasto nesse comportamento foi registrado manualmente com a análise dos vídeos em uma janela de 5 minutos.

4.4.6 Suspensão pela cauda

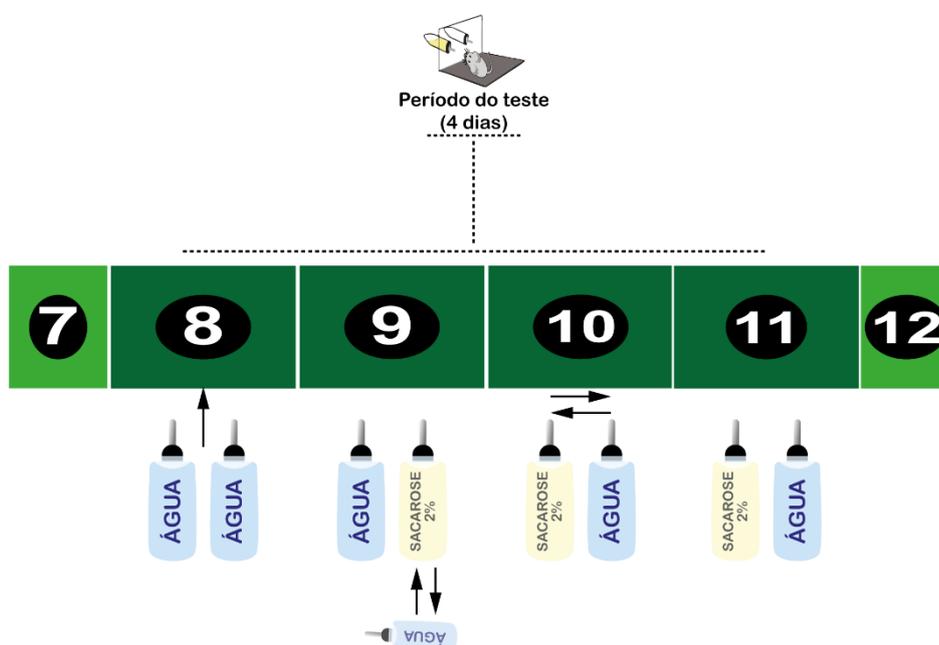
Neste teste os animais foram suspensos pela parte final da cauda em uma bancada a 60 cm do chão, com uma fita adesiva durante 6 minutos (STERU *et al.*, 1985). No procedimento, os animais foram alocados em trios e separados individualmente por uma baia de papelão onde as patas foram posicionadas em frente a câmera de monitoramento. Os parâmetros foram analisados posteriormente através das gravações de vídeo onde o tempo de imobilidade foi registrado manualmente.

4.4.7 Teste de preferência pela sacarose

O procedimento consistiu em duas etapas. Na etapa de treino, após os animais serem alocados individualmente em caixas moradia, dois bebedouros de água foram apresentados em lados opostos da grade. Passadas 24 h após esta etapa, um dos

bebedouros foi substituído por outro contendo sacarose na concentração de 2% em 250 ml, onde o volume foi aferido pela pesagem do bebedouro com água. Após 24 h da substituição do bebedouro, as suas posições foram invertidas e o volume aferido, passado outro período de 24 h o conteúdo de cada bebedouro foi medido e comparado com a pesagem inicial para estimar o consumo de cada uma delas e os animais realocados para suas caixas de origem (GOSHEN *et al.*, 2008; TADAIESKY *et al.*, 2010).

Figura 10 - Ilustração representando a troca de garrafas no teste de preferência pela sacarose.



Legenda: A troca de soluções no teste foi realizada entre os dias 8 ao 11 após a exposição ao dibam. No dia 8 os animais foram isolados em caixas com dois bebedouros contendo água, no dia 9, um dos bebedouros de água foi substituído por sacarose e aferido seu peso para determinar o volume. No dia 10, as garrafas foram aferidas novamente e trocadas de lado na caixa, no dia 11 as garrafas foram retiradas e aferidas, animais realocados para suas caixas de origem e o volume das soluções entre os dias 10 e 11 foram contabilizados no teste. *Fonte:* O autor

4.4.8 Nado forçado

Consiste em um cilindro de acrílico com 60 cm de altura que é preenchido com água a 25 ± 1 °C até a altura de 40 cm onde o animal é posicionado e seus movimentos são registrados em vídeo para posterior análise manual. O teste em camundongos teve a duração de 6 minutos onde os primeiros dois minutos foram considerados

tempo de treino, enquanto nos 4 minutos restantes foi avaliado o parâmetro de tempo de imobilidade (PORSOLT *et al.*, 1977). O comportamento de imobilidade foi considerado quando os animais ficaram flutuando sem movimentos ou realizando o mínimo de atividade necessária para manter sua cabeça para fora da água.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados coletados nos parâmetros comportamentais passaram pelo teste de distribuição amostral Kolmogorov-Smornov (K-S), no qual a função de distribuição do n amostral é comparada a uma função de distribuição teórica (RANILAS, 2016). Para acatar a hipótese de normalidade amostral, níveis de significância menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados. As amostras com distribuição normal passaram pelo teste de Grubb's para identificação de valores individuais discrepantes da distribuição amostral (*outliers*). Apenas o parâmetro de tempo no centro do teste de campo aberto no dia 14 apresentou 1 *outlier*, o qual foi removido da amostra. Para identificar possíveis diferenças significativas entre estas amostras, foram submetidas a análise de variância (ANOVA) seguida de teste *post-hoc* de Tukey para comparação entre os grupos, onde se incluíram a distância total percorrida no campo aberto realizado no dia 4, rotarod do dia 8 e todos os parâmetros do campo aberto no dia 14, sendo expressos graficamente pela média \pm erro padrão da média (EPM). Amostras que não passaram no teste de normalidade foram analisadas através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis com as múltiplas comparações realizadas através do teste de Dunn, estas análises foram feitas nos dados de ambos os escores neurológicos de severidade (dias 3 e 9), nos parâmetros de entradas e tempo no centro do campo aberto aplicado no dia 4, teste da haste vertical e rotarod aplicado no dia 15, que foram expressos através da mediana \pm intervalo interquartil.

Quanto ao protocolo de testes de comportamento tipo-depressivo, para a análise de distribuição amostral, identificação de *outliers* e possíveis diferenças estatísticas entre os grupos de acordo com seus respectivos tipos de distribuições, bem como suas representações gráficas, foram adotados os mesmos critérios descritos no protocolo de testes motores.

Os parâmetros de tempo no centro do teste do campo aberto e consumo de sacarose do teste de preferência pela sacarose apresentaram, respectivamente, 1 e 2 *outliers*. Quanto à distribuição, passaram no teste de normalidade os parâmetros

latência para a autolimpeza e tempo total de autolimpeza no teste da borrifagem com sacarose, distância total percorrida e entradas no centro do teste do campo aberto, e consumo de sacarose no teste de preferência pela sacarose, restando os parâmetros de tempo no centro do teste do campo aberto, tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e nado forçado que apresentaram distribuição anormal. Todos os dados foram registrados e armazenados utilizando o Excel® (pacote Office 365®), as análises estatísticas foram realizadas no software Prism® versão 8.2.1.

5 RESULTADOS

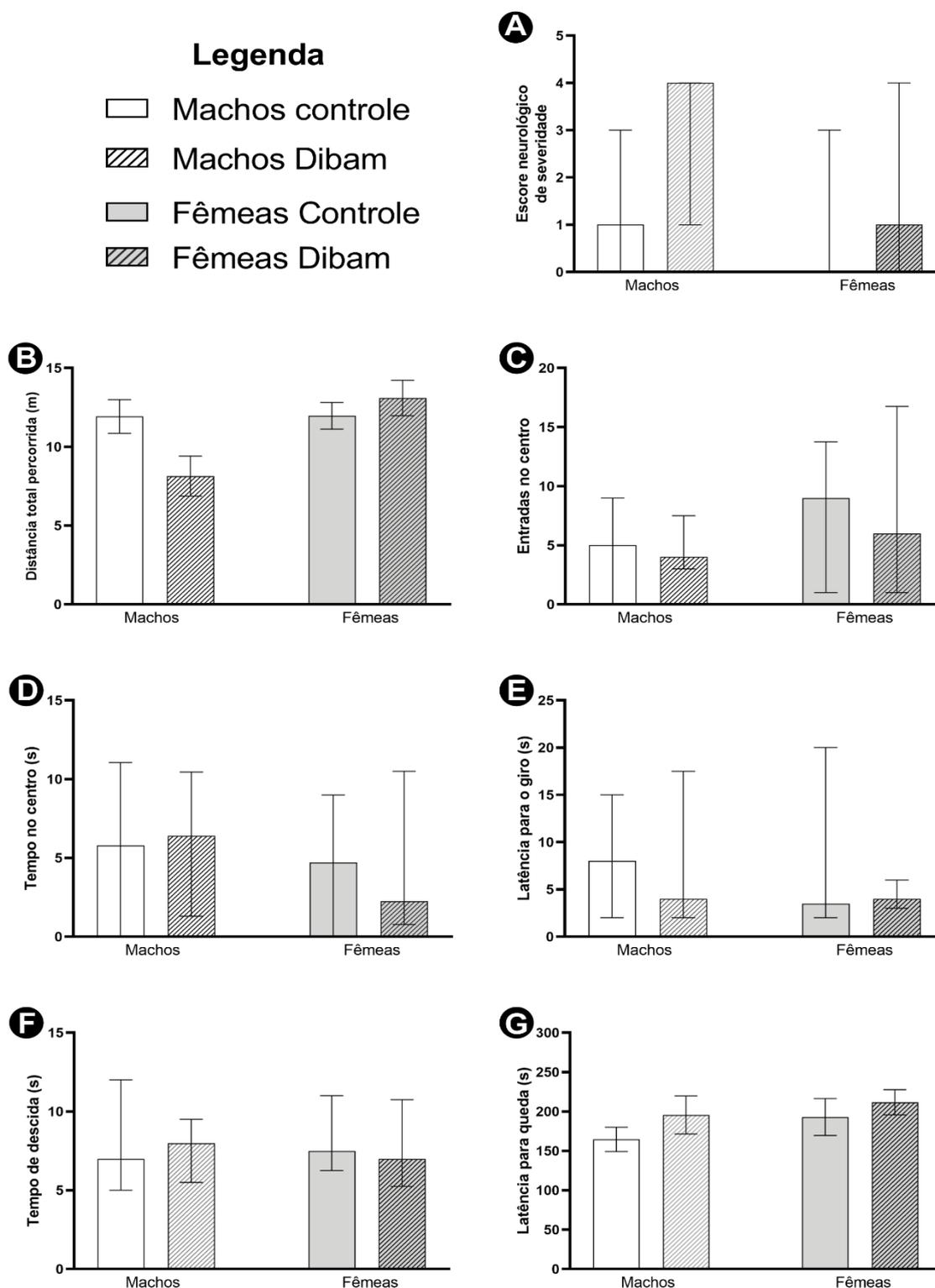
5.1 AVALIAÇÃO MOTORA

A exposição i.n. por dois dias consecutivos não alterou ($p>0,05$) aspectos neurológicos gerais dos camundongos (independente do sexo) no terceiro dia após a exposição (Fig. 11A). Também não foram observadas alterações ($p>0,05$) de aspectos relacionados à mobilidade e locomoção espontânea medidos através da distância total percorrida no teste do campo aberto (Fig. 11B) e de diferenças no comportamento tipo-ansioso verificado através do número de entradas e tempo no centro do campo aberto realizado no dia 4 após a exposição (Fig. 11C e D, respectivamente).

Não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos nos parâmetros motores observados através da latência para o giro e tempo de descida na haste vertical, 5 dias após a exposição (Fig. 11E e F).

Quanto aos resultados obtidos no rotarod no oitavo dia do protocolo, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e sexo no tempo de latência para a queda do cilindro em rotação do aparato (Fig. 11G)

Figura 11 – Efeitos dos primeiros 8 dias após a exposição ao Dibam, no estado neurológico geral, aspectos motores e comportamento tipo ansioso de camundongos fêmeas e machos.



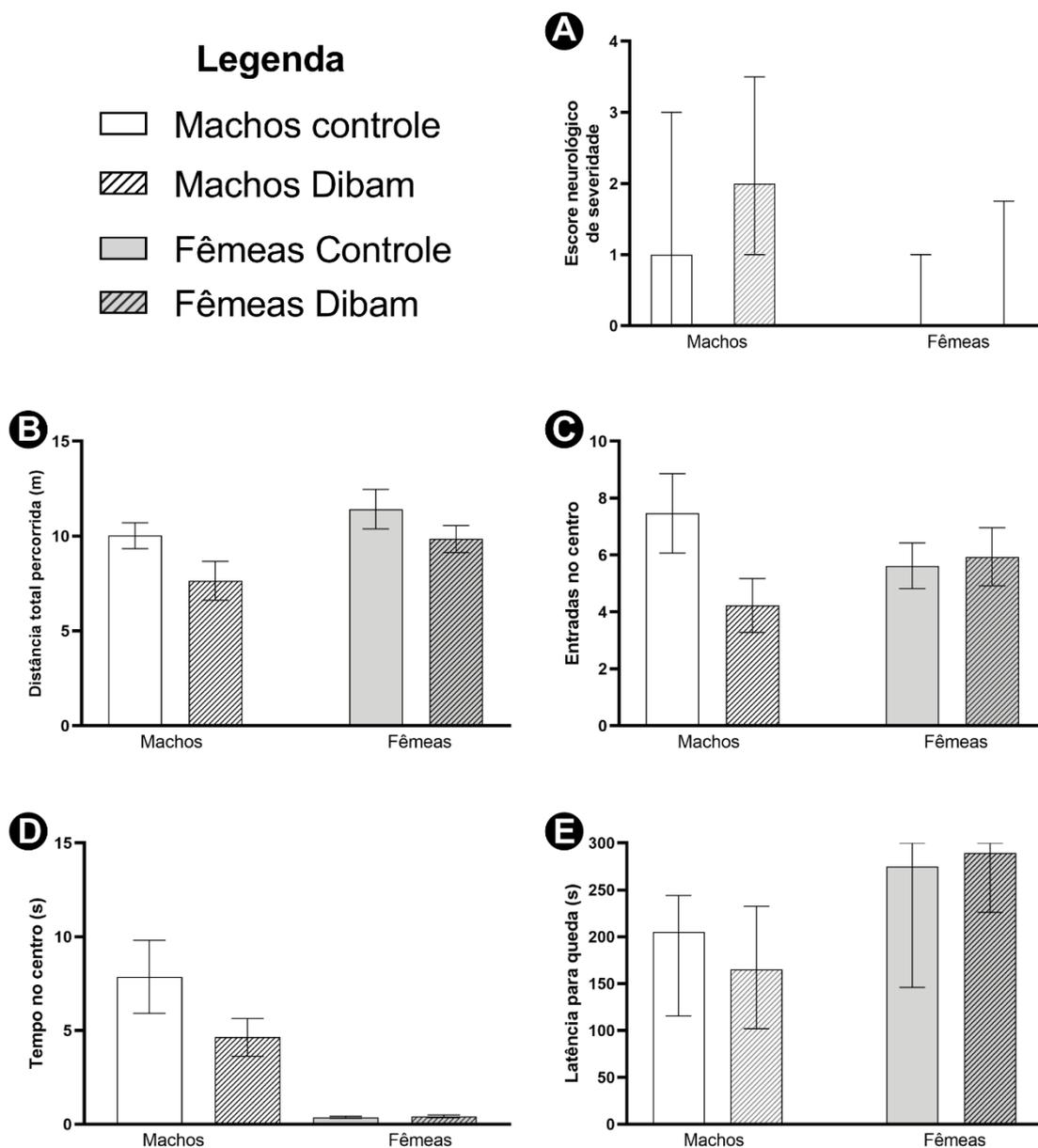
Legenda: Gráficos representando dados de parâmetros comportamentais de camundongos Swiss fêmeas e machos (n= 13-17/grupo) expostos ao Dibam ou solução salina via i.n, conforme descrito acima. Após a exposição ao Dibam, os animais foram avaliados pelo escore neurológico de severidade

no dia 3, (A) com dados representados em mediana \pm intervalo interquartil, teste do campo aberto no dia 4, onde os dados da distância total percorrida (B) estão representados em média \pm EPM, o número de entradas e tempo no centro (C-D) estão representados como mediana \pm intervalo interquartil. Também foram submetidos ao teste da haste vertical no dia 5, com os dados da latência para realizar o giro e o tempo de descida (E-F) estão representados como mediana \pm intervalo interquartil e o rotarod no dia 8 com a latência para a queda (G) representada em média \pm EPM.

Ainda com os mesmos grupos, três testes foram aplicados pela segunda vez para avaliação de possíveis efeitos tardios. O escore neurológico de severidade foi realizado no dia 9 (Fig. 12A) onde, assim como na primeira avaliação, também não foram observadas diferenças entre os grupos ($p>0,05$).

O teste do campo aberto realizado no dia 13, sendo que os grupos expostos ao dibam não apresentaram diferenças significativas com relação ao controle ($p>0,05$) nos parâmetros de distância total percorrida, número de entradas no centro e tempo de permanência no centro (Fig. 12 B-D). Entre os animais submetidos ao rotarod no dia 14 (Fig. 12E) não foram observadas diferenças em comparação aos grupos controle ($p>0,05$) na latência para a queda.

Figura 12 – Efeitos tardios a partir do dia 9 após a exposição ao Dibam, no estado neurológico geral, aspectos motores e comportamento tipo ansioso de camundongos fêmeas e machos.

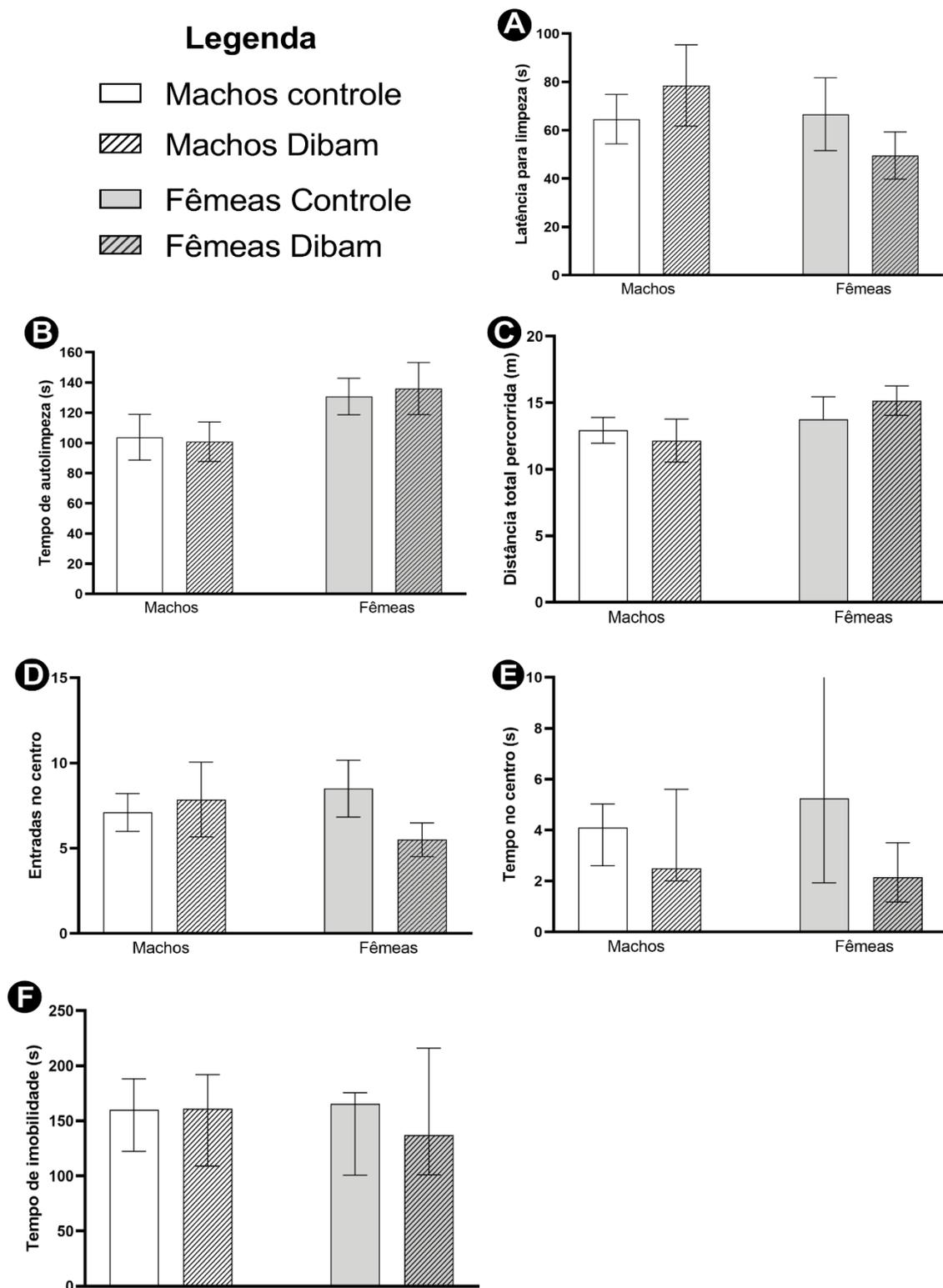


Legenda: Gráficos representando dados de parâmetros comportamentais de camundongos Swiss fêmeas e machos (n= 13-17/grupo) expostos ao dibam ou solução salina via i.n. Os animais foram reavaliados pelo escore neurológico de severidade no dia 9, (A) com dados representados em mediana \pm intervalo interquartil, teste do campo aberto, reavaliado no dia 14, onde os dados da distância total percorrida, número de entradas no centro e tempo no centro (B-D) estão representados em média \pm EPM. A reavaliação do rotarod no dia 15 (E) estão apresentadas como mediana \pm intervalo interquartil.

5.2 AVALIAÇÃO EMOCIONAL

Após dois dias consecutivos de exposição i.n. ao dibam, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) dos grupos expostos com relação aos seus respectivos grupos controle no teste de borrifagem com sacarose aplicado no segundo dia após as exposições, tanto nos critérios de latência para a autolimpeza (Fig. 13A) quanto no tempo total de autolimpeza (Fig. 13B). Com relação ao teste do campo aberto, nos parâmetros de distância total percorrida (Fig. 13C), entradas no centro (Fig. 13D) e tempo no centro (Fig. 13E), os grupos expostos ao dibam não apresentaram diferenças significativas com relação aos grupos controle ($p>0,05$). No tempo de imobilidade (Fig. 13F) avaliado pelo teste de suspensão pela cauda, também não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos expostos e os grupos controle.

Figura 13 – Efeitos dos primeiros 7 dias após a exposição ao dibam em parâmetros relacionados ao comportamento tipo-depressivo e ansioso, além de aspectos locomotores.

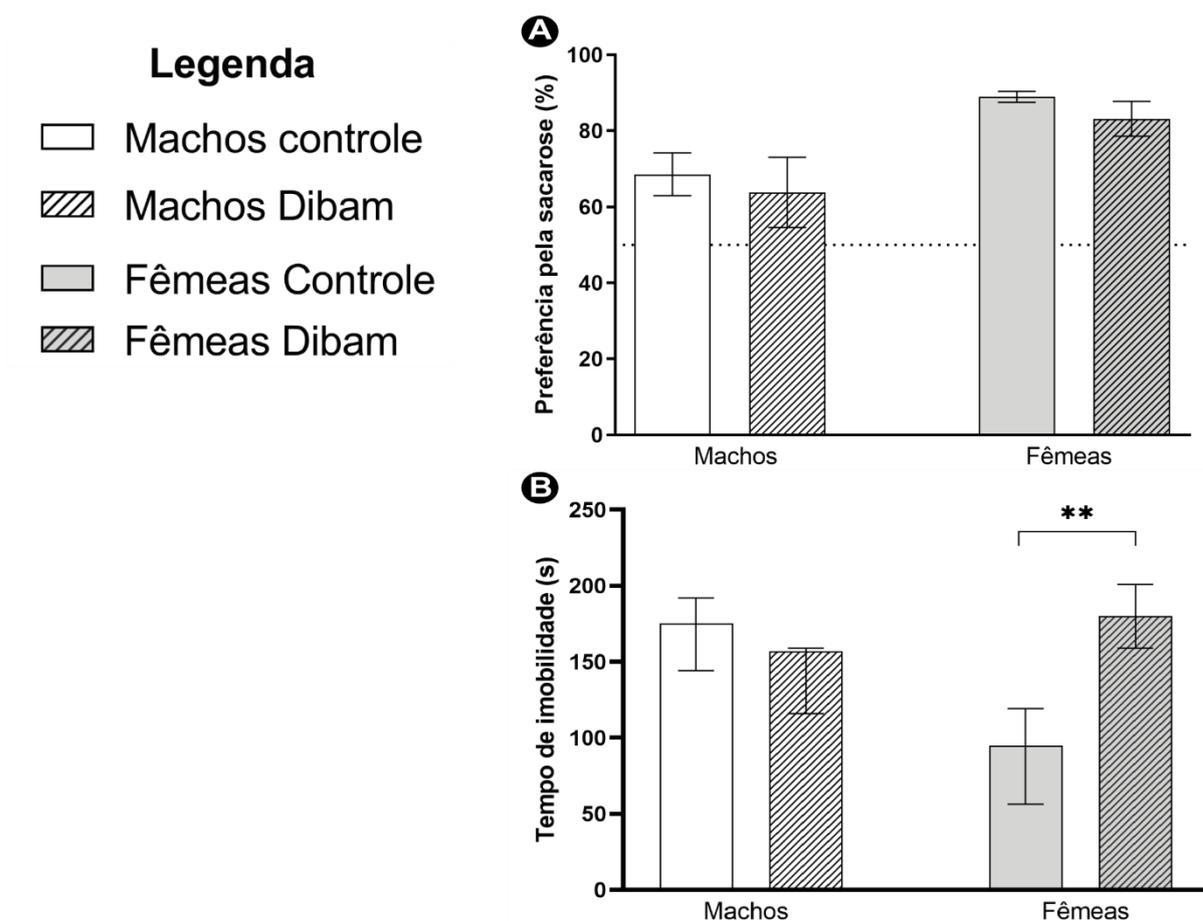


Legenda: Gráficos representando dados de parâmetros comportamentais de camundongos Swiss fêmeas e machos (n= 7-10/grupo) expostos ao dibam ou solução salina via i.n. Os animais foram avaliados através do teste de borrifagem com sacarose no dia 2 com dados da latência para

autolimpeza (A) e tempo total de autolimpeza (B) representados em média \pm EPM, teste do campo aberto no dia 4, com dados da distância total percorrida (C) e entradas no centro representados (D) em média \pm EPM e tempo no centro (E) representado em mediana \pm intervalo interquartil, teste de suspensão pela cauda no dia 5 com o tempo de imobilidade representado em mediana \pm intervalo interquartil.

Na segunda metade do protocolo de testes, 8 dias após a exposição ao dibam, não houve diferença significativa de preferência pela sacarose (Fig. 14A) no respectivo teste ($p>0,05$). Em uma avaliação mais tardia, foi observado maior tempo de imobilidade em fêmeas expostas ao pesticida (Fig. 14B) no teste do nado forçado, com diferença significativa ($p>0,05$) em relação ao seu grupo controle.

Figura 14 – Efeitos tardios da exposição ao dibam em parâmetros relacionados ao comportamento tipo-depressivo.



Legenda: Gráficos representando dados de parâmetros comportamentais de camundongos Swiss fêmeas e machos ($n= 7-10$ /grupo) expostos ao dibam ou solução salina via i.n. Os animais foram avaliados através do teste de preferência pela sacarose aplicado no dia 8 com a porcentagem relativa de consumo de sacarose (A) representada em média \pm EPM e teste do nado forçado aplicado no dia 14 com o tempo de imobilidade (B) representado em mediana \pm intervalo interquartil.

6 DISCUSSÃO

Mesmo com a incidência comum de acidentes envolvendo intoxicação aguda por pesticidas e efeitos colaterais de curto e médio prazo, é de grande importância o entendimento da relação entre a exposição crônica à pesticidas com a prevalência de algumas doenças persistentes a longo prazo, tendo em vista que a classificação de toxicidade para a saúde humana dos pesticidas atuais é baseada somente em estudos com exposição aguda (BRASIL, 2002).

Um dos primeiros estudos de neurotoxicidade do dibam demonstrou a toxicidade de sua administração crônica pela via sistêmica. Chou e colaboradores avaliaram camundongos C57BL/6 machos na haste vertical após duas semanas de aplicação subcutânea diária de 50 mg/kg, onde os animais expostos ao dibam tiveram um menor tempo de giro na haste em comparação ao grupo controle. O efeito persistiu por 8 semanas após a interrupção da exposição subcutânea, indicando que este não foi um efeito agudo (CHOU *et al.*, 2008b)

No presente estudo, os animais não apresentaram déficits motores, independente do sexo, após duas exposições i.n. de dibam, tanto nos primeiros 8 dias, quando nas reavaliações executadas do dia 9 ao dia 15. Resultados prévios já haviam demonstrado menor toxicidade do dibam pela via sistêmica ou i.n. Mack *et al.* descreveram que a administração do pesticida via i.p. de 50 mg/kg ao dia, durante 4 dias consecutivos, não provocou déficits motores em camundongos Swiss machos. Também neste estudo, o Dibam, em uma única administração com 1 mg/narina, não foi capaz de provocar alterações no estado neurológico geral dos animais (MACK *et al.*, 2018; MACK; PREDIGER; DAFRÉ, 2017).

Ainda com o mesmo método, porém outro protocolo de administração i.n. em dois dias consecutivos, o dibam alterou o estado neurológico geral no segundo dia após as exposições, indicando um déficit neurológico que foi revertido na reavaliação do dia 6, estes animais também apresentaram um comportamento do tipo ansiogênico, observado através na menor exploração da área central do campo aberto (MACK, *et al.*, 2018).

No presente trabalho, estas alterações comportamentais motoras não foram observadas tanto no escore neurológico de severidade quanto no campo aberto, indicando que a ausência de prejuízo motor pode tornar viável o estudo de sintomas não motores e suas diferenças, tanto em machos, quanto em fêmeas.

No protocolo de avaliação comportamental relacionado à emocionalidade, os testes envolvendo sacarose avaliam comportamentos motivacionais através da responsividade à recompensa dos animais (NESTLER; GOULD; MANJI, 2002; WILLNER, 2005). Discussões sobre o teste da borrifagem com sacarose em particular, demonstram que o teste também avalia condições de autocuidado dos animais (ISINGRINI *et al.*, 2010).

Os resultados observados tanto no teste da borrifagem com sacarose, aplicado na primeira semana após a exposição ao dibam, quanto no teste de preferência pela sacarose aplicado na segunda semana, indicaram a ausência de comportamento tipo-anedônico, tendo em vista que uma das principais características do sintoma anedônico em humanos é a baixa ou perda de motivação para atividades que, em uma situação saudável, seriam prazerosas ao indivíduo (CRASKE *et al.*, 2016) e estão relacionadas à atividade dopaminérgica envolvendo estruturas como a VTA, amígdala e estriado ventral (DER-AVAKIAN; MARKOU, 2012). Portanto, a ausência deste comportamento observada nos testes deste trabalho pode indicar o funcionamento normal destas estruturas nos animais observados durante as primeira duas semanas.

As duas avaliações para o comportamento tipo-depressivo nos animais apresentaram resultados discrepantes. O teste de suspensão pela cauda aplicado na primeira semana não apresentou diferenças no tempo de imobilidade tanto em machos quanto em fêmeas, com relação aos seus respectivos grupos controle. Este teste é utilizado na triagem de drogas antidepressivas em potencial e na avaliação de outras variáveis que podem afetar os comportamentos relacionados à depressão (CAN *et al.*, 2011). Este teste é baseado no paradigma de que os animais submetidos ao estresse de curto prazo e inevitável de serem suspensos pela cauda, podem desenvolver uma postura imóvel diante do desespero de uma situação estressora inescapável (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

Da mesma maneira, o teste do nado forçado foi desenvolvido na década de 1970 por Porsolt e colaboradores como uma ferramenta para avaliar a eficácia clínica de medicamentos antidepressivos (PORSOLT *et al.*, 1977; PORSOLT *et al.*, 1978). É amplamente utilizado para a avaliação do comportamento tipo-depressivo com base na suposição de que, ao colocar o animal em um cilindro preenchido com água, o animal fará movimentos para escapar da situação estressora, enquanto o comportamento de imobilidade é avaliado como um parâmetro de desespero comportamental (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015). Na avaliação do nado

forçado foi possível observar um maior tempo de imobilidade das fêmeas expostas ao dibam com relação ao seu grupo controle, enquanto o grupo exposto dos machos não foi afetado, indicando assim uma maior vulnerabilidade das fêmeas ao comportamento tipo-depressivo quando expostas ao dibam, em um período de até 14 dias. O tempo de imobilidade observado no nado forçado não está relacionado a déficit motor, considerando que não foram observadas alterações nos parâmetros motores avaliados pelo campo aberto neste mesmo grupo.

O aparecimento tardio do comportamento tipo-depressivo de maneira tempo-dependente também foi observado em um outro estudo de nosso laboratório utilizando ratos machos lesionados com 6-OHDA no estriado dorsolateral (EDL) sem haver comprometimento motor, foi observado o papel diferencial do EDL e córtex pré-frontal em comportamentos relacionados à anedonia e depressão, respectivamente. Este estudo descreveu uma dissociação entre estes dois sintomas, com o comportamento do tipo-anedônico sendo observado nos primeiros sete dias após a lesão e o comportamento do tipo-depressivo observado somente 21 dias após a lesão (MATHEUS *et al.*, 2016).

Diferenças entre fêmeas e machos após exposição a neurotoxinas também são demonstrados em estudos pré-clínicos. Em um estudo de nosso laboratório foi observada maior vulnerabilidade de camundongos C57BL/6 fêmeas com 15 meses de idade ao MPTP, onde este grupo apresentou maior taxa de mortalidade após a administração i.n. desta toxina (MATHEUS *et al.*, 2012).

Existem algumas evidências sobre a participação de neurotrofinas que podem explicar esta vulnerabilidade. A alteração nos níveis de neurotrofinas é uma das características tanto da DP quanto da depressão (HOWELLS *et al.*, 2000). Outros estudos mostram níveis anormais de BDNF (do inglês: *Brain-derived neurotrophic factor*) no hipocampo e córtex pré-frontal de pacientes depressivos (DUMAN *et al.*, 2012). Corroborando com estas evidências, outro estudo de nosso laboratório observou uma correlação entre maior depleção de BDNF e GDNF (do inglês: *Glial-derived neurotrophic factor*) no hipocampo e córtex pré-frontal em camundongos C57BL/6 fêmeas que também foram mais vulneráveis ao comportamento tipo-depressivo após aplicação i.n. de MPTP (SCHAMNE *et al.*, 2018).

A existência de diferenças entre mulheres e homens com relação às manifestações clínicas da DP têm sido relatadas em muitos estudos. Enquanto homens podem apresentar predominantemente sintomas motores, mulheres relatam

maior prevalência de sintomas ligados à emocionalidade como ansiedade e depressão (SCOTT *et al.*, 2000). As características dos sintomas não motores em homens estão ligadas ao déficit de atenção e comportamento inadequado, enquanto as mulheres, além da depressão, sofrem com o embotamento afetivo (MILLER; CRONIN-GOLOMB, 2010).

Em outros estudos com animais também é possível observar diferenças comportamentais entre fêmeas e machos utilizando a administração de toxinas. Um estudo com a aplicação sistêmica do MPTP, que assim como o dibam, também possui características oxidativas, Unzeta e colaboradores demonstraram que camundongos C57BL/6 fêmeas têm maior resistência ao seu efeito neurotóxico em comparação com machos e que esta característica poderia estar relacionada a enzima MAO-B, que faz a conversão do MPTP para o seu substrato mais tóxico, o MPP⁺ (UNZETA *et al.*, 1994). Os efeitos oxidativos do dibam, de maneira diferente do MPTP, não possuem ação específica de maneira dependente de enzima, são efeitos sistêmicos que afetam várias estruturas e mecanismos de sinalização celular. A atenuação de seus efeitos depende unicamente das defesas antioxidantes celulares.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível observar que a administração i.n. de 1 mg/ml de dibam por dois dias consecutivos não foi suficiente para causar déficits motores e danos neurológicos tanto em fêmeas quanto em machos. Além disso também não foram observadas alterações motoras tempo-dependentes tanto na primeira semana quanto na segunda semana pós administração.

As duas administrações consecutivas i.n. de 1 mg/ml de dibam também não causaram alterações relacionadas ao comportamento tipo-anedônico em fêmeas e machos, tanto na primeira quanto na segunda semana.

O comportamento tipo-depressivo não foi observado na primeira semana após as administrações, porém este comportamento foi observado em fêmeas, 14 dias após a exposição ao dibam.

Finalmente, tendo em vista o conjunto de resultados, é possível observar que a exposição ao dibam pode causar um efeito tipo-depressivo em camundongos swiss fêmeas e este efeito acontece de maneira tardia.

8 PERSPECTIVAS

É possível afirmar que, assim como na DP quanto na depressão, as mulheres estão mais vulneráveis aos sintomas relacionados à emocionalidade.

A carência de estudos relacionados à toxicidade crônica dos ditiocarbamatos e demais pesticidas, assim como a quantidade de pessoas expostas à estas substâncias trazem uma grande relevância para este tema de pesquisa.

Estudos adicionais são necessários para identificar quais estruturas cerebrais e vias de sinalização neuronais estão envolvidas, assim como meios de tratamento para atenuar os efeitos tóxicos e translacionar para possíveis efeitos do dibam e demais ditiocarbamatos em humanos expostos de maneira ocupacional.

9 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; KHAKSAR, M. R. **Sodium Dimethyldithiocarbamate**. Third Edited. [S. l.]: Elsevier, 2014. v. 4 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01205-7>

ABREU, Pedro Henrique Barbosa de; ALONZO, Herling Gregorio Aguilar. O agricultor familiar e o uso (in)seguro de agrotóxicos no município de Lavras/MG. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, [s. l.], v. 41, n. 0, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2317-6369000130015>

ALTHAUS, Astrid *et al.* Frequency and treatment of depressive symptoms in a Parkinson's disease registry. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 626–632, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.01.016>

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. *E-book*.

ANTZOULATOS, Eleni *et al.* SEX DIFFERENCES IN MOTOR BEHAVIOR IN THE MPTP MOUSE. [s. l.], v. 95, n. 4, p. 466–472, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.03.009>

ASCHERIO, Alberto; SCHWARZSCHILD, Michael A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 1257–1272, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)

AZEVEDO, Luiz Antônio Siqueira de. **Fungicidas protetores – fundamentos para uso racional**. 2. ed. Campinas: Emopi gráfica, 2017.

BAIER, Carlos Javier *et al.* Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 64, n. July, p. 63–72, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.10.004>

BARBOSA, Maira Tonidandel *et al.* Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). **Movement Disorders**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 800–808, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.20806>

BARLOW, Brian K. *et al.* Modulation of antioxidant defense systems by the environmental pesticide maneb in dopaminergic cells. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 63–75, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2004.07.004>

BARTELS, Anna L. *et al.* Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: A possible role in progressive neurodegeneration. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 1818–1824, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.02.002>

BASTÍAS-CANDIA, Sussy; ZOLEZZI, Juan M; INESTROSA, Nivaldo C. Revisiting the Paraquat-Induced Sporadic Parkinson's Disease-Like Model. [s. l.], 2018.

BEAR, Mark F. **Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso**. [S. l.]: Artmed Editora, 2017. ISSN 01027182.v. 4 Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-71822013000300002>

BECKER, C. *et al.* Risk of incident depression in patients with Parkinson disease in the UK. **European Journal of Neurology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 448–453, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03176.x>

BERRIDGE, Kent C; ROBINSON, Terry E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Research Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 309–369, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00019-8)

BESELER, Cheryl *et al.* Depression and pesticide exposures in female spouses of licensed pesticide applicators in the agricultural health study cohort. [s. l.], v. 18, n. 3, p. 382–386, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03161.x.Clinical>

BHATTACHARYA, Amitabh *et al.* Overview of sleep disturbances and their management in Parkinson plus disorders. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 415, p. 116891, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116891>

BISBAL, Mariano; SANCHEZ, Mónica. Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: A mechanistic approach. **Neural Regeneration Research**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 762–766, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.249847>

BJORKLUND, Geir *et al.* Metals and Parkinson's Disease: Mechanisms and Biochemical Processes. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 25, n. 19, p. 2198–2214, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867325666171129124616>

BLANC-LAPIERRE, A. *et al.* Effets chroniques des pesticides sur le système nerveux central: État des connaissances épidémiologiques. **Revue d'Epidémiologie et de Sante Publique**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 389–400, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.respe.2012.03.006>

BLANDINI, Fabio *et al.* **Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease**. [S. l.: s. n.], 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00067-2)

BLOCQ, P; MARINESCO, G. Sur un cas de tremblement parkinsonien hémiparétique symptomatique d'une tumeur du pédoncule cérébral. *In*: , 1893. **C R Soc Bio**. [S. l.: s. n.], 1893. p. 105–11.

BOGERTS, Bernhard. A brainstem atlas of catecholaminergic neurons in man, using melanin as a natural marker. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 197, n. 1, p. 63–80, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cne.901970106>

BRAAK, Heiko *et al.* Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 318, n. 1, p. 121–134, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>

BRAAK, Heiko *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 197–211, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)

BRAAK, Review Heiko; GHEBREMEDHIN, Estifanos; TREDICI, Kelly Del. Stages in the development of Parkinson ' s disease-related pathology. [s. l.], p. 121–134, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>

BRASIL. **DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002**. [S. l.], 2002. Disponível em: file:///C:/Users/neida_ose3bzm/Desktop/decreto-4074-2002-decreto-dos-agrotoxicos.pdf.

BRECKENRIDGE, Charles B. *et al.* Association between Parkinson's disease and cigarette smoking, rural living, well-water consumption, farming and pesticide use: Systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e0151841, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151841>

BRISSAUD, Édouard. **Leçons sur les maladies nerveuses**. [S. l.]: Masson, 1899. v. 2

BROWN, R. G.; MACCARTHY, B. Psychiatric morbidity in patients with Parkinson's disease. **Psychological Medicine**, [s. l.], v. 20, n. 01, p. 77, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0033291700013246>

BRUNDIN, Patrik *et al.* Research in motion: The enigma of Parkinson's disease pathology spread. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 741–745, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrn2477>

CAN, Adem *et al.* The Tail Suspension Test. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 58, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/3769>

CARLSSON, Arvid. THE OCCURRENCE, DISTRIBUTION AND PHYSIOLOGICAL ROLE OF CATECHOLAMINES IN THE NERVOUS SYSTEM. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 490 LP – 493, 1959. Disponível em: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/11/2/490.abstract>

CASIDA, John E. *et al.* Benomyl, aldehyde dehydrogenase, DOPAL, and the catecholaldehyde hypothesis for the pathogenesis of parkinsons disease. **Chemical Research in Toxicology**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1359–1361, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/tx5002223>

CHARCOT, Jean Martin. **Lecons sur, les maladies du système nerveux**. [S. l.]: Lecrosnier et Babé, 1886. v. 1

CHAUDHURI, K R; HEALY, D G; SCHAPIRA, a H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 235–245, 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(06)70373-8)

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. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70373-8)

CHOU, Arthur P. *et al.* Ziram causes dopaminergic cell damage by inhibiting E1 ligase of the proteasome. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 50, p. 34696–34703, 2008a. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M802210200>

CHOU, Arthur P. *et al.* Ziram causes dopaminergic cell damage by inhibiting E1 ligase of the proteasome. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 50, p. 34696–34703, 2008b. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M802210200>

CICCHETTI, Francesca; DROUIN-OUELLET, Janelle; GROSS, Robert E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 475–483, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.06.005>

CLARK, E. P. The occurrence of rotenone in the Peruvian fish poison "cube". **Science**, [s. l.], v. 70, n. 1820, p. 478–479, 1929. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.70.1820.478-a>

COLLE, Dirleise *et al.* Early Postnatal Exposure to Paraquat and Maneb in Mice Increases Nigrostriatal Dopaminergic Susceptibility to a Re-challenge with the Same Pesticides at Adulthood: Implications for Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 210–226, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00097-9>

CRASKE, Michelle G. *et al.* Treatment for Anhedonia: A Neuroscience Driven Approach. **Depression and Anxiety**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 927–938, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/da.22490>

CRYAN, John F.; MOMBÉREAU, Cedric; VASSOUT, Annick. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 29, n. 4–5, p. 571–625, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.009>

DANIEL, KENYON, G. Copper-binding compounds as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 135, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2741/2054>

DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. Dysfunction of the locus coeruleus-norepinephrine system and related circuitry in Parkinson's disease-related dementia. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, [s. l.], v. 84, n. 7, p. 774–783, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jnnp-2011-301817>

DENNIS, Kathleen E.; VALENTINE, William M. Ziram and sodium N,N - dimethyldithiocarbamate inhibit ubiquitin activation through intracellular metal transport and increased oxidative stress in HEK293 Cells. **Chemical Research in Toxicology**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 682–690, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/tx500450x>

DER-AVAKIAN, Andre; MARKOU, Athina. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 68–77, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.005>

DHURIA, Shyeilla V.; HANSON, Leah R.; FREY, William H. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 1654–1673, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.21924>

DOORN, Jonathan A. *et al.* Aldehyde dehydrogenase inhibition generates a reactive dopamine metabolite autotoxic to dopamine neurons. **Parkinsonism Related Disorders**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 1–8, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/nn300902w.Release>

DORSEY, Er *et al.* Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, [s. l.], v. 68, p. 384–386, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000271777.50910.73>

DOTY, Richard L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 329–339, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80>

DOTY, Richard L.; KAMATH, Vidyulata. The influences of age on olfaction: A review. **Frontiers in Psychology**, [s. l.], v. 5, n. FEB, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00020>

DRUI, G *et al.* Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 358–367, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mp.2013.3>

DUMAN, Ronald S. *et al.* Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 35–41, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.044>

ELBAZ, Alexis; MOISAN, Frédéric. The scientific bases to consider Parkinson's disease an occupational disease in agriculture professionals exposed to pesticides in France. **Journal of Epidemiology and Community Health**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 319–321, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jech-2015-205455>

EMMANOUILIDOU, Evangelia; STEFANIS, Leonidas; VEKRELLIS, Kostas. Cell-produced α -synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 953–968, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.008>

ERRO, Roberto *et al.* Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: classification and management. [s. l.], p. 1–10, 2015.

FARABAUGH, Amy H *et al.* Pattern of Depressive Symptoms in Parkinson's Disease. **Psychosomatics**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 448–454, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.psy.50.5.448.Pattern>

FEI, Qingyan *et al.* Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependent mechanism. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 283, n. 6, p. 3357–3364, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M708451200>

FLIERL, Michael A. *et al.* Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. **Nature Protocols**, [s. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.148>

FRANÇA. **Decreto nº 2012-665, de 4 de maio de 2012: Revê e complementa as tabelas de doenças ocupacionais na agricultura anexadas ao livro VII do código da pesca rural e marítima.** [S. l.], 2012. Disponível em: http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=F02B64383C21B5FF75E0565AE7309CB6.tpdjo17v_1?cidTexte=JORFTEXT000025804441&categorieLien=id. Acesso em: 25 ago. 2020.

FREIS, Edward D. Mental Depression in Hypertensive Patients Treated for Long Periods with Large Doses of Reserpine. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 251, n. 25, p. 1006–1008, 1954. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJM195412162512504>

FUJITA, Atsuhiko *et al.* MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mouse brain is attenuated after subsequent intranasal administration of (R)-ketamine: a role of TrkB signaling. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 237, n. 1, p. 83–92, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05346-5>

GALLEGOS, Cristina Eugenia *et al.* Intranasal glyphosate-based herbicide administration alters the redox balance and the cholinergic system in the mouse brain. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 77, n. January, p. 205–215, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.01.007>

GOETZ, Christopher G. The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>

GOLDMAN, Jennifer G.; SIEG, Erica. Cognitive Impairment and Dementia in Parkinson Disease. **Clinics in Geriatric Medicine**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 365–377, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cger.2020.01.001>

GOLDSTEIN, David S. *et al.* Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 126, n. 5, p. 591–603, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jnc.12345>

GORECKI, Anastazja M. *et al.* The gut-brain axis and gut inflammation in Parkinson's disease: stopping neurodegeneration at the toll gate. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, [s. l.], p. 1–4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1763956>

GORELL, Jay M. *et al.* Occupational metal exposures and the risk of Parkinson's disease. **Neuroepidemiology**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 303–308, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000026225>

GOSHEN, I *et al.* Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 717–728, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002055>

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. June, p. 205–218, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.08.012>

GUNNARSSON, Lars Gunnar; BODIN, Lennart. Occupational exposures and neurodegenerative diseases—a systematic literature review and meta-analyses. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 337, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph16030337>

GUO, Ji Dong *et al.* Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 1817–1825, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3406>

HANAGASI, Hasmet A.; TUFEKCIOGLU, Zeynep; EMRE, Murat. Dementia in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 374, p. 26–31, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.01.012>

HIRST, Jennifer A. *et al.* The need for randomization in animal trials: An overview of systematic reviews. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098856>

HÖGLINGER, Günter U *et al.* A new dopaminergic nigro - olfactory projection. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 130, n. 3, p. 333–348, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1451-y>

HOLDORFF, Bernd. Centenary of Tretiakoff's thesis on the morphology of Parkinson's disease, evolved on the grounds of encephalitis lethargica pathology. **Journal of the History of the Neurosciences**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 387–398, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0964704X.2019.1622361>

HOWELLS, D.W. *et al.* Reduced BDNF mRNA Expression in the Parkinson's Disease Substantia Nigra. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 166, n. 1, p. 127–135, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7483>

IBAMA. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. [S. l.], 2016. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 10 jun. 2018.

IBGE. **Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>. Acesso em: 6 maio 2020.

ISINGRINI, Elsa *et al.* Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e10404, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010404>

JOHNSON, Michaela E. *et al.* Triggers, Facilitators, and Aggravators: Redefining Parkinson's Disease Pathogenesis. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 4–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.09.007>

KAPPES, Claudinei *et al.* Qualidade fisiológica de sementes e crescimento de plântulas de feijoeiro, em função de aplicações de paraquat em pré-colheita. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 9–18, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1983-40632012000100002>

KIM, Christine; ALCALAY, Roy. Genetic Forms of Parkinson's Disease. **Seminars in Neurology**, [s. l.], v. 37, n. 02, p. 135–146, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0037-1601567>

KLEIN, Christine; WESTENBERGER, Ana. Genetics of Parkinson ' s Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, [s. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.1101/cshperspect.a008888>

KLIVENYI, Peter; VECSEI, Laszlo. Pharmacological models of parkinson's disease in rodents. *In: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*. [S. l.: s. n.], 2011. v. 793, p. 211–227. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-328-8_14

KORTEKAAS, Rudie *et al.* Blood-brain barrier dysfunction in Parkinsonian midbrain in vivo. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 176–179, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ana.20369>

KUHN, W. *et al.* High prevalence of parkinsonism after occupational exposure to lead- sulfate batteries. **Neurology**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 1885–1886, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.50.6.1885>

LANGSTON, J. *et al.* Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, [s. l.], v. 219, n. 4587, p. 979–980, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.6823561>

LEE, Andrea; GILBERT, Rebecca M. Epidemiology of Parkinson Disease. **Neurologic Clinics**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 955–965, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012>

LEENTJENS, A.F.G. *et al.* The Contribution of Somatic Symptoms to the Diagnosis of Depressive Disorder in Parkinson's Disease. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 74–77, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/jnp.15.1.74>

LEWY, Friederich Heinrich. Paralysis agitans. I. **Pathologische anatomie. Handbuch der neurologie**, [s. l.], 1912.

LIEBERMAN, A. **Depression in Parkinson's disease - A review**. [S. l.: s. n.], 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00536.x>

LILL, Christina M. Genetics of Parkinson's disease. **Molecular and Cellular Probes**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 386–396, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.11.001>

LOPEZ-MUNOZ, Francisco; ALAMO, Cecilio. Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 15, n. 14, p. 1563–1586, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138161209788168001>

MACK, Josiel M *et al.* Intranasal administration of sodium dimethyldithiocarbamate induces motor deficits and dopaminergic dysfunction in mice. **Neurotoxicology**, [s. l.], v. 66, p. 107–120, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.011>

MACK, Josiel Mileno *et al.* Neuroprotective effects of melatonin against neurotoxicity induced by intranasal sodium dimethyldithiocarbamate administration in mice. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 80, p. 144–154, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.07.008>

MACK, Josiel Mileno; PREDIGER, Rui D S; DAFRÉ, Luiz Alcir. **Efeitos da melatonina sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela administração intranasal de dimetilditiocarbamato de sódio em camundongos**. 221 f. 2017. - Universidade Federal de Santa Catarina, [s. l.], 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/183234>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0352-x>

MARQUES, Naiani Ferreira *et al.* Guanosine prevents depressive-like behaviors in rats following bilateral dorsolateral striatum lesion induced by 6-hydroxydopamine. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 372, p. 112014, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112014>

MARQUES, Paula Teixeira *et al.* Édouard Brissaud: Distinguished neurologist and Charcot's pupil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 76, n. 7, p. 490–493, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0004-282x20180063>

MARSIT, C. J. Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 218, n. 1, p. 71–79, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.106971>

MARTINEZ-MARTIN, Pablo. The importance of non-motor disturbances to quality of life in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 310, n. 1–2, p. 12–16, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.05.006>

MATHEUS, Filipe C. *et al.* Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 235, n. 2, p. 263–272, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.017>

MATHEUS, Filipe C. *et al.* Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 3891–3899, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9330-z>

MAYBERG, Helen S. Modulating dysfunctional limbic-cortical circuits in depression: towards development of brain-based algorithms for diagnosis and optimised treatment. **British Medical Bulletin**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 193–207, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bmb/65.1.193>

MAYEUX, Richard *et al.* Clinical and Biochemical Features of Depression in Parkinson's Disease. [s. l.], n. June, p. 756–759, 1986.

MAYEUX, Richard. Depression in the patient with Parkinson's disease. **The Journal of clinical psychiatry**, [s. l.], v. 51, p. 20–23, 1990.

MCDONALD, William M.; RICHARD, Irene H.; DELONG, Mahlon R. Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 363–375, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00530-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00530-4)

MILLER, Gary Wright. **Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research**. United States: [s. n.], 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm223>

MILLER, Ivy N.; CRONIN-GOLOMB, Alice. GENDER DIFFERENCES IN PARKINSON'S DISEASE: CLINICAL CHARACTERISTICS AND COGNITION. **Movement Disorders**, [s. l.], v. 25, n. 16, p. 2695–2703, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.23388>

MORATO, GS; LEMOS, T; TAKAHASHI, RN. Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. **Neurotoxicol Teratol**, [s. l.], v. 11, n. 5, 1989.

NAMBU, A *et al.* Dual somatotopical representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 2671–2683, 1996. Disponível em: <https://doi.org/http://www.jneurosci.org/content/16/8/2671>

NESTLER, Eric J.; GOULD, Elizabeth; MANJI, Husseini. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 503–528, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01405-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01405-1)

OGAWA, N. *et al.* A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 435–441, 1985. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3878557>

OLIVEIRA DE CARVALHO, Alessandro *et al.* Physical Exercise For Parkinson's Disease: Clinical And Experimental Evidence. **Clinical Practice & Epidemiology in Mental Health**, [s. l.], v. 14, n. 14, p. 89–98, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1745017901814010089>

OSSOWSKA, Krystyna; LORENC-KOCI, El. Depression in Parkinson ' s disease. **Pharmacological Reports**, [s. l.], v. 65, p. 1545–1557, 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71516-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71516-0)

PAPP, András *et al.* Effects on the central and peripheral nervous activity in rats elicited by acute administration of lead, mercury and manganese, and their combinations. **Journal of Applied Toxicology**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 374–380, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jat.1152>

PARK, Jin Sung; DAVIS, Ryan L.; SUE, Carolyn M. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, [s. l.], v. 18, n. 5, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11910-018-0829-3>

PARKINSON, James. An essay on the shaking palsy. 1817. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 223–236, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>

PENG, Jun *et al.* Iron and paraquat as synergistic environmental risk factors in sporadic Parkinson's disease accelerate age-related neurodegeneration. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 26, p. 6914–6922, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1569-07.2007>

PEREIRA, Vitor Silva; HIROAKI-SATO, Vinícius Antonio. A brief history of antidepressant drug development: from tricyclics to beyond ketamine. **Acta Neuropsychiatrica**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 307–322, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/neu.2017.39>

PINTER, Bernadette *et al.* Mortality in Parkinson's disease: A 38-year follow-up study. **Movement Disorders**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 266–269, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.26060>

POEWE, Werner *et al.* Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 3, p. 1–21, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>

POLYMERPOULOS, M. H. Mutation in the -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. **Science**, [s. l.], v. 276, n. 5321, p. 2045–2047, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>

PORSOLT, R D; BERTIN, A; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, [s. l.], v. 229, n. 2, p. 327–336, 1977. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/596982>

PORSOLT, Roger D.; BERTIN, Anne; JALFRE, Maurice. "Behavioural despair" in rats and mice: Strain differences and the effects of imipramine. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 291–294, 1978. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90414-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90414-4)

PREDIGER, Rui D. S. *et al.* Intranasal Administration of Neurotoxicants in Animals: Support for the Olfactory Vector Hypothesis of Parkinson's Disease. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 90–116, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12640-011-9281-8>

PREDIGER, Rui D.S. *et al.* The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 202, n. 2, p. 391–403, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.07.001>

PRZEDBORSKI, Serge. The two-century journey of Parkinson disease research. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 251–259, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.25>

RANI DAS, Keya. A Brief Review of Tests for Normality. **American Journal of Theoretical and Applied Statistics**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 5, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.11648/j.ajtas.20160501.12>

RAY DORSEY, E. *et al.* Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 939–953, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3)

RIEDEL, Oliver *et al.* Frequency of dementia, depression, and other neuropsychiatric symptoms in 1,449 outpatients with Parkinson's disease. **Journal of neurology**, [s. l.], v. 257, n. 7, p. 1073–1082, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5465-z>

ROCHA, Emily M.; DE MIRANDA, Briana; SANDERS, Laurie H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 109, p. 249–257, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.004>

RODRIGUES, Marco Antonio Tavares. Classificação De Fungicidas De Acordo Com O Mecanismo De Ação Proposto Pelo Frac. [s. l.], p. 249, 2006. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/97224>

ROJO, Ana I. *et al.* Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 208, n. 1, p. 120–126, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.07.022>

SAGNA, Atami; GALLO, Joseph J.; PONTONE, Gregory M. Systematic review of factors associated with depression and anxiety disorders among older adults with Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 708–715, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.03.020>

SALAMONE, J. D. *et al.* Nucleus Accumbens Dopamine and the Regulation of Effort in Food-Seeking Behavior: Implications for Studies of Natural Motivation, Psychiatry, and Drug Abuse. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 305, n. 1, p. 1–8, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/jpet.102.035063>

SASAJIMA, Hitoshi *et al.* Intranasal administration of rotenone in mice attenuated olfactory functions through the lesion of dopaminergic neurons in the olfactory bulb. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 51, p. 106–115, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.10.006>

SASAJIMA, Hitoshi *et al.* Intranasal administration of rotenone to mice induces dopaminergic neurite degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 108–112, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00654>

SCHAMNE, Marissa Giovanna *et al.* The Gender-Biased Effects of Intranasal MPTP Administration on Anhedonic- and Depressive-Like Behaviors in C57BL/6 Mice: the Role of Neurotrophic Factors. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9912-4>

SCHAPIRA, A. H.V. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 1261–1266, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402160>

SCHAPIRA, Anthony H V. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 41–47, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.10.005>

SCHNEIDER MEDEIROS, Márcio *et al.* Occupational pesticide exposure and the risk of death in patients with Parkinson's disease: An observational study in southern Brazil. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12940-020-00624-8>

SCHRAG, Anette; TADDEI, Raquel N. Depression and Anxiety in Parkinson's Disease. *In*: INTERNATIONAL REVIEW OF NEUROBIOLOGY. [S. l.: s. n.], 2017. v. 133, p. 623–655. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2017.05.024>

SCHULTZ, Wolfram. Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 1–27, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.1.1>

SCHULZ, Kenneth F. *et al.* Empirical Evidence of Bias: Dimensions of Methodological Quality Associated With Estimates of Treatment Effects in Controlled Trials. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 273, n. 5, p. 408–412, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.273.5.408>

SCHWARZBOLD, Marcelo L. *et al.* Effects of Traumatic Brain Injury of Different Severities on Emotional, Cognitive, and Oxidative Stress-Related Parameters in Mice. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1318>

SCOTT, B. *et al.* Gender differences in Parkinson's disease symptom profile. **Acta Neurologica Scandinavica**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 37–43, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2000.102001037.x>

SHIMIZU, K *et al.* Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain research**, Netherlands, v. 906, n. 1–2, p. 135–142, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02577-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02577-x)

SHIOTSUKI, Hiromi *et al.* A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 189, n. 2, p. 180–185, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>

SINITOX. **Evolução dos Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico**. [S. l.], 2015. Disponível em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil10.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2018.

SMITH, Timothy D.; BHATNAGAR, Kunwar P. Anatomy of the olfactory system. *In: HANDBOOK OF CLINICAL NEUROLOGY*. [S. l.: s. n.], 2019. v. 164, p. 17–28. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00002-2>

SOLDNER, Frank *et al.* Parkinson-associated risk variant in enhancer element produces subtle effect on target gene expression HHS Public Access. **Nature**, [s. l.], v. 533, n. 7601, p. 95–99, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature17939>

SOUZA, Marina F. *et al.* Deltamethrin Intranasal administration induces memory, emotional and tyrosine hydroxylase immunoreactivity alterations in rats. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 142, n. February, p. 297–303, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.08.007>

SPILLANTINI, Maria Grazia *et al.* alpha-Synuclein in Lewy bodies. **Nature**, [s. l.], v. 388, n. 6645, p. 839–840, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/42166>

STERU, Lucien *et al.* The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, [s. l.], 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00428203>

SUBRAMANIAM, Sudhakar R.; FEDEROFF, Howard J. Targeting microglial activation states as a Therapeutic Avenue in Parkinson's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. JUN, p. 1–18, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00176>

SZCZYPIŃSKI, Jan Józef; GOLA, Mateusz. Dopamine dysregulation hypothesis: the common basis for motivational anhedonia in major depressive disorder and schizophrenia? **Reviews in the Neurosciences**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. 727–744, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0091>

TADAIESKY, M. T. *et al.* Effects of SR141716A on Cognitive and Depression-Related Behavior in an Animal Model of Premotor Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, [s. l.], v. 2010, p. 1–6, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4061/2010/238491>

TANDBERG, E. *et al.* Risk Factors for Depression in Parkinson Disease. **Archives of Neurology**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 625–630, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archneur.1997.00550170097020>

TANG, Juanjuan *et al.* Crocin Reverses Depression-Like Behavior in Parkinson Disease Mice via VTA-mPFC Pathway. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 3158–3170, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01941-2>

TAYLOR, T. N. *et al.* Nonmotor Symptoms of Parkinson's Disease Revealed in an Animal Model with Reduced Monoamine Storage Capacity. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 25, p. 8103–8113, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1495-09.2009>

TEIVE, HÉLIO A.G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 141–145, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-282X1998000100026>

THIRUCHELVAM, M. *et al.* Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: Environmental risk factors for Parkinson's disease? **Brain Research**, [s. l.], v. 873, n. 2, p. 225–234, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02496-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02496-3)

TINKLER, J; GOTT, D; BOOTMAN, J. Risk Assessment of Dithiocarbamate Accelerator Residues in Latex-based Medical Devices: Genotoxicity Considerations. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 36, n. 9–10, p. 849–866, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(98\)00037-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(98)00037-4)

TOYODA, Hiroki *et al.* Intranasal Administration of Rotenone Reduces GABAergic Inhibition in the Mouse Insular Cortex Leading to Impairment of LTD and Conditioned Taste Aversion Memory. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 259, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22010259>

TRETIAKOFF, Konstantin. **Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson**. [S. l.]: Jouve, 1919. *E-book*.

TWELVES, Dominique; PERKINS, Kate S.M.; COUNSELL, Carl. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 19–31, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.10305>

UNZETA, M. *et al.* Sex-related effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment may be related to differences in monoamine oxidase B. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 176, n. 2, p. 235–238, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90090-6)

UVERSKY, Vladimir N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: Understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 318, n. 1, p. 225–241, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0937-z>

VAN DEN EEDEN, S. K. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. **American Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 157, n. >11, p. 1015–1022, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aje/kwg068>

VASCONCELLOS, Paula Renata Olegini *et al.* Condições da exposição a agrotóxicos de portadores da doença de Parkinson acompanhados no ambulatório de neurologia de um hospital universitário e a percepção da relação da exposição com o adoecimento. **Saúde em Debate**, [s. l.], v. 43, n. 123, p. 1084–1094, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-1104201912308>

VORONKOV, D. N. *et al.* Immunomorphological Changes in the Olfactory Bulbs of Rats after Intranasal Administration of Rotenone. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 164, n. 2, p. 203–206, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3958-9>

WANG, Yitian *et al.* Ecotoxicity assessment of sodium dimethyldithiocarbamate and its micro-sized metal chelates in *Caenorhabditis elegans*. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 720, p. 137666, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137666>

WHO. **Life expectancy and Healthy life expectancy**. [S. l.], 2018a. Disponível em: <https://apps.who.int/gho/data/view.main.SDG2016LEXREGv?lang=en>. Acesso em: 5 maio 2020.

WHO. **Poisoning Prevention and Management**. [S. l.], 2018b. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/poisons/en/>. Acesso em: 10 jun. 2018.

WILLNER, Paul. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000087097>

WISE, Roy A. Neuroleptics and operant behavior: The anhedonia hypothesis. **Behavioral and Brain Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 39–53, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0140525X00010372>

YAN, Dandan *et al.* Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: Dose-response meta-analysis of observational studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 96, p. 57–63, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.05.005>

YANKELEVITCH-YAHAV, Roni *et al.* The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 97, p. 1–7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/52587>

ZHANG, Jing *et al.* Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: A link through mitochondrial dysfunction. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 336–346, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01525.x>

ZHU, Boheng *et al.* Demoralization and Quality of Life of Patients with Parkinson Disease. **Psychotherapy and psychosomatics**, [s. l.], p. 1–7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000514270>