

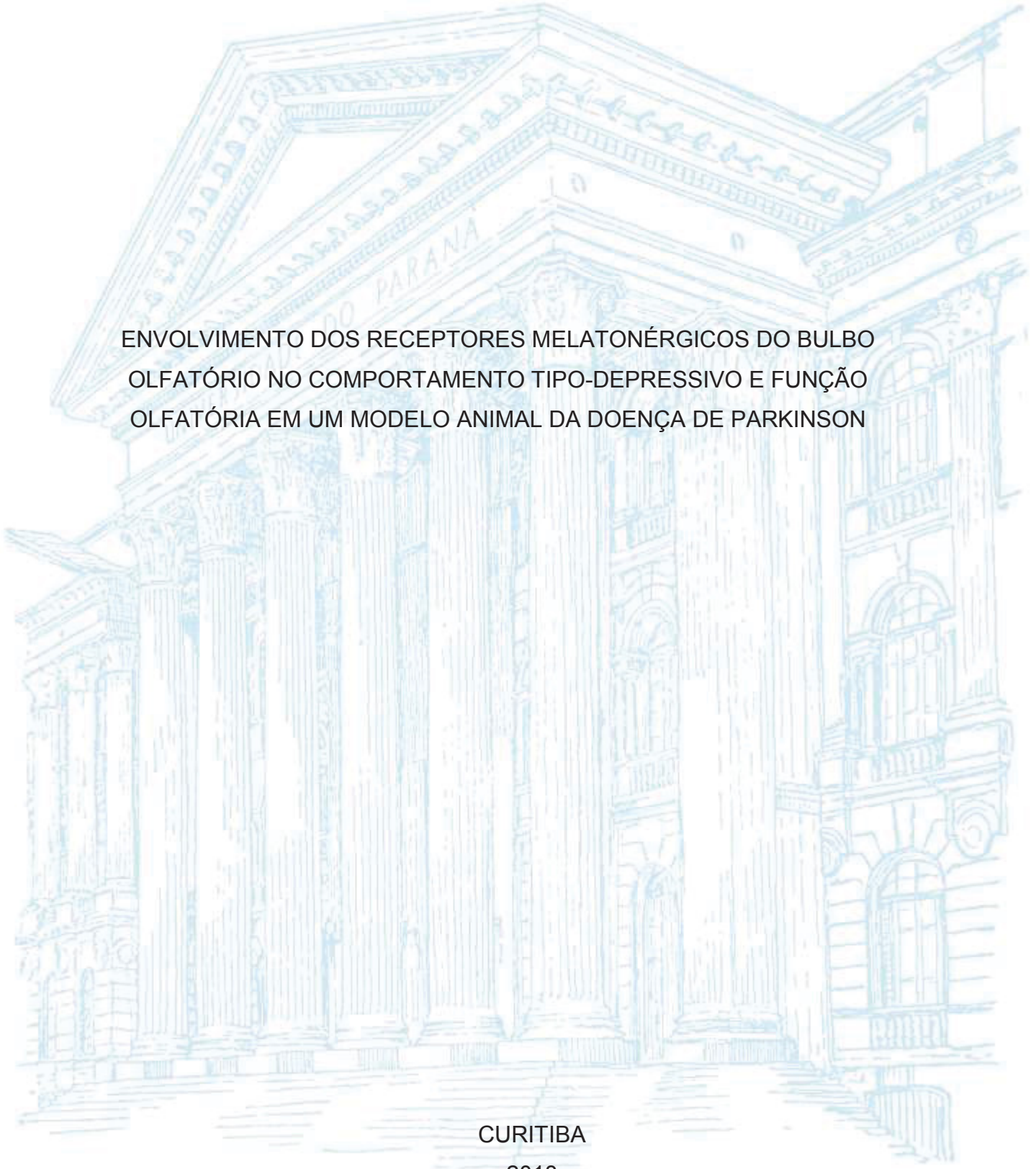
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA DUARTE NOSEDA

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES MELATONÉRGICOS DO BULBO
OLFATÓRIO NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E FUNÇÃO
OLFATÓRIA EM UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON

CURITIBA

2018



ANA CAROLINA DUARTE NOSEDA

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES MELATONÉRGICOS DO BULBO
OLFATÓRIO NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E FUNÇÃO
OLFATÓRIA EM UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON

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

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

CURITIBA
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940).

Nosedá, Ana Carolina Duarte.

Envolvimento dos receptores melatonérgicos do bulbo olfatório no comportamento tipo-depressivo e função olfatória em um modelo animal da doença de Parkinson. / Ana Carolina Duarte Nosedá. – Curitiba, 2018.
107 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Marcelo de Meira Santos Lima.

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

1. Parkinson, Doença de. 2. Antidepressivos. I. Título. II. Lima, Marcelo de Meira Santos. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.833



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


TERMO DE APROVAÇÃO

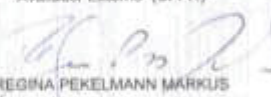
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA CAROLINA DUARTE NOSEDA** intitulada: **ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES MELATONÉRGICOS DO BULBO OLFATÓRIO NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E FUNÇÃO OLFATÓRIA EM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.


A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Novembro de 2018.


MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHÖFER
Avaliador Externo (UFPR)


REGINA PEKELMANN MARKUS
Avaliador Externo (USP)


JANAINA MENEZES ZANOVELI
Avaliador Interno (UFPR)



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


ATA Nº


ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA


No dia vinte e dois de novembro de dois mil e dezoito às 13:30 horas, na sala Auditório do Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, foram instalados os trabalhos de arguição da doutoranda **ANA CAROLINA DUARTE NOSEDA** para a Defesa Pública de sua tese intitulada **ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES MELATONÉRGICOS DO BULBO OLFATÓRIO NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E FUNÇÃO OLFATÓRIA EM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA (UFPR), SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER (UFPR), REGINA PEKELMANN MARKUS (USP), JANAÍNA MENEZES ZANOVELI (UFPR). Dando início a sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca Examinadora, então, reuniu-se e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela aprovação da aluna. A doutoranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 22 de Novembro de 2018.


MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER
Avaliador Externo (UFPR)


REGINA PEKELMANN MARKUS
Avaliador Externo (USP)


JANAÍNA MENEZES ZANOVELI
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Eugênia e Miguel, e ao meu irmão Fernando sem vocês nada disso seria possível.

A toda a minha família pelo carinho e incentivo.

Ao professor Marcelo pela preciosa orientação e pelas palavras sempre positivas.

Aos membros da banca pela leitura, sugestões e contribuições.

A todos os colegas do laboratório de Neurofisiologia.

A professora Regina Markus pelo gentil empréstimo do luzindole.

A professora Luana Fisher pela ajuda financeira na compra do IIK7

Ao Dr. Ralf Jockers pela confiança de por ter aberto as porta do seu laboratório no Instituto Cochin, e pela orientação durante todo o período de estágio sanduíche.

A Erika Cecon pela co-orientação durante o estágio sanduíche no Instituto Cochin.

A todos os alunos e pesquisadores do laboratório do Dr. Ralf Jockers, no Departamento de Endocrinologia, Metabolismo e Diabetes do Instituto Cochin em Paris.

A todos os professores e técnicos do programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Aos professores e técnicos do Programa de Pós Graduação em Fisiologia.

A Universidade Federal do Paraná

Ao apoio financeiro pela CAPES.

A todos os animais utilizados nesse estudo.

RESUMO

A associação entre lesões no bulbo olfatório (BO) com a presença de distúrbios olfatórios e depressivos é observada na doença de Parkinson (DP). No contexto da DP, é relatado o efeito antidepressivo da melatonina e de seus análogos, além disso, sugere-se o envolvimento do sistema melatonérgico na depressão associada à DP. Entretanto, até o presente momento não existem relatos do envolvimento dos receptores melatonérgicos expressos no BO com a depressão e prejuízo olfatório na DP. O objetivo do presente trabalho foi investigar através da modulação farmacológica (agonistas e antagonista melatonérgicos) o envolvimento dos receptores de melatonina expressos no BO no comportamento tipo-depressivo e na discriminação olfatória. Esse contexto foi avaliado em um modelo de DP induzido pela 6-OHDA intranigral em ratos, aos 7 e 14 dias após a lesão com a neurotoxina. As administrações, na camada glomerular do BO (glBO), de melatonina (agonista MT₁ e MT₂, 1 µg/µl), luzindole (antagonista não seletivo, 5 µg/µl) e 4-P-DOT (agonista parcial MT₂, 5 µg/µl) reverteram o efeito tipo-depressivo induzido pela 6-OHDA aos 7 e dias. Porém, aos 14 dias apenas a melatonina e o 4-P-DOT apresentaram efeito tipo-antidepressivo. O agonista MT₂ seletivo IIK7(10 µg/µl) apresentou efeito tipo-depressivo nos animais sham, e não alterou o efeito induzido pela 6-OHDA. A administração sequencial de luzindole+melatonina (5 µg/µl; 1µg/µl) aos 7 dias reverteu o efeito tipo-depressivo da 6-OHDA, mas aos 14 dias esse efeito foi perdido. Os efeitos tipo-antidepressivos da administração sequencial de 4-P-PDOT+melatonina (5 µg/µl; 1µg/µl) foram observados aos 7 e 14 dias após a lesão. Na avaliação da discriminação olfatória, as modulações dos receptores do BO, pela melatonina, IIK7, 4-P-DOT e 4-P-PDOT+melatonina, reverteram o prejuízo olfatório induzido pela 6-OHDA. Aos 14 dias foi observado o retorno da função olfatória dos animais lesionados, porém as infusões de luzindole ou luzindole+melatonina prejudicaram a olfação desse grupo 6-OHDA. Na quantificação de RNAm para MT₁, houve aumento na expressão aos 14 dias em relação a 7 dias nos animais 6-OHDA, enquanto que no grupo 6-OHDA 4-P-PDOT aos 7 dias ocorreu a redução da expressão de RNAm para MT₁ em relação ao respectivo grupo sham. A presença de receptores melatonérgicos foi confirmada pelo ensaio de [³⁵S]GTPγS, evidenciando que a ativação de receptores melatonérgicos expressos no BO atua por proteínas G_i. A imunofluorescência confirmou esses dados, demonstrando a presença de receptores MT₁ e MT₂ na camada glBO. Desta forma, esses resultados demonstram que os receptores de melatonina da camada glBO apresentam envolvimento no comportamento tipo-depressivo e na função olfatória em um modelo de DP induzido pela 6-OHDA.

Palavras-chave: Melatonina; bulbo olfatório; doença de Parkinson; depressão; distúrbios olfatórios.

ABSTRACT

The linkage between lesions in the olfactory bulb (OB) with the presence of olfactory and depressive disorders is observed in Parkinson's disease (PD). In the context of PD, the antidepressant effect of melatonin and its analogs are reported; in addition, it is suggested the involvement of the melatonergic system in depression associated with PD. However, to date there are no reports of the involvement of melatonergic receptors expressed in the OB with depression and olfactory impairment in PD. The aim of the present study was to investigate the involvement of melatonin receptors expressed in the OB in the depressive behavior and olfactory discrimination through pharmacological modulation (melatonergic agonists and antagonists). This context was evaluated in an intranigral 6-OHDA-induced PD model in rats, at 7 and 14 days post-neurotoxin injury. The infusion within the glomerular layer of OB (gLOB), melatonin (MT_1 and MT_2 agonist, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), luzindole (non-selective antagonist, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and 4-P-DOT (MT_2 partial agonist, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) reversed the depressive-like behavior elicited by 6-OHDA, at 7 days post-lesion. However, 14 days after the lesion only melatonin and 4-P-DOT induced antidepressant-like effects. The selective MT_2 agonist IJK7 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) had a depressive-like effect in sham group, while in 6-OHDA animals the drug did not change the behavior. The sequential administration of luzindole+melatonin (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) reversed the depressive-like effect of 6-OHDA at 7 days post-lesion, but at 14 days this effect was gone. The sequential administration of 4-P-DOT+melatonin (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) elicited antidepressant-like effects, observed at 7 and 14 days post 6-OHDA-injury. In the evaluation of olfactory discrimination, the modulation of melatonergic OB receptors by melatonin, IJK7, 4-P-DOT and 4-P-DOT+melatonin reversed the olfactory impairment induced by 6-OHDA. At 14 days post-lesion, 6-OHDA animals did not present detectable olfactory impairments, but the infusions of luzindole or luzindole+melatonin impaired the olfaction of this 6-OHDA group. Regarding the quantification of mRNA for MT_1 receptors, there was an increase in expression at 14 days in relation to 7 days in 6-OHDA animals. In the 6-OHDA 4-P-DOT group, at 7 days, the mRNA expression was reduced for MT_1 compared to its respective sham group. The presence of melatonergic receptors was confirmed by the [^{35}S]GTP γ S assay, evidencing that the activation of melatonergic receptors expressed in OB acts by G_i proteins. Immunofluorescence confirmed these data, demonstrating the presence of MT_1 and MT_2 receptors in the gLOB. Thus, our results demonstrated that melatonin receptors of the gLOB are involved in the depressive-like behavior and in the olfactory function in a PD model induced by 6-OHDA.

Key-words: Melatonin; olfactory bulb; Parkinson's disease; depression; olfactory disturbances.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP	Doença de Parkinson
BO	Bulbo olfatório
SNpc	Substância negra parte compacta
6-OHDA	6-hidroxidopamina
TH	Tirosina hidroxilase
TH-ir	Tirosina hidroxilase imunoreativo
NSQ	Núcleo supraquiasmático
RNA _m	RNA mensageira
NAT	N-acetil-transferase
HIOMT	Hidroxi-indole-O-metil-transferase
ASMT	N-acetilserotonina-O-metiltransferase
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
MT ₁	Receptor melatonérgico
MT ₂	Receptor melatonérgico
<i>MTNR1A</i>	Gene do receptor MT ₁
<i>MTNR1B</i>	Gene do receptor MT ₂
COX	Ciclo-oxigenase
iNos	Óxido nítrico-sintase induzida
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
DAT	Transportador de dopamina
NET	Transportador de noradrenlina
Sono REM	Sono de movimentos oculares rápidos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
1.1.	Fisiopatologia da doença de Parkinson	10
1.2.	Distúrbios motores da doença de Parkinson.....	12
1.3.	Distúrbios não motores da doença de Parkinson.....	13
2.	DISTÚRBIOS OLFATÓRIOS NA DOENÇA DE PARKINSON.....	14
3.	DEPRESSÃO NA DOENÇA DE PARKINSON	18
4.	Modelo animal de DP induzido pela 6-OHDA.....	20
5.	MELATONINA	23
5.1.	Síntese da melatonina	24
5.2.	Receptores melatonérgicos	26
6.	EFEITOS TERAPÊUTICOS DA MELATONINA	29
6.1.	Melatonina na doença de Parkinson	29
6.2.	MELATONINA NA DEPRESSÃO	31
6.2.	MELATONINA E SEUS RECEPTORES NA OLFAÇÃO	32
7.	JUSTIFICATIVA.....	32
8.	OBJETIVOS.....	33
9.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
10.	RESULTADOS	48
11.	DISCUSSÃO.....	74
12.	CONCLUSÕES.....	89
13.	REFERÊNCIAS	90
14.	ANEXO	107

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa crônica e progressiva mais prevalente entre a população idosa (>65 anos), e é conhecida pelas alterações motoras que os pacientes apresentam. Entre os fatores de risco para a DP a idade possui um papel fundamental (Phillipson, 2014). Considerando as projeções de envelhecimento da população mundial estima-se que em 2030 haja quase nove milhões de casos da DP (Dorsey et al., 2007). A prevalência (número atual de pacientes) da DP no Brasil é de 3,3% em pacientes acima de 65 anos, sendo semelhante a valores reportados em outras populações (Barbosa et al., 2006).

Com o crescente envelhecimento da população, número de pacientes com a DP também só tende a aumentar, assim, é de se esperar que os gastos (públicos e privados) com os serviços de saúde cresçam ao longo dos anos. De fato, entre 12 grupos de doenças neurológicas mais prevalentes, a DP é a quarta maior geradora de gastos por indivíduo na Europa (Gustavsson et al., 2011). No Brasil, Bovolenta e colaboradores (2017) reportaram haver um custo anual de R\$18.141,64, por paciente, sendo destes 53,4% custos diretos, serviços médicos e não médicos (adaptações para a casa, equipamentos para facilitar a locomoção, como andadores e cadeira de rodas) e 46,6% custos indiretos (aposentadoria).

1.1. Fisiopatologia da doença de Parkinson

A DP é caracterizada por uma degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc), evidenciada macroscopicamente por uma despigmentação na porção ventrolateral desta estrutura (Lang & Loranço, 1998). As características fisiopatológicas são referentes à redução da aferência dopaminérgica para o estriado dorsal (caudado/putâmen) levando a uma redução na neurotransmissão dopaminérgica, caracterizada por uma menor capacidade de liberação de dopamina (DA), bem como redução dos níveis estriatais de seus principais metabólitos como o ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético

(DOPAC) (Bartels & Leenders, 2009; Bonnet & Houeto, 1999). Outra característica fisiopatológica importante é a presença de inclusões intracitoplasmáticas neuronais de caráter eosinofílico, organizadas em um núcleo denso de hialina e circundadas por um halo claro, medindo aproximadamente 15 μm de diâmetro denominadas corpúsculos de Lewy. Essas inclusões são constituídas por vários agregados proteicos contendo α -sinucleína, ubiquitina, parkina e neurofilamentos (Bartels & Leenders, 2009). Entretanto, o acúmulo de α -sinucleína e a formação dos corpúsculos de Lewy não são achados exclusivos da DP, sendo encontrados em outras doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. O mecanismo de formação dos corpúsculos de Lewy, a importância na patogênese da DP e a função no processo neurodegenerativo ainda não são completamente conhecidos. Entretanto a presença de corpúsculos de Lewy na SNpc é utilizado como um marcador fisiopatológico no diagnóstico *post mortem* da DP, juntamente com a neurodegeneração nigroestriatal (S. Sharma et al., 2013).

A presença de agregados de α -sinucleína no encéfalo de pacientes com DP não é exclusiva na SNpc, assim como não é constante durante a evolução da doença. Com base na distribuição de α -sinucleína (corpúsculos de Lewy), foi proposto por Braak e colaboradores (2003), Figura 1, o estagiamento topográfico e cronológico da DP (estágios 1-6). De acordo com os autores, a deposição desses agregados proteicos tem início na medula oblongata e no BO (estágio 1). Nesse estágio inicial os pacientes apresentam distúrbios olfatórios e gastrintestinais. No estágio 2 da DP, a presença de α -sinucleína no *locus coeruleus*, núcleo da rafe e na formação reticular está relacionada com o aparecimento de depressão e distúrbios de sono nos indivíduos. Com a evolução da DP, no estágio 3, os agregados proteicos são encontrados na SNpc, amígdala e núcleo pedunculopontino. Nesse estágio os pacientes começam a apresentar os distúrbios motores clássicos, tremor em repouso, bradicinesia e rigidez muscular. No estágio 4, a presença de agregados de α -sinucleína no núcleo talâmico contribui para o declínio cognitivo e emocional dos pacientes. Nos dois últimos estágios da doença, 5 e 6, áreas corticais já estão afetadas pela presença de α -sinucleína.

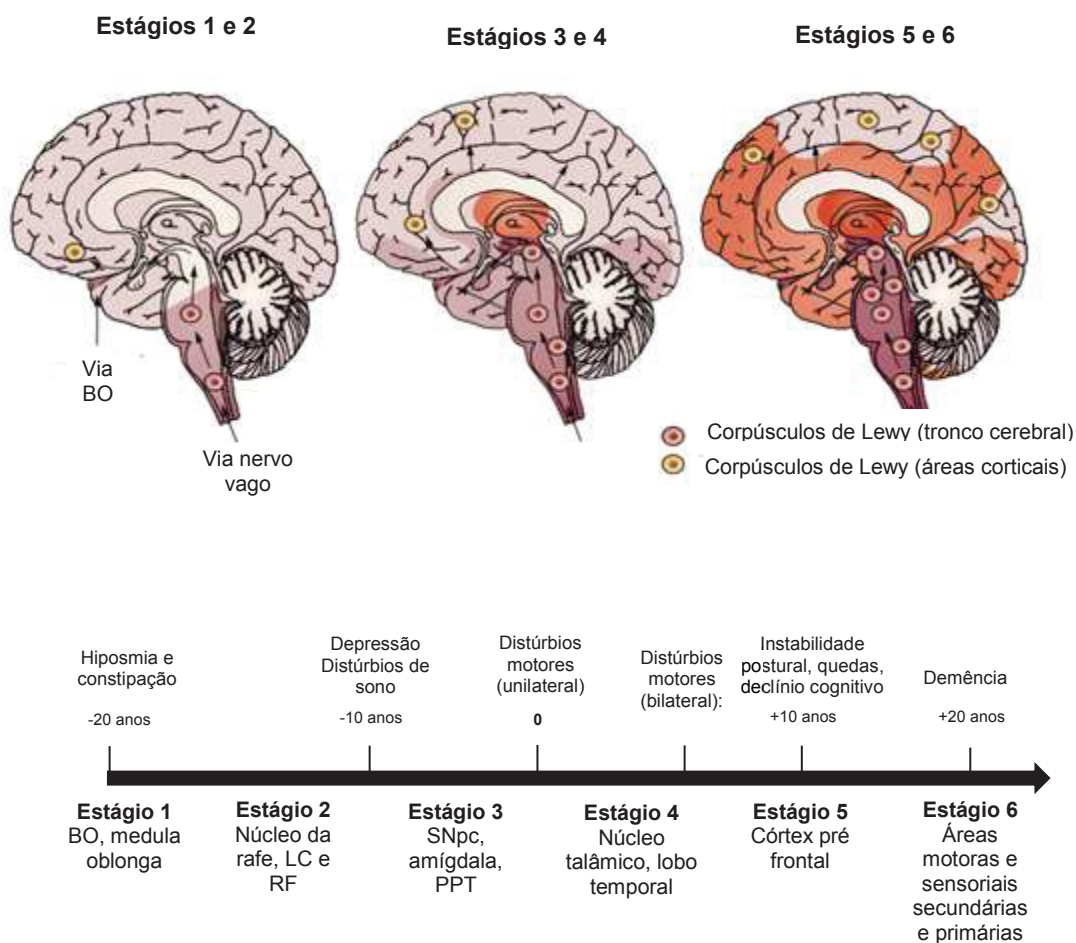


Figura 1. Sistema de estadiamento de Braak para a DP. No esquema está demonstrada a distribuição topográfica de corpúsculos de Lewy no encéfalo de acordo com a fase da DP e os distúrbios pré-motores e motores presentes. A deposição de agregados de α -sinucleína iniciaria no BO e na medula oblongata (estágios 1 e 2), com posterior infiltração no mesencéfalo (Estágios 3 e 4) com o aparecimento dos distúrbios motores e de sono, e nos estágios finais da doença (Estágios 5 e 6) os agregados proteicos estão localizados em estruturas corticais, e ocorre a presença de distúrbios cognitivos nos pacientes. LC: *locus coeruleus*, RF: formação reticular, PPT: núcleo pedúnculo pontinho tegmental. O sombreado em vermelho da imagem representa o padrão topográfico da doença.

1.2. Distúrbios motores da doença de Parkinson

A DP é caracterizada pela presença de três sinais motores, conhecidos como cardinais da doença, sendo eles: rigidez muscular; tremor em repouso; e bradicinesia (Bartels & Leenders, 2009). A rigidez é o sinal dominante na maioria dos pacientes, e caracteriza-se como o mais incapacitante. Em 70% dos pacientes o primeiro sinal da doença é o tremor em repouso, e se refere ao aumento da resistência a movimentos passivos dos membros, ocorrendo no repouso e diminui com os movimentos voluntários (Samii, Nutt, & Ransom,

2004). E a bradicinesia, por sua vez, apresenta-se como uma redução ou lentificação dos movimentos, portanto o paciente leva mais tempo para realizar as tarefas diárias, como para se alimentar e se vestir (Mazzoni, Shabbott, & Cortés, 2012). O paciente com DP também pode apresentar outras alterações motoras como anormalidades posturais e de marcha, podendo levar a quedas, e o congelamento na marcha, (*freezing of gait*), que se caracteriza pela inabilidade do paciente em iniciar um movimento voluntário, como caminhar (Georgy, 2010).

O diagnóstico clínico baseia-se na presença de pelo menos duas das alterações motoras. Porém, quando a DP é diagnosticada, ou seja, com o surgimento dos primeiros achados clínicos motores, os indivíduos apresentam a redução da ordem de 60-70% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (Fearnley & Lees, 1991).

1.3. Distúrbios não motores da doença de Parkinson

A DP é conhecida principalmente pelos distúrbios motores, contudo 90% dos pacientes com DP vão apresentar, em algum estágio da doença, distúrbios não motores, sendo eles, principalmente: alterações neuropsiquiátricas (depressão, ansiedade, apatia); distúrbios olfatórios; distúrbios do sono (insônia, síndrome das pernas inquietas; distúrbios comportamentais do sono de movimentos oculares rápidos (REM); sonolência diurna excessiva; e distúrbios gastrointestinais (Chaudhuri, Odin, Antonini, & Martinez-Martin, 2011; Lima, 2013). Esses distúrbios podem surgir anos antes das manifestações clínicas da DP, podendo ser considerados distúrbios pré-motores ou pródromos, portanto, sendo de grande valor preditivo (Braak et al., 2003; Hawkes, Del Tredici, & Braak, 2010; Kalia & Lang, 2015). Pacientes com DP que desenvolvem alterações não motoras apresentam grande redução na qualidade de vida, o que demonstra a importância do diagnóstico preciso e rápido destes distúrbios, além do tratamento adequado. Entretanto, na maioria dos casos os distúrbios não motores não são diagnosticados, e, conseqüentemente não tratados (Shulman, Taback, Rabinstein, & Weiner,

2002). A relação entre depressão e os distúrbios olfatórios associados à DP serão descritos nos tópicos seguintes.

2. DISTÚRBIOS OLFATÓRIOS NA DOENÇA DE PARKINSON

A percepção do odor se inicia quando moléculas voláteis são detectadas pelos receptores sensoriais olfatórios, localizados em neurônios receptores olfatórios na membrana do epitélio olfatório. A ativação dos receptores sensoriais olfatórios é dependente da proteína G, e caracterizam a maior família de receptores acoplados à proteína G, abrangendo 636 genes para os receptores olfatórios humanos (Malnic, Godfrey, & Buck, 2004). Os neurônios receptores olfatórios projetam seus axônios por meio do nervo olfatório, através da placa crivóide, que divergem ao entrar no BO para formar as sinapses glomerulares (camada glomerular). Nesses glomérulos, os neurônios receptores olfatórios fazem sinapse com células mitrais e células tufoas sendo então modulados pelos interneurônios periglomerulares (dopaminérgicos e GABAérgicos). Os axônios das células mitrais/tufoas se projetam para o córtex olfatório primário através do trato olfatório lateral, assim, as células mitrais/tufoas são as responsáveis por levar a informação olfatória para áreas corticais onde cada odor específico é, de fato, identificado (Figura 2) (Doty, 2012).

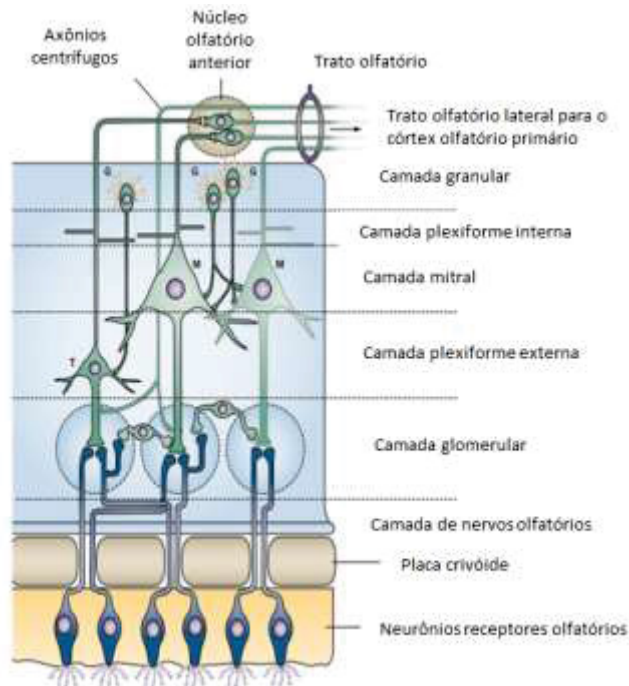


Figura 2. Neuroanatomia esquemática das principais camadas do BO e as interações entre diferentes de células bulbares. O BO está localizado acima da placa crivóide, e na camada glomerular recebe os axônios dos neurônios receptores olfatórios, que fazem sinapse com os dendritos das células tufoosas (T) e mitrais (M). G – célula granular. Imagem retirada de Doty, 2012.

O córtex olfatório primário (Figura 3A) é composto pelo córtex piriforme, córtex entorrinal lateral, tubérculo olfatório e o núcleo cortical da amígdala. O córtex piriforme envia projeções para o tálamo, hipotálamo e córtex orbitofrontal, enquanto que o córtex entorrinal envia fibras para o hipocampo.

O BO recebe projeções de diferentes estruturas encefálicas (Figura 3B), como fibras serotoninérgicas, do núcleo medial da rafe, que se encontra em todas as camadas do BO, noradrérgicas provenientes do *locus coeruleus* que se projetam para a camada granular, e projeções colinérgicas da banda diagonal de Broca e que inervam as camadas plexiforme interna e granular (Mundiñano et al., 2013).

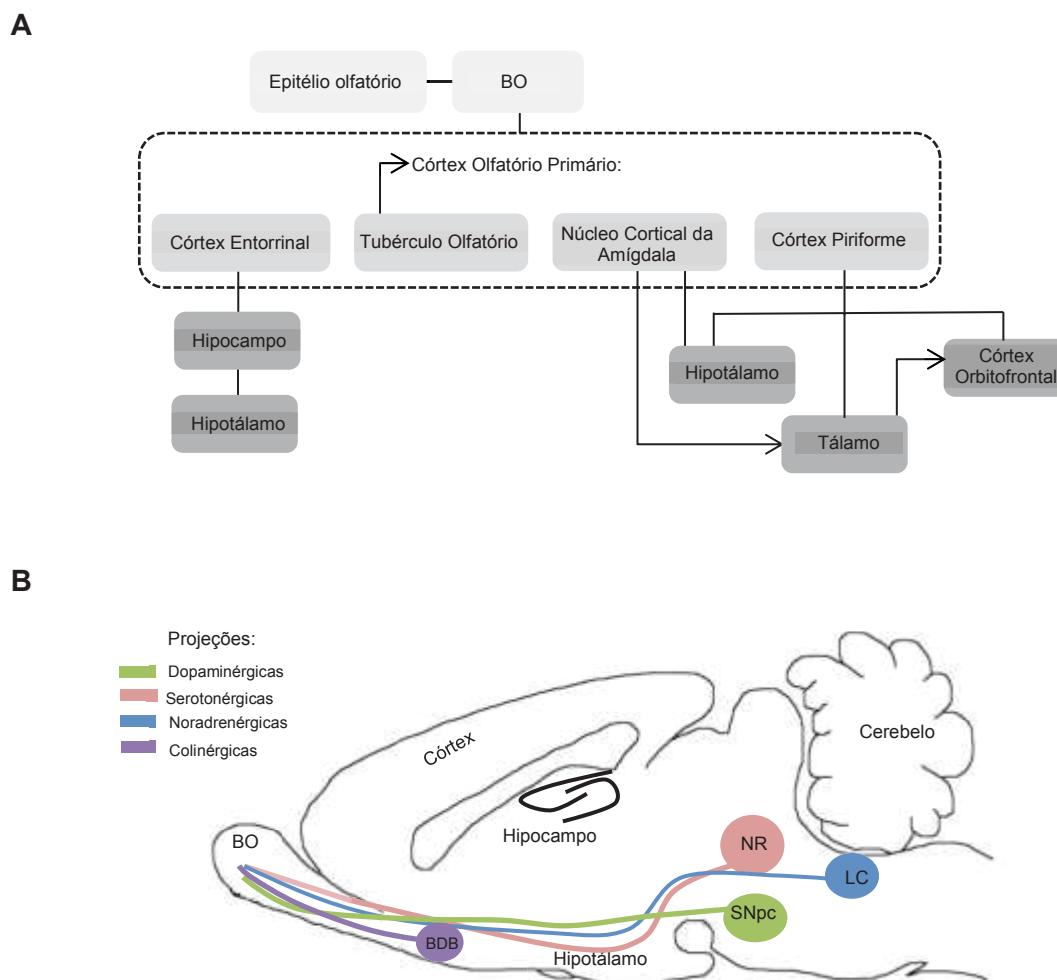


Figura 3. Representação esquemática das principais (A) projeções do sistema olfatório e (B) vias de neurotransmissores que se projetam para o BO. BDB: Banda diagonal de Broca, NR: núcleo da rafe, LC: *locus coeruleus*, SNpc: substância negra parte compacta, BO: bulbo olfatório. Na imagem (A) o hipocampo está representado duas vezes apenas para fins didáticos.

A associação entre a DP e disfunções olfatórias foi descrita inicialmente por Ansari e Johnson (1975) após a observação que indivíduos Parkinsonianos exibiam menor acuidade olfativa e maior limiar na identificação do odor testado, caracterizando hiposmia (diminuição do sentido do olfato). Esses relatos permitiram o início de investigações sobre o envolvimento dos distúrbios olfatórios na DP. Atualmente, se tem conhecimento que as alterações olfatórias estão presentes em até 90% dos casos da DP, sendo mais prevalente em homens do que em mulheres (Doty, Deems, & Stellar, 1988). Os pacientes podem apresentar redução na detecção (limiar ou percepção de odores em

baixas concentrações), identificação (habilidade de nomear o odor) e na discriminação de odores (distinção de diferentes odores).

Estudos têm demonstrado que na DP essas disfunções olfatórias normalmente ocorrem de 4 a 8 anos antes do diagnóstico, apesar de já terem sido relatados casos ocorrendo até 20 anos antes do aparecimento dos distúrbios motores (Doty et al., 1988; Hawkes et al., 2010).

Apesar dos distúrbios olfatórios ainda não serem tão reconhecidos quanto os distúrbios motores, a perda ou redução da função olfatória está associada à redução na qualidade de vida de pacientes com DP. O sistema olfatório apresenta uma importante função na palatibilidade e no sabor de alimentos e bebidas, mas a olfação também está relacionada com o aviso de sinais perigosos a saúde do indivíduo, como situações de perigo pela presença de fogo ou vapores tóxicos, e na avaliação de alimentos não viáveis para o consumo humano (Deems et al., 1991). Estudos têm demonstrado que pacientes com a função olfatória reduzida apresentam redução do peso corporal e de apetite, bem como mais chances de serem diagnosticados com depressão (Deems et al., 1991). Na depressão é relatada a redução no volume do BO de pacientes depressivos (Negoias et al., 2010; Rottstädt et al., 2018), enquanto que modelos animais de depressão exibem diminuição de neurônios receptores olfatórios e atrofia do epitélio olfatório (Q. Li et al., 2015; Raynaud, Meunier, Acquistapace, & Bombail, 2015). Além desses achados estruturais, indivíduos com depressão apresentam diminuição na discriminação (Croy & Hummel, 2017), detecção (Negoias et al., 2010), e percepção hedônica de odores (D. Chen & Dalton, 2005).

A associação inversa também é observada, ou seja, pacientes com distúrbios olfatórios crônicos manifestam distúrbios depressivos (Amritwar et al., 2017; Deems et al., 1991). Indivíduos com rinite alérgica e não-alérgica, anosmia congênita ou hiposmia relacionada a outras causas, apresentam maior prevalência de depressão em relação a pacientes com a função olfatória normal (Bedolla-Barajas, Morales-Romero, Pulido-Guillén, Robles-Figueroa, & Plascencia-Domínguez, 2017; Croy, Negoias, Novakova, Landis, & Hummel, 2012; Deems et al., 1991). Apesar de ainda não está bem estabelecida se a

hiposmia é a causa ou consequência da depressão, a literatura mostra que a qualidade de vida desses pacientes é fortemente prejudicada (Croy, Bojanowski, & Hummel, 2013; Croy, Nordin, & Hummel, 2014; Rochet, El-Hage, Richa, Kazour, & Atanasova, 2018; Schablitzky & Pause, 2014).

Semelhante à depressão, na DP a hiposmia está associada a outros distúrbios não motores como o distúrbio comportamental do sono REM, ansiedade, constipação, apatia e depressão (Cramer, Friedman, & Amick, 2010; Doty, 2012). Assim como observado em pacientes depressivos, a redução no volume do BO é relatada em pacientes com DP (S. Chen et al., 2014; J. Li et al., 2016). Desse modo, o BO está fortemente associado aos distúrbios olfatórios e depressivos.

3. DEPRESSÃO NA DOENÇA DE PARKINSON

Outra importante comorbidade na DP é a depressão, que se manifesta como perda de prazer (anedonia), sentimentos de culpa e inutilidade, pensamentos suicidas, assim como alterações no apetite, sono, psicomotoras e na expressão facial (Aarsland, Pålhlagen, Ballard, Ehrt, & Svenningsson, 2012). Além de ser o distúrbio neuropsiquiátrico mais frequente na DP, a depressão também está relacionada com a piora da qualidade de vida dos pacientes. A presença da depressão é descrita como o distúrbio mais debilitante que as próprias alterações motoras clássicas da DP (Jasinska-Myga, Putzke, Wider, Wszolek, & Uitti, 2010; Müller, Assmus, Herlofson, Larsen, & Tysnes, 2013). Adicionalmente, pacientes com DP podem apresentar um rápido declínio tanto nos distúrbios motores quanto nas habilidades cognitivas quando a depressão está presente (Ravina et al., 2007). Estudos sugerem que a depressão afeta até 45% dos indivíduos com DP, porém a prevalência pode ser maior, visto que a depressão na DP muitas vezes é subdiagnosticada (Rodríguez-Violante, Zerón-Martínez, Cervantes-Arriaga, & Corona, 2017). A depressão e a DP apresentam características clínicas semelhantes, como redução da expressão facial, perda de apetite, atraso psicomotor, fadiga e alterações do sono (Leentjens, 2004). Essas alterações também se encontram presentes em pacientes com DP sem depressão, assim

esses fatores dificultam o diagnóstico da depressão em pacientes idosos com DP, resultando em indivíduos não diagnosticados e, conseqüentemente, não tratados (Leentjens, 2004).

Os níveis de severidade associados à depressão variam na literatura, em geral descreve-se depressão leve em 82% dos pacientes, e depressão moderada e severa em 8,7% e 60%, respectivamente (Prado & Barbosa, 2005; Quelhas & Costa, 2009). A associação entre a severidade da depressão e o aumento da incapacidade de realizar atividades diárias foi observada em pacientes com DP (Stella, Banzato, Barasnevicus Quagliato, & Viana, 2008).

Hipóteses relacionam o aparecimento da depressão na DP como um fator secundário (reativo), gerado pelo estresse psicossocial que os distúrbios motores geram no paciente (McDonald, Richard, & DeLong, 2003). Contudo, o aparecimento da depressão antes do início das alterações motores características, sugere que esse distúrbio do humor seja devido às alterações neuroquímicas e neuroanatômicas presentes ao longo da evolução topográfica da lesão neuronal. A degeneração da SNpc, que projeta vias para o estriado e áreas mesocorticais e mesolímbicas, resulta da redução de dopamina, serotonina e noradrenalina, implicando no aparecimento da depressão (McDonald et al., 2003). Entretanto, também é sugerida a presença de outros fatores que podem influenciar a depressão na DP (Figura 3), como é o caso do envolvimento de alterações nos níveis de melatonina (Sandyk, 1990). Foi relatado que pacientes com DP apresentam redução nos níveis plasmáticos noturnos de melatonina e/ou alterações na fase (avanço de fase) de secreção. Ademais, foi observada a redução da expressão de RNA mensageiro (RNAm) dos receptores melatoninérgicos (MT₁ e MT₂) em pacientes com DP (Adi et al., 2010). Deste modo, é sugerido o envolvimento do sistema melatonérgico na depressão associada à DP.

O conhecimento dos fatores relacionados com a depressão na DP impulsiona a busca de terapias antidepressivas para esses indivíduos. Atualmente, o tratamento farmacológico para depressão na DP é pelo uso de agonistas dopaminérgicos (pramipexole), antidepressivos tricíclicos (nortriptilina) e antidepressivos inibidores da receptação de noradrenalina e

serotonina (desipramina) (Aarsland et al., 2012). Em relação a novas terapias farmacológicas, a melatonina e seus análogos (agomelatina) têm recebido crescente atenção nesse contexto, devido ao envolvimento do sistema melatonérgico na depressão e na DP (Mack et al., 2016).

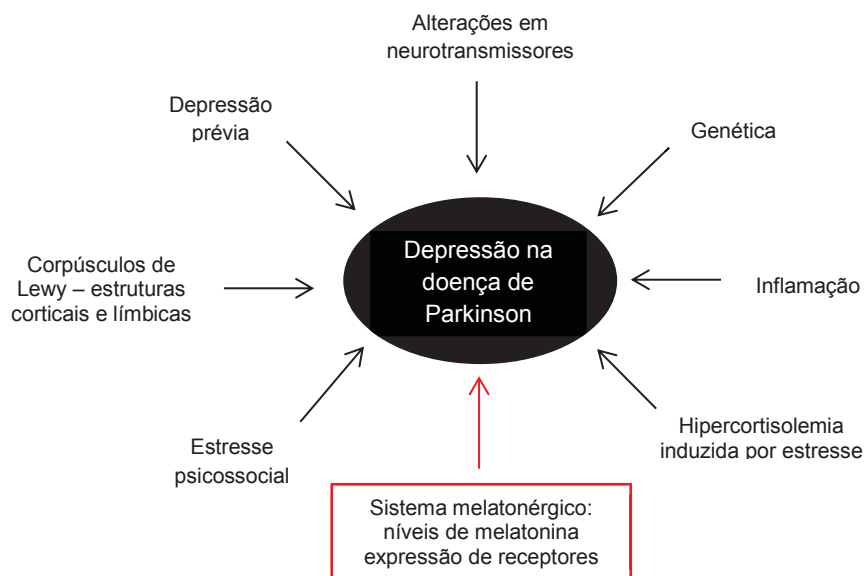


Figura 3. Fatores que podem influenciar a depressão na doença de Parkinson.

4. Modelo animal de DP induzido pela 6-OHDA

O uso de modelos animais no estudo da DP é essencial na investigação de mecanismos moleculares da neurodegeneração, assim como no teste de novos alvos terapêuticos para o tratamento dos distúrbios motores e não motores. Os modelos podem ser induzidos por fármacos, como pela reserpina (Betarbet, Sherer, & Timothy Greenamyre, 2002), modelos transgênicos (superexpressão de α -sinucleína, nocaute dos genes Parkina, PINK1 e DJ-1) (Vingill, Connor-Robson, & Wade-Martins, 2018) ou por neurotoxinas. Em relação aos modelos por neurotoxinas, as mais utilizadas como modelos de DP são: 6-hidroxidopamina (6-OHDA), paraquat, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e a rotenona.

A 6-OHDA foi a primeira substância descoberta com efeitos neurotóxicos no sistema catecolaminérgico periférico quando administrada sistemicamente

(Sachs & Jonsson, 1975). E seu uso como modelo para DP foi iniciado após Ungerstedt (1968) demonstrar que a administração dessa neurotoxina na SNpc de ratos induzia a depleção da dopamina nigro-estriatal. O modelo com a 6-OHDA apresenta vantagens em relação às outras neurotoxinas, como a segurança ao experimentador é maior em relação ao MPTP, e dependendo do local de administração, o modelo com a 6-OHDA pode mimetizar um estágio inicial ou tardio da DP (Francardo, 2017). A 6-OHDA, por não atravessar a barreira hematoencefálica, necessita ser injetada diretamente em estruturas dopaminérgicas por meio da cirurgia estereotáxica. Quando administrada na SNpc ou no feixe prosencefálico medial, a morte neuronal se inicia nas primeiras 12h após a administração da toxina, produzindo uma massiva e quase completa lesão de neurônios dopaminérgicos da SNpc (40-90%) e do estriado dorsolateral (~ 99%), e parcial no estriado dorsomedial (~ 55%). No entanto, com a administração estriatal da 6-OHDA ocorre uma rápida degeneração dos terminais dopaminérgicos estriatais, seguido pela degeneração retrógrada, lenta e progressiva dos neurônios da SNpc (Sauer & Oertel, 1994).

A seletividade por neurônios catecolaminérgicos da 6-OHDA ocorre pela alta afinidade que essa toxina apresenta pelo transportador de dopamina (DAT) e de noradrenalina (NET), devido a sua semelhança estrutural com a dopamina (Figura 4). Com o acúmulo de 6-OHDA no citosol dos neurônios (Figura 5), ocorre a auto-oxidação da toxina, promovendo a formação de radicais livres, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), inibição de enzimas antioxidantes (glutadiona, GSH; e superóxido dismutase) e aumento de marcadores inflamatórios (Bové & Perier, 2012; Duty & Jenner, 2011; Simola & Morelli, 2007). Adicionalmente, a 6-OHDA inibe os complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial, induzindo ao estresse oxidativo (Kupsch et al., 2014). No modelo de 6-OHDA também é observada a redução da expressão de tirosina hidroxilase (TH; enzima etapa limitante da síntese de dopamina) na SNpc (Ilkiw et al., 2018). O aumento do estresse oxidativo, presença de marcadores de inflamação e redução de TH também são características encontradas no encéfalo de indivíduos com DP, assim, suportando a validade

de construto (acurácia que o modelo animal mimetiza a condição humana) do modelo de Parkinsonismo induzido por 6-OHDA (Duty & Jenner, 2011).

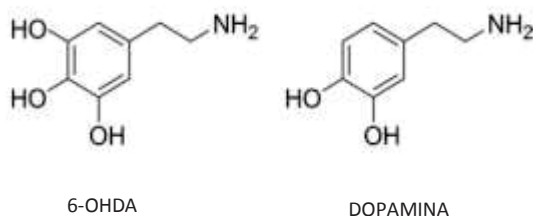


Figura 4. Semelhança estrutural da neurotoxina 6-OHDA em relação ao neurotransmissor dopamina.

Além das alterações bioquímicas, o modelo de 6-OHDA também induz a alterações motoras e não motoras em roedores. O grau do prejuízo motor decorrente da infusão de 6-OHDA é dependente do tamanho da lesão (unilateral ou bilateral) e do local de administração da neurotoxina. A redução na locomoção dos animais, no teste de campo aberto, ocorre quando os animais são lesionados com a 6-OHDA no feixe prosencefálico medial (Carvalho et al., 2013), porém quando a neurotoxina é administrada na SNpc não são observadas alterações na locomoção, que são constantes até 21 dias após a lesão (Santiago et al., 2014). Ainda, a 6-OHDA induz às diversas alterações não motoras observadas na DP como, comportamento tipo-depressivo (Santiago et al., 2014), distúrbios olfatórios (Ilkiw et al., 2018), alterações cognitivas e de aprendizado (Alzoubi, Mokhemer, & Abuirmeileh, 2018), e comportamento tipo-ansiogênico (Bonito-Oliva, Masini, & Fisone, 2014).

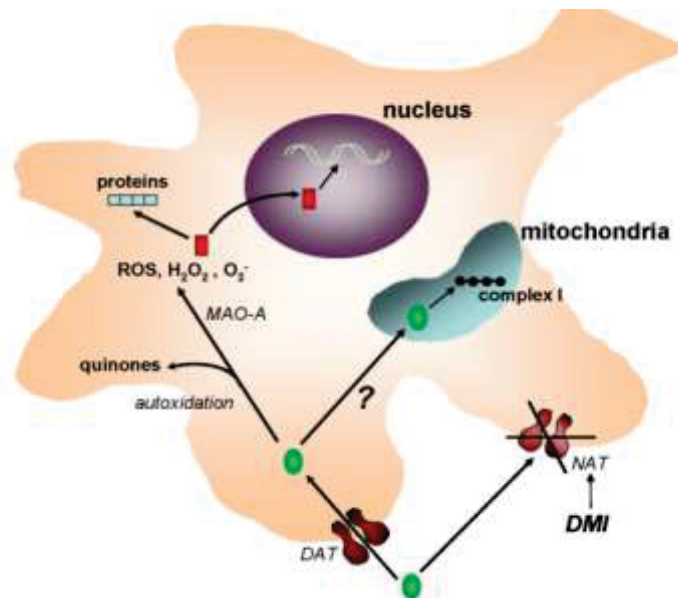


Figura 5. Mecanismo neurotóxico da 6-OHDA. Após a entrada no neurônio, pelo DAT ou NET, a 6-OHDA se acumula no citosol de neurônios catecolaminérgicos. No interior desses neurônios, a 6-OHDA é degradada pela enzima MAO-A e auto-oxidada, gerando radicais livres que induzem ao dano celular. A 6-OHDA também inibe os complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial, resultando em estresse oxidativo. DAT: transportador de dopamina, NET: transportador de noradrenalina. Imagem adaptada de Simola et al., 2007.

5. MELATONINA

A descoberta da melatonina como o hormônio sintetizado na glândula pineal resultou de estudos de Aaron B. Lerner e colaboradores que realizaram o isolamento e caracterização do derivado metoxi da serotonina da glândula pineal bovina (Lerner, Cash, Takahashi, & Mori, 1957). Após a descoberta da síntese de melatonina na glândula pineal a visão dessa glândula mudou rapidamente, de uma estrutura sem função para um local ativo que secreta melatonina. Curiosamente, a primeira função atribuída no momento da descoberta da melatonina foi a sua capacidade de clarear a pele, analisada primeiramente apenas em sapos. Porém, posteriormente foi observado que esse efeito da melatonina se aplicava apenas a anfíbios, e não a mamíferos (Nordlund & Lerner, 1977).

A melatonina é um hormônio derivado do aminoácido triptofano, e é mais conhecida por sua ação em vertebrados na regulação do ritmo claro/escuro e nos comportamentos sazonais em vertebrados. Entretanto, a melatonina é sintetizada em praticamente todas as formas de vida, desde bactérias

primitivas, plantas, animais invertebrados e vertebrados (Hardeland & Poeggeler, 2003; Tan et al., 2010). E essa vasta distribuição entre os organismos vivos sugere uma função mais ampla da melatonina, como no efeito antioxidante contra radicais livres e oxidação celular (Schippers & Nichols, 2014).

5.1. Síntese da melatonina

A síntese de melatonina (Figura 6) ocorre principalmente nos pinealócitos da glândula pineal durante a noite, independente da atividade locomotora diurna ou noturna dos animais (Cardinal & Pevet, 1998). O processo enzimático ocorre a partir da hidroxilação do aminoácido aromático triptofano em 5-hidroxitriptofano, pela triptofano 5-hidroxilase (enzima etapa limitante na síntese serotonina). O 5-hidroxitriptofano é descarboxilado, pela ação da enzima L-aminoácido descarboxilase, em serotonina. A N-acetiltransferase (NAT) é a enzima etapa limitante na síntese de melatonina, e é responsável pela N-acetilação da serotonina em N-acetil-serotonina. Por fim, com a metilação da N-acetil-serotonina, pela hidroxí-indole-O-metil-transferase (HIOMT), também conhecida como N-acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT), ocorre a síntese de melatonina (Cardinal & Pevet, 1998; Carpentieri, Díaz De Barboza, Areco, Peralta López, & Tolosa De Talamoni, 2012). Uma vez formada, a melatonina não é armazenada, sendo assim, após a sua síntese é liberada nos capilares e no líquido cerebrospinal, e rapidamente distribuída pelo organismo (Pandi-Perumal et al., 2008).

A síntese da melatonina na pineal é controlada pelo ciclo claro-escuro através do marca-passo biológico presente no núcleo supraquiasmático (NSQ), portanto os níveis plasmáticos da melatonina apresentam uma ritmicidade circadiana, com níveis elevados durante a noite (pico máximo às 3:00-4:00h, em humanos), e níveis baixos durante o dia (Rajaratnam, Cohen, & Rogers, 2009). A informação do fotoperíodo chega ao NSQ através na via retino-hipotalâmica (Figura 6), e projeções oriundas da retina passam a informação de presença ou ausência de luz para o NSQ. Durante o período escuro ocorre o aumento de >100 vezes nos níveis de RNAm da NAT, seguido pela maior

síntese e atividade da enzima, resultando na crescente produção de melatonina. Entretanto, a presença de luz, durante o dia ou por exposição à luz constante, inibe a síntese e atividade da NAT na pineal, e, conseqüentemente, a síntese de melatonina também é reduzida (Ho & Chik, 2010; Nowak, Zurawska, & Zawilska, 1989).

A síntese da melatonina foi demonstrada inicialmente apenas pineal, porém estudos têm demonstrado que essa glândula não é a única fonte de melatonina no corpo. Cardinali e Rosner (1971) descreveram a presença da enzima HIOMT na retina de ratos, e posteriormente foi descrita a presença de melatonina nessa estrutura (Nowak et al., 1989). Em 1975, foi demonstrada a produção de melatonina no trato gastrointestinal, após a identificação cromatográfica de melatonina e de seus precursores em células enterocromafins (Raikhlin, Kvetnoy, & Tolkachev, 1975). Recentemente, com o avanço de técnicas moleculares, como reação em cadeia da polimerase (PCR), tem permitido a investigação da expressão de RNAm de enzimas envolvidas na síntese de melatonina em diversos tecidos e órgãos, incluindo o timo, baço, coração, músculo esquelético, fígado, estômago, placenta, testículos e ovários (Itoh, Ishizuka, Kuribayashi, Amemiya, & Sumi, 1999; Stefulj et al., 2001). Estruturas encefálicas, como o BO, também apresentam toda a maquinaria para a síntese local de melatonina (Corthell, Olcese, & Trombley, 2014). Com exceção da retina, a síntese extrapineal de melatonina não está sob o controle do fotoperíodo, e diferentemente da pineal, nesses tecidos os níveis de melatonina não apresentam flutuação circadiana (Venegas et al., 2012). Essas observações sugerem que a presença extrapineal de melatonina com níveis constantes, apenas com pequenas variações durante o período de 24h, pode estar desempenhando a função de proteger esses tecidos de insultos pró-inflamatórios e pró-oxidantes (Darío Acuña-Castroviejo et al., 2014; Markus, Cecon, & Pires-Lapa, 2013; Pinato et al., 2015).

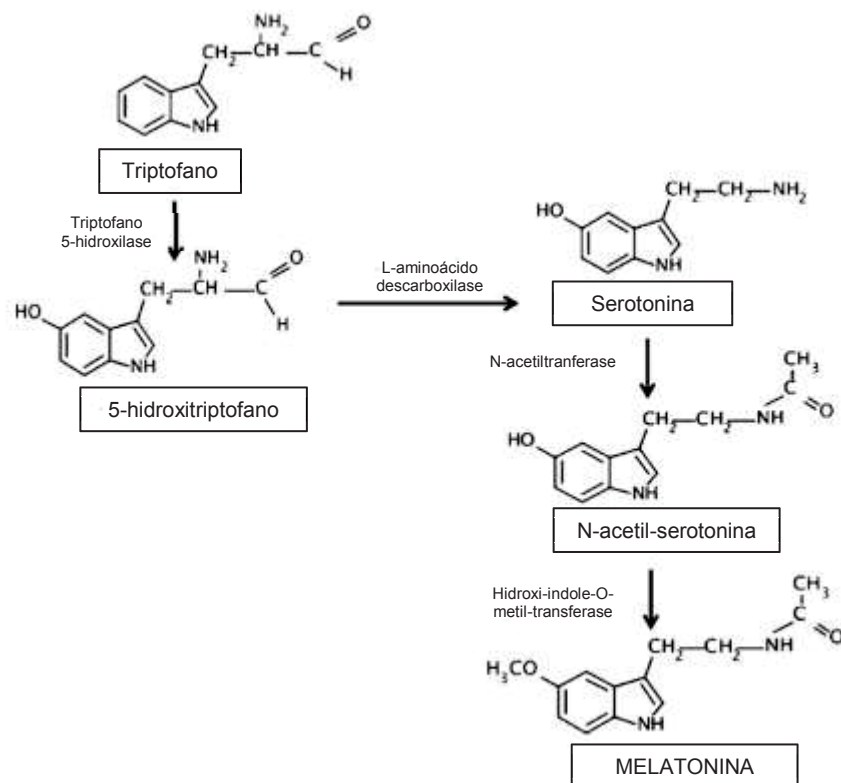


Figura 6. Via de síntese da melatonina. Adaptado de Carpentieri et al., 2012

5.2. Receptores melatonérgicos

A melatonina é uma molécula altamente pleiotrópica e seus efeitos fisiológicos ocorrem pela ativação de receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCR), classificados como MT_1 e MT_2 (Figura 7) (Tosini, Owino, Guillaume, & Jockers, 2014), porém, alguns dos seus efeitos antioxidantes são receptor-independentes (Margarita L Dubocovich et al., 2010; Jockers et al., 2016). Os receptores MT_1 estão acoplados à proteína $G_{i/o}$ e G_q , enquanto que os receptores MT_2 estão acoplados apenas à proteína $G_{i/o}$ (Brydon et al., 1999). A estrutura dos receptores MT_1 e MT_2 apresentam 350 e 363 aminoácidos, respectivamente, e 60% de homologia na sequência de aminoácidos (Slaugenhaupt et al., 1995). Em humanos, os genes que codificam os receptores MT_1 (*MTNR1A*) e MT_2 (*MTNR1B*) estão localizados nos cromossomos 4q35.1 e 11q21-q22, respectivamente (Jockers et al., 2016; Slaugenhaupt et al., 1995).

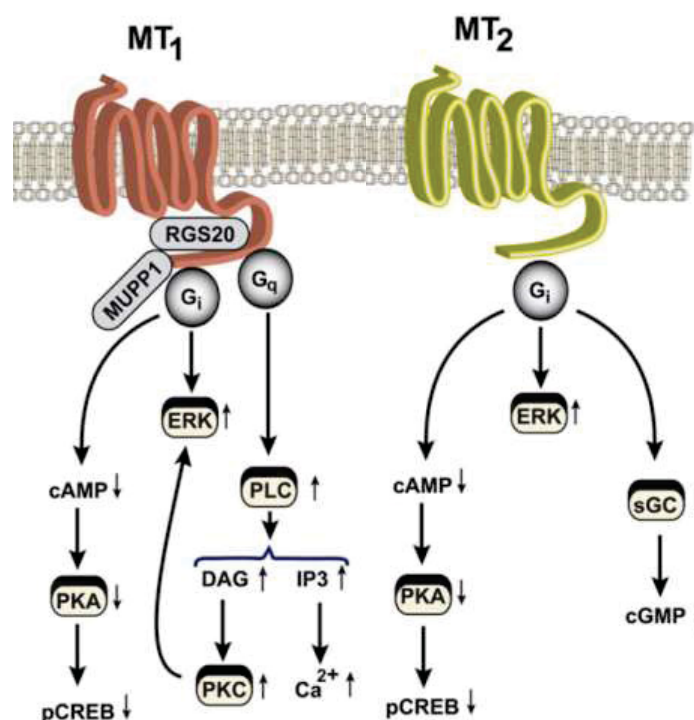


Figura 7. Principais vias de sinalização dos receptores de melatonina . Adaptado de Tosini et al., 2014.

Os receptores melatonérgicos estão vastamente distribuídos em tecidos periféricos e encefálicos, estando expressos no sistema cardiovascular, sistema imunológico, testículos, ovários, pele, fígado, rins, córtex da adrenal, placenta e adipócitos (Brydon, Petit, Delagrang, Strosberg, & Jockers, 2001; Ishii, Tanaka, Kobayashi, Kato, & Sakuma, 2009). No sistema nervoso central esses receptores estão presentes em alta densidade no NSQ, e seus níveis de expressão nesse tecido estão sincronizados dos o ciclo claro/escuro (Hunt et al., 2001; Waly & Hallworth, 2015). Além do NSQ, os receptores MT₁ são expressos no hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal e em estruturas dopaminérgicas, como o caudado putâmen dorsolateral e dorsomedial, núcleo accumbens *core* e *shell*, tubérculo olfatório, substância negra, área ventral tegmental (Uz et al., 2005; Waly & Hallworth, 2015). A expressão de receptores MT₂ foi descrita na retina, córtex cerebral, hipotálamo, hipocampo, cerebelo, substância negra, amígdala e núcleo talâmico reticular (Adi et al., 2010; Lacoste et al., 2015; Sallinen, Saarela, Ilves, Vakkuri, & Leppäluoto, 2005).

Além disso, recentemente, a expressão dos receptores de melatonina também foi descrita no BO (Corthell et al., 2014).

O estudo da formação de homodímeros e heterodímeros entre GPCRs tem avançado na área dos receptores de melatonina. Foi demonstrado que os receptores MT_1 e MT_2 são expressos, em culturas de células HEK293, na forma de homo e heterodímeros (Ayoub et al., 2002). Sendo a presença de homodímeros MT_2 3-4 vezes menor que do heterodímero MT_1/MT_2 , enquanto que é similar a propensão de formar homodímeros MT_1/MT_1 e heterodímeros MT_1/MT_2 (Ayoub, Delagrangue, & Jockers, 2004). Assim, esses dados sugerem que o receptor MT_2 está presente principalmente na forma de heterodímero em células que co-expressam MT_1 e MT_2 (Levoye, Jockers, et al., 2006). Ademais, recentemente foi demonstrada a presença de heterodímeros MT_1/MT_2 em fotorreceptores da retina de camundongos (Baba et al., 2014).

O GPCR órfão GPR50, também conhecido como receptor relacionado à melatonina pois apresenta 45% de semelhança na sequência de aminoácidos comparado aos GPCRs da melatonina (Reppert, Weaver, Ebisawa, Mahle, & Kolakowski, 1996). Entretanto, a melatonina não se liga a esse receptor, mesmo o GPR50 apresentando o resíduo de histidina no quinto domínio transmembrana do receptor, necessário para a ligação da melatonina ao receptor MT_1 (Reppert et al., 1996). Esse receptor órfão apresenta colocalização com os receptores MT_1 e MT_2 , como foi observado em tecidos periféricos e centrais, como testículos, ovários, coração, intestino, retina, hipotálamo, hipocampo e BO (Batailler et al., 2012; Drew et al., 2001). A dimerização entre o GPR50 e receptores da melatonina MT_1 foi demonstrada em cultura de células (Levoye, Dam, et al., 2006). Curiosamente, a formação de heterodímeros GPR50/ MT_1 inibe a ligação de [125 I]-iodomelatonina ao receptor MT_1 , assim como o acoplamento à proteína G ou o recrutamento de β -arrestinas (Levoye, Dam, et al., 2006). Esse efeito inibitório do heterodímero GPR50/ MT_1 ocorre pela presença do longo carboxi-terminal (311 resíduos de aminoácidos) do GPR50, sendo que a deleção de 264 aminoácidos desse terminal restaurou as funções do receptor MT_1 , mesmo quando associado ao GPR50.

Apesar da crescente investigação sobre os receptores de melatonina e a formação de dímeros (Benleulmi-Chaachoua et al., 2018), ainda há necessidade de estabelecer a relevância fisiológica dos receptores melatonérgicos expressos em diferentes tecidos, assim como seu envolvimento em alterações do humor e outros distúrbios não motores da DP (Jockers, Maurice, Boutin, & Delagrance, 2008).

6. EFEITOS TERAPÊUTICOS DA MELATONINA

O envolvimento da melatonina e seus efeitos terapêuticos têm sido investigados nas mais diversas condições, como diabetes (Bonfond, Clément, Fawcett, & Yengo, 2013), autismo (Chaste et al., 2010), cognição (Chaste et al., 2011), hematopoiese (Golan et al., 2018), câncer (Kinker et al., 2016), nocicepção (Yu, Zhu, Xu, Cao, & Wu, 2000), distúrbios do humor e de ansiedade (Nosedá, Targa, Rodrigues, Aurich, & Lima, 2016), e modulação do eixo imune-pineal (Markus, Fernandes, Kinker, da Silveira Cruz-Machado, & Marçola, 2018). Contudo, a melatonina é conhecida principalmente por estar envolvida na sinalização do ciclo claro-escuro, nos biorritmos sazonais e reprodutivos em animais (Carpentieri et al., 2012; M L Dubocovich, Benloucif, & Masana, 1996), e por ser um potente agente antioxidante (Poeggeler et al., 1993). A função antioxidante da melatonina, descrita em 1993, continua sendo intensamente investigada (3165 artigos originais e 1223 revisões sobre o tema no *Science Direct*; palavras-chave: *melatonin and antioxidant*, período: 1995 a 2018), e essa aplicação encontra especial interesse no contexto das doenças neurodegenerativas, como na DP (Miller, Morel, Saso, & Saluk, 2015).

6.1. Melatonina na doença de Parkinson

No contexto da DP, diversos estudos demonstram efeitos neuroprotetores da melatonina no sistema nigroestriatal em modelos animais de Parkinsonismo induzido pelas toxinas 6-OHDA (Gutierrez-Valdez et al., 2012; R. Sharma, McMillan, Tenn, & Niles, 2006), MPTP (Capitelli et al., 2008; Ma, Shaw, & Mitrofanis, 2009) e rotenona (Saravanan, Sindhu, &

Mohanakumar, 2007). Esses efeitos são decorrentes do potencial antioxidante direto da melatonina, que atua neutralizando as espécies reativas de oxigênio ($\bullet\text{OH}$) e nitrogênio (ONOO^-) mitocondriais induzidos pela neurotoxina (Dario Acuña-Castroviejo, Coto-Montes, Monti, Ortiz, & Reite, 1997; Saravanan et al., 2007; Thomas & Mohanakumar, 2004). A melatonina também apresenta a função de antioxidante indireto, aumentando a expressão de RNAm e atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutadiona peroxidase e glutadiona redutase), e reduzindo a atividade da ciclo-oxigenase (COX), da caspase-3 e iNOS (Yildirim et al., 2014). Desta forma, prevenindo a apoptose decorrente do aumento de estresse oxidativo e neuro-inflamação, que pode ser observada pela diminuição da perda de neurônios tirosina hidroxilase imunoreativos (TH-ir) na SNpc (Gutierrez-Valdez et al., 2012). E em relação aos distúrbios motores, estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que a melatonina reduziu os distúrbios motores da DP (Antón-Tay, Díaz, & Fernández-Guardiola, 1971; Capitelli et al., 2008; Lin, Huang, Ching, & Chuang, 2008).

Apesar do reconhecido efeito neuroprotetor e antioxidante da melatonina, uma pequena parcela de estudos relata a potencialização da neurodegeneração dopaminérgica, ausência de efeitos ou até a piora da atividade locomotora após o tratamento com melatonina em modelos animais (Morgan & Nelson, 2001; Tapias, Cannon, & Greenamyre, 2010) e em pacientes com DP (Medeiros et al., 2007; Shaw, Stern, & Sandler, 1972). Entretanto, é importante ressaltar que algumas diferenças metodológicas nesses estudos podem estar relacionadas com esses resultados contraditórios, como o número de pacientes, a idade dos animais, a linhagem utilizada, concentração da neurotoxina e da dose de melatonina administrada.

Em relação aos distúrbios não motores da DP, a melatonina e seus análogos apresentam efeitos benéficos na cognição (Fu et al., 2016), distúrbios do sono (Belaid, Adrien, Karachi, Hirsch, & François, 2015), depressão (Bassani et al., 2014) e ansiedade (Noseda et al., 2016; Ochoa-Sanchez et al., 2012) em modelos animais. Entretanto, ainda não se tem conhecimento do envolvimento da melatonina nos distúrbios olfatórios presentes na DP. A

função da melatonina na depressão e o possível envolvimento na olfação serão discutidos nos próximos tópicos.

6.2. MELATONINA NA DEPRESSÃO

O efeito tipo-antidepressivo da melatonina foi relatado pela primeira vez em 1979, após ser observada a redução no tempo de imobilidade, no teste de natação forçada, após a administração intraperitoneal de melatonina em ratos (Skene, 1979). Desde esse primeiro relato, os efeitos tipo-antidepressivos da melatonina têm sido demonstrados em diversos modelos pré-clínicos de depressão, como: no modelo induzido por estresse crônico moderado (Detanico et al., 2009; Haridas, Kumar, & Manda, 2013), depressão associada ao diabetes induzido por estreptozotocina (Rebai, Jasmin, & Boudah, 2017), administração crônica de dexametasona (Ruksee, Tongjaroenbuangam, Mahanam, & Govitrapong, 2014), depleção de triptofano (Franklin, Hlavacova, Babic, Bermudez, & Jezova, 2015) e pelo lipopolissacarídeo (Taniguti et al., 2018).

Em relação à DP, além dos efeitos neuroprotetores a melatonina também apresenta efeito tipo-antidepressivo no modelo Parkinsonismo induzido pela rotenona (Bassani et al., 2014). Outro estudo demonstrou que o análogo sintético da melatonina 4-P-PDOT resultava em comportamento tipo-antidepressivo no modelo de DP induzido por rotenona (Noseda et al., 2014). Em humanos, o tratamento com agomelatina, um agonista de receptores MT₁ e MT₂ e antagonista competitivo 5HT_{2C} (Kamal et al., 2015), foi eficaz em reduzir a depressão em pacientes com DP. Além do efeito antidepressivo, a agomelatina melhorou os sintomas motores e os pacientes relataram a melhora da qualidade do sono (Avila et al., 2015; De Berardis et al., 2013).

Entretanto, em comparação aos estudos em modelos de depressão, a literatura que investiga os efeitos da melatonina na depressão associada à DP é bem mais restrita. Além disso, são escassos estudos que demonstrem o envolvimento dos receptores de melatonina em estruturas encefálicas envolvidas na DP, como demonstrado por nosso laboratório, até o momento, apenas no estriado (Noseda et al., 2014). Além disso, o envolvimento da

melatonina com a depressão ainda não foi investigada no BO, uma estrutura de fundamental importância na etiologia da DP (Braak et al., 2003), bem como nos distúrbios depressivos (Rochet et al., 2018).

6.2. MELATONINA E SEUS RECEPTORES NA OLFAÇÃO

A síntese extra-pineal de melatonina já está bem estabelecida na literatura, e tem sido alvo de investigações a cerca de suas funções nesses tecidos. Recentemente, foi descrita a expressão de RNAm para os genes *MTNR1A* e *MTNR1B* no BO de camundongos (Ishii et al., 2009). Esse resultado foi posteriormente corroborado por Corthell e colaboradores (2014) em ratos. Além do mais, os autores demonstraram, pela primeira vez, a presença dos receptores MT_1 e MT_2 na camada glomerular do BO, e de toda a maquinaria enzimática necessária para a biossíntese da melatonina (Corthell et al., 2014). Desse modo, a melatonina é sintetizada e liberada no BO, podendo atuar em seus receptores. Entretanto, os autores do trabalho citado ressaltam que os anticorpos utilizados para avaliar a densidade, por imuno-histoquímica, e a expressão dos receptores, por *Western blot*, não são específicos para os receptores MT_1 e MT_2 (Corthell et al., 2014) constituindo-se em uma importante limitação desses achados. Ademais, a função desses receptores no BO não foi descrita.

7. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos clínicos e pré-clínicos evidenciam a associação entre distúrbios olfatórios e depressivos com o sistema olfatório. Em particular, na DP é sugerido que a doença tenha início no BO durante a fase pré-motora, quando a hiposmia e a depressão são diagnosticadas. Foi proposto o envolvimento do sistema melatonérgico na etiologia da depressão associada à DP. De fato, tanto a melatonina quanto alguns de seus análogos sintéticos apresentam efeitos antidepressivos na DP, porém esses efeitos só foram observados pela administração sistêmica. Assim, são poucos os estudos que demonstram a função de receptores melatonérgicos expressos em estruturas específicas

relacionadas à DP, como o BO. Com a descrição de da expressão de RNAm e de receptores de melatonina, MT_1 e MT_2 , foi questionado o possível envolvimento desses receptores com a função olfatória e comportamento tipo-depressivo em um modelo de DP.

8. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar o envolvimento dos receptores de melatonina expressos no BO no comportamento tipo-depressivo e na discriminação olfatória em um modelo de DP induzido pela 6-OHDA intranigral em ratos.

8.1. Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento tipo-depressivo frente à modulação dos receptores melatonérgicos do BO, pela infusão de agonistas (melatonina, IJK7 e 4-P-PDOT) e antagonista (luzindole), aos 7 e 14 dias após a lesão da SNpc;
- Investigar o efeito no comportamento tipo-depressivo da infusão sequencial de luzindole+melatonina e 4-P-PDOT+melatonina no BO, 7 e 14 dias após a lesão da SNpc;
- Determinar o envolvimento dos receptores de melatonina do BO na função olfatória, mediante as administrações no BO de agonistas (melatonina, IJK7 e 4-P-PDOT) e antagonista melatonérgicos (luzindole), 7 e 14 dias após a lesão da SNpc;
- Avaliar o efeito na função olfatória da infusão sequencial de luzindole+melatonina e 4-P-PDOT+melatonina, 7 e 14 dias após a lesão da SNpc;
- Avaliar a expressão no BO dos genes *MTNR1A* e *MTNR1B* 7 e 14 dias após a lesão da SNpc;
- Avaliar a influencia da administração no BO de drogas melatonérgicas na expressão dos genes *MTNR1A* e *MTNR1B*;

- Investigar a presença e funcionalidade dos receptores de melatonina expressos no BO pela ativação da via ERK1/2 e pelo ensaio de ligação ao [³⁵S]GTPγS;
- Avaliar a expressão dos receptores de melatonina na camada glomerular do BO pela técnica de imunofluorescência.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

9.1. Animais

Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar machos, de 3 meses de idade, pesando 300-340 g no início dos experimentos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), em um ciclo claro-escuro de 12:12 horas (7h00-19h00), com a fase clara iniciando às 7h. Água e comida (ração comercial para roedores) foram fornecidas à vontade aos animais durante todos os experimentos. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFPR com o número de protocolo 853.

Para as análises de *Western blot* e para o ensaio de ligação ao [³⁵S]GTPγS, ratos Wistar machos, 3 meses de idade, foram adquiridos pelo Instituto Cochin.

9.2. Delineamento experimental

Os experimentos 1 e 2 foram conduzidos para avaliar o envolvimento dos receptores de melatonina, presentes no BO, nos comportamentos tipo-depressivos e na função olfatória, respectivamente. Os comportamentos foram avaliados 7 e 14 dias após as infusões nigrais de 6-OHDA por meio de cirurgias estereotáxicas, em ambos os experimentos. O experimento 3 teve como objetivo avaliar a presença e os mecanismos de ativação dos receptores de melatonina no BO de ratos.

Experimento 1

Conforme demonstrado na Figura 8, no dia 0 foi realizada a cirurgia estereotáxica para a infusão bilateral de 6-OHDA, ou veículo, na SNpc de ratos, e para a implantação de uma cânula guia na camada glomerular do BO. No sexto (Experimento 1A) ou 13º dia (Experimento 1B) após a cirurgia foi realizado o treino do teste de natação forçada modificado, com duração de 15 minutos, e ao término desse procedimento os ratos foram realocados individualmente a suas caixas. Sete, ou 14 dias, após a lesão, foram feitas infusões únicas (Experimentos 1A, 1B, Figura 1A) ou sequenciais (Experimentos 1C, 1D, Figura 1B) na camada glomerular do BO. Após 30 minutos da administração das drogas foi realizado o teste de natação forçada modificado. Infundiram-se no BO as seguintes drogas: melatonina (1 µg/µl), luzindole (5 µg/µl), I1K7 (10 µg/µl), 4-P-PDOT (5 µg/µl) ou veículo (Figura 8C). Complementarmente, realizou-se a administração sequencial (Experimentos 1C e 1D), que consistiram em iniciar com a administração de um antagonista (luzindole 5 µg/µl, ou 4-P-PDOT, 5 µg/µl), e após 30 min da melatonina (1 µg/µl) foi injetada nesses animais (Figura 8B). Trinta minutos após a exposição à melatonina iniciou-se a realização dos testes comportamentais. Ao término dos testes todos os animais foram decapitados e o BO foi retirado e armazenado em freezer -80°C até o momento do processamento das amostras. Os grupos experimentais do Experimento 1 estão representados na Figura 8C.

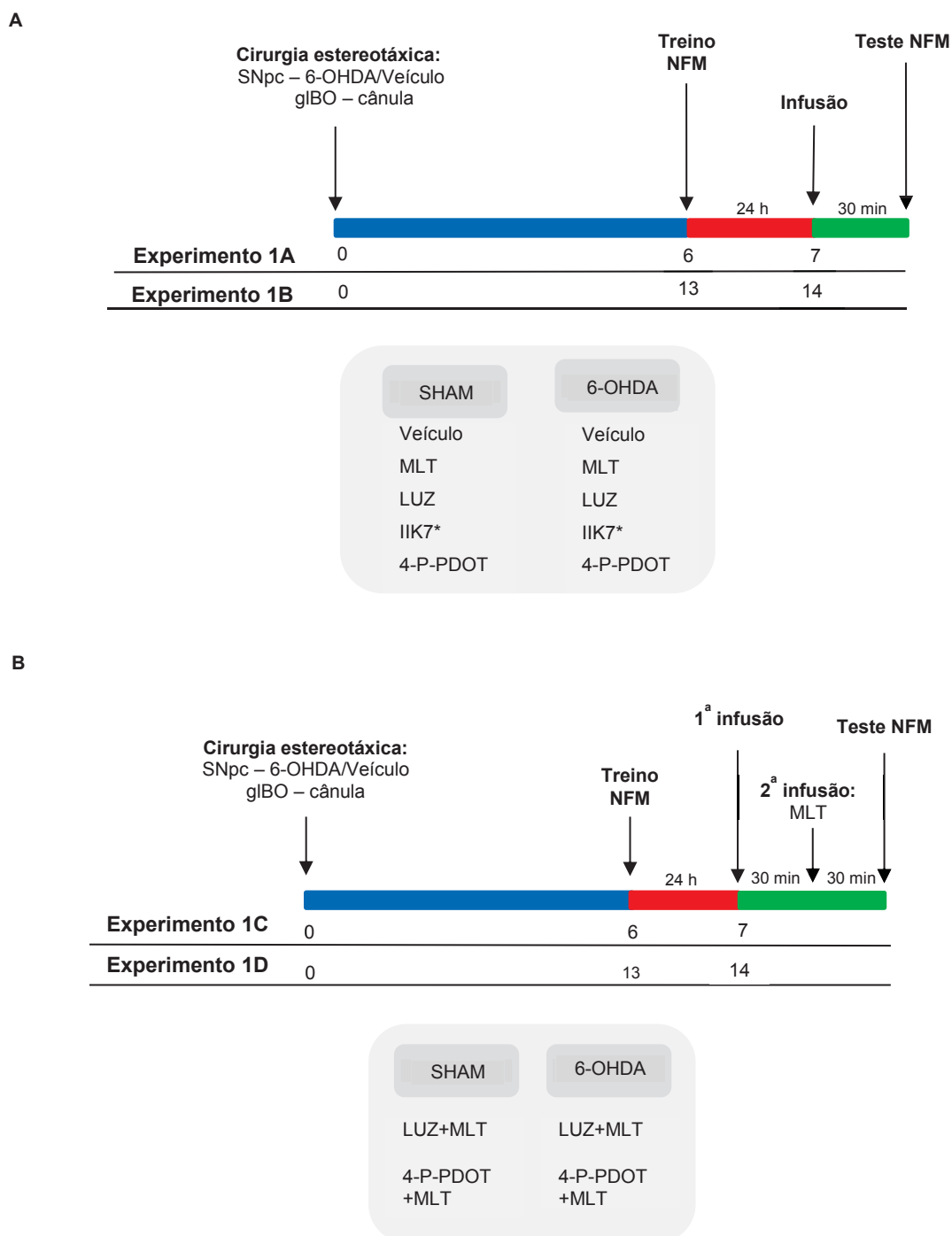


Figura 8. Desenho experimental e grupos do Experimento 1. (A) Nos Experimentos 1A e 1B os ratos receberam a administração única de drogas melatonérgicas no BO, e passaram pelo teste de NF no sétimo e 14º após a cirurgia estereotáxica, respectivamente. (B) Nos Experimentos 1C e 1D, a administração de drogas foi sequencial, e os animais foram avaliados no teste de natação forçada modificado no sétimo e 14º após a lesão, respectivamente. BO: bulbo olfatório, gIBO camada glomerular do bulbo olfatório; NFM: natação forçada modificado, Veículo: DMSO, MLT: melatonina (1 µg/ µl), LUZ: luzindole (5 µg/µl), I1K7: 10 µg/µl, 4-P-PDOT: 5 µg/µl, LUZ (5 µg/µl) + MLT (1 µg/µl), 4-P-PDOT (5 µg/µl) + MLT (1 µg/µl). *I1K7: foi administrado apenas no experimento 1A.

Experimento 2

A cirurgia estereotáxica foi realizada da mesma forma como descrito no Experimento 1, iniciando-se no dia 0 para a infusão bilateral de 6-OHDA ou veículo na SNpc de ratos. Entretanto, 5 (Figura 9, Experimento 2A) ou 12 dias (Experimento 2B) após as lesões os animais foram mantidos isolados, em caixas individuais até o 7º ou 14º dia, para a infusão das drogas. Trinta minutos após a administração das drogas foi realizada a tarefa de discriminação olfatória, e ao término desta os animais foram eutanasiados. No Experimento 2 foram realizadas infusões únicas (melatonina, 1 µg/µl; luzindole, 5 µg/µl; IIK7, 10 µg/µl ou 4-P-PDOT, 5 µg/µl; Experimentos 2A, 2B; Figura 9A) e sequenciais (luzindole, 5 µg/µl, + melatonina 1 µg/µl; e 4-P-PDOT, 5 µg/µl, + melatonina 1 µg/µl; Experimentos 2C, 2D; Figura 9B). Os grupos experimentais do Experimento 2 estão representados na Figura 9C. No dia 0 também foi infundido o Zicam (n=8) intranasal, os experimentos para esse grupo foram semelhantes ao descrito para os grupos sham e 6-OHDA.

Experimento 3

Nesse experimento avaliamos a presença e os mecanismos deflagrados pelos receptores melatonérgicos presentes no BO de ratos pelas técnicas de *western blot* para avaliar a ativação da via ERK 1/2, imunofluorescência e pelo ensaio de ligação ao [³⁵S]GTPγS. Os animais foram decapitados para a retirada do hipotálamo (utilizado como controle positivo nos ensaios) e do BO. As estruturas foram processadas no mesmo dia para o preparo das membranas seguido pelo ensaio de ligação ao [³⁵S]GTPγS ou do *Western blot*. Os animais utilizados para a imunofluorescência foram perfundidos no Laboratório de Neurofisiologia, UFPR, e as amostras foram preparadas e enviadas para o Instituto Cochin. Os três ensaios foram realizados sob orientação do Dr. Ralf Jockers, no laboratório do Departamento de Endocrinologia, Metabolismo e Diabetes do Instituto Cochin em Paris.

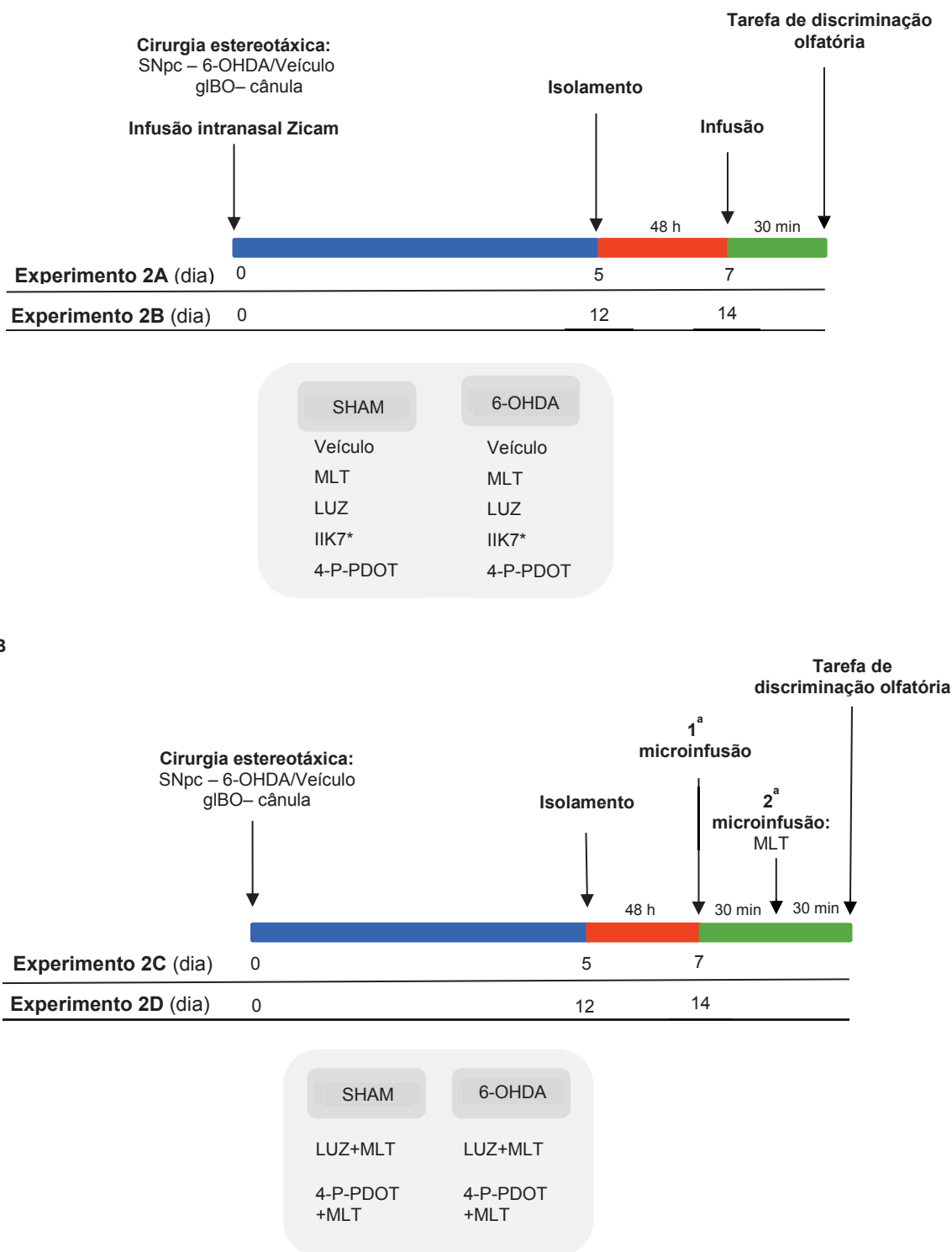


Figura 9. Desenho experimental e grupos do Experimento 2. (A) Nos Experimentos 2A e 2B os ratos receberam a administração única de drogas melatonérgicas no BO, e passaram pela tarefa de discriminação olfatória, no sétimo e 14^o após a cirurgia estereotáxica, respectivamente. (B) Nos Experimentos 2C e 2D, a administração de drogas foi dupla, e a função olfatória dos animais foi avaliada 7 e 14 dias após a lesão, respectivamente. BO: bulbo olfatório, gIBO camada glomerular do bulbo olfatório; NFM: natação forçada modificado, Veículo: DMSO, MLT: melatonina (1 µg/ µl), LUZ: luzindole (5 µg/µl), I1K7: 10 µg/µl, 4-P-PDOT: 5 µg/µl, LUZ (5 µg/µl) + MLT (1 µg/µl), 4-P-PDOT (5 µg/µl) + MLT (1 µg/µl). *I1K7: foi administrado apenas no experimento 2A.

9.3. Drogas

- Melatonina (Sigma-Aldrich): 1 µg/µl, diluído em DMSO;
- I1K7 (Sigma-Aldrich): agonista MT₂, 10 µg/µl, diluído em DMSO;
- Luzindole (Sigma-Aldrich): antagonista não seletivo MT₁ e MT₂, 5 µg/µl, diluído em etanol 50%;
- 4-P-PDOT (Tocris): agonista parcial MT₂, 5 µg/µl, diluído em DMSO;
- 6-OHDA (Sigma-Aldrich): 6 µg/µl, diluído em salina e 2% ácido ascórbico;
- Zicam[®] Oral Mist (Matrixx Initiatives)

9.4. Cirurgia estereotáxica

Para a infusão bilateral na SNpc de 6-OHDA ou veículo, os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg, i.p.) e sedados com xilazina (10 mg/kg, i.p.), posicionados em um aparelho estereotáxico (Insight, Brasil) e o crânio foi exposto com bisturi. Foram ajustadas as seguintes coordenadas estereotáxicas para a SNpc relativas ao bregma: ântero-posterior, -5,0 mm; mediolateral, ±2,1 mm a partir da linha média; e dorso-ventral, -8,0 mm a partir da superfície do crânio, segundo Paxinos e Watson (2006). A microinfusão foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado para a uma microseringa de 10 µl, esse sistema foi conectado a uma bomba de infusão (Insight, Brasil) que permitiu a infusão em uma taxa constante de 0,33 µl/min durante 6 minutos. Os animais do grupo 6-OHDA receberam a infusão de 2 µl da neurotoxina (3 µg/µl), enquanto que no grupo sham realizada a administração de 2 µl salina suplementada com 2% de ácido ascórbico (veículo). Na mesma cirurgia estereotáxica foi realizada a implantação de uma cânula na camada glomerular do bulbo olfatório dos animais, permitindo a posterior infusão de drogas melatonérgicas nessa estrutura. As coordenadas para a camada glomerular do BO foram: ântero-posterior, -7,1 mm; médio-lateral, ±0,0 mm a partir da linha média; e dorso-ventral, -3,4 mm a partir da superfície do crânio (Paxinos & Watson, 2006).

9.5. Administração intranasal Zicam®

O Zicam® Oral Mist (Matrixx Initiatives, Scottsdale, AZ, USA), é um spray nasal, considerado um fármaco homeopático, utilizado em casos de resfriados e congestão nasal nos Estados Unidos. Entretanto, Lim et al. (2009) demonstraram que a infusão nasal desse fármaco lesionou o epitélio olfatório de roedores e de humanos, ocasionando na perda da função olfatória por longos períodos. Desta forma, esse fármaco foi utilizado no presente trabalho como controle positivo da disfunção olfatória avaliada pela tarefa de discriminação olfatória.

Sete dias antes do início dos testes comportamentais, os ratos (n=10) foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg, i.p.) e sedados com xilazina (10 mg/kg, i.p.), e com o auxílio de uma seringa foi feita a infusão de 30 µL de Zicam® em cada uma das narinas do animal. Foi feito o monitoramento dos ratos após a administração, e ao fim do efeito da anestesia os mesmos foram realocados em suas respectivas caixas (Ilkiw et al., 2018; Rodrigues et al., 2014).

9.6. Infusão de drogas no BO

No sétimo (Experimentos 1A, 2A), ou 14º dia (Experimentos 1B, 2B), após a lesão com 6-OHDA foi feita a microinfusão de 1 µL das drogas melatonérgicas na camada gIBo com o auxílio de uma bomba de microinfusão (Insight, Brasil). As drogas e as concentrações utilizadas foram: melatonina (1 µg/µL), luzindole (5 µg/µL), 4-P-PDOT (5 µg/µL), ou veículo. De forma semelhante, a administração sequencial de drogas melatonérgicas foi realizada 7 (Experimentos 1C e 2C) e 14 dias (Experimentos 1D e 2D) após a cirurgia estereotáxica, e consistiu em iniciar com a administração do antagonista (luzindole ou 4-P-PDOT), e após 30 min a melatonina foi injetada nesses animais, em seguida foi aguardado um período de 30 min para o início do teste comportamental. O protocolo de administração de drogas foi realizado durante o ciclo claro, entre as 08h00min e 10h00min.

9.7. Teste de natação forçada modificado

O teste de natação forçada modificado foi utilizado para avaliar os comportamentos tipo-depressivos (Cryan, Valentino, & Lucki, 2005). Esse teste consistiu em colocar individualmente o animal em um tanque cilíndrico de plástico opaco (20 cm diâmetro, 50 cm altura) contendo 30 cm de água ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). Nesse teste os animais primeiro passaram por uma sessão treino, com duração de 15 minutos, e 24 h após foi realizada a sessão teste, por 5 min. Na sessão teste toda a movimentação dos animais na água foi registrada através do uso de uma câmera posicionada acima do tanque, para posteriormente serem analisados os comportamentos durante o teste. Na versão modificada do teste de natação forçada (Detke, Rickels, & Lucki, 1995) é avaliada a frequência de cada parâmetro: imobilidade, natação (movimentos horizontais) e escalada (movimentos verticais). Após o treino e o teste os ratos foram secos e colocados em suas respectivas caixas.

9.8. Tarefa de discriminação olfatória

O aparato do teste consiste em uma caixa (60 x 40 x 50 cm) igualmente dividida em dois compartimentos conectados com uma porta que permitia o livre acesso do animal. Antes do início do teste, os ratos passaram por uma sessão de habituação ao aparato, durante 2 min e com dois compartimentos forrados com cepilho limpo. Para o teste foi adicionado cepilho limpo (odor não familiar) em um dos compartimentos, enquanto que no outro compartimento foi forrado com o cepilho que o animal permaneceu isolado durante 48 h antes do teste (odor familiar). Os ratos foram posicionados no meio da caixa de discriminação olfatória e a exploração do animal foi gravada por 3 min. Nesse teste, um rato que apresenta distúrbio olfatório tende a explorar os dois compartimentos, com o odor familiar e não familiar, igualmente, indicando ausência de discriminação entre os odores. Por outro lado, um animal saudável irá permanecer por um período mais longo explorando o compartimento com o odor familiar (Ilkiw et al., 2018; Rodrigues et al., 2014).

9.9. Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase, quantitativa, em Tempo Real (qRT-PCR)

Os ratos foram decapitados e o bulbo olfatório foi coletado. O RNA total foi isolado pelo método de TRIzol (Invitrogen, USA). A concentração de RNA extraído foi quantificada pelo método espectrofotométrico, com o equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) e interpretada no software NanoDrop[®] ND-2000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Scientific). A integridade do RNA foi verificada pela presença clara e visível das bandas 28S e 18S, utilizando eletroforese em gel de agarose (2%) com 0,5 µg de RNA total.

Cinco microgramas do RNA total foi tratado com 3 µl DNase por 30 min, e as amostras foram incubadas a 65°C, 10 min, com 1 µl de EDTA para inibição da enzima. A síntese de DNA complementar (DNAc) foi realizada com o kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase Supermix* (BioRad) de acordo com o manual do fabricante. Para a amplificação do DNAc foi utilizado o *SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix* (BioRad) e as reações foram realizadas no equipamento de PCR em tempo real (Agilent) nas seguintes condições: 95°C-10 min, seguido por 45 ciclos a 95 °C-15 s, 60 °C-60 s, 95 °C-60 s, 55°C-30 s, e 95 °C-60 s. Cada amostra foi preparada em triplicata, e os *primers* utilizados para a amplificação estão descritos na Tabela 1. O gene HPRT (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase) foi utilizado para normalizar os valores obtidos dos genes de interesse. A normalização foi calculada com base na média de triplicatas para cada amostra e dada de acordo com a seguinte equação $E=2^{(-\Delta Ct)}$, sendo Ct o ciclo de quantificação e $\Delta Ct = Ct_{\text{interesse}} - Ct_{\text{referência}}$, como sugerido por Schmittgen e Livak (2008).

Tabela 1: Sequência de primers utilizados na RT-PCR

Gene	Oligonucleotídeos	
	Senso (5'→3')	Anti-senso (3'→5')
<i>MTNR1A</i>	GGGGTCTTACTGCTTTCTCTT	CCGCTCCAACACTATGCTG
<i>MTNR1B</i>	CCTTTTGCTACCTGCGAA	TTGCCTCTGGATTGATGG
HPRT	CCCAGCGTCGTGATTAGTGA	TGGCCTCCCATCTCCTTCAT

Oligonucleotídeos desenhados com base no banco de dados NCBI através do BLAST: HPRT - Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (XM_008773659.2), *MTNR1A* – gene do receptor de melatonina MT₁ (NM_053676.2), *MTNR1B* – gene do receptor de melatonina MT₂ (NM_001100641.1).

9.10. Preparo das membranas

O BO e a hipótlamo de ratos foram, separadamente, homogeneizados utilizando um pistilo de vidro em 3 ml de tampão de ligação (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, pH 7,4; suplementado com 0,25 M sacarose, 1mM EGTA e 1mM DTT). O homogenato foi centrifugado a 20.000 g durante 30 min a 4 °C (Avanti®-J-E, Beckman Coulter). O precipitado de proteína (*pellet*) foi ressuspenso em tampão de ligação. A quantificação de proteína foi realizada pelo ensaio colorimétrico por BCA (método do ácido bicinonínico, *Bicinchoninic Acid Assay*), seguida pela leitura da reação em um espectrofotômetro (562 nm), e do ensaio de ligação ao [³⁵S]GTPγS.

9.11. Ensaio de ligação ao [³⁵S]GTPγS

Para avaliar a presença e ativação de receptores da melatonina no bulbo olfatório de ratos, foi utilizado o ensaio de ligação ao [³⁵S]GTPγS (guanosina 5'-O[gamma-tio]trifosfato). A molécula de [³⁵S]GTPγS é um análogo do GTP não hidrolisável pela GTPase, que apresenta um isótopo de enxofre 35 (³⁵S) em sua estrutura. A presença do ³⁵S permite avaliar quantitativamente a incorporação do [³⁵S]GTPγS a subunidade alfa da proteína G (G_α), e assim medir a emissão de radiação beta (β⁻) proveniente dessa ligação. Portanto, o ensaio avalia a resposta primária da via de sinalização após a ativação do

receptor, estando diretamente relacionada com a atividade da droga (Milligan, 2003).

As membranas (100 μ l contendo 100 μ g/proteína) foram incubadas com: 25 μ l de tampão de ligação (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, pH 7,4; suplementada com inibidor de protease), 50 μ l da solução de análise (0,1 μ M ou 10 μ M GDP para G $\alpha_{q/11}$ e G α_i , respectivamente, 1 nM [³⁵S]GTP γ S e tampão de ligação) e 25 μ l de 100 nM iodomelatonina (Sigma Aldrich), apresentando um volume final de 200 μ l. A ligação não específica foi determinada na presença de 10 μ M GTP γ S (composto não radioativo). A solução foi incubada a 30°C por 60 min em banho-maria, e a reação foi inibida pela adição de tampão de ligação gelado. As membranas foram centrifugadas (14.000 g, 15 min, 4°C), e o precipitado resultante foi ressuspenso em tampão de solubilização (100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1,5% NP-40, pH 7,4; suplementado com SDS a 0,2%) e a solução foi incubada em um rotador de tubos por 120 min. Após a solubilização, foi adicionado em cada tubo 20 μ l de Pansorbin (Calbiochem), e incubado (1h, a 4°C, sob rotação). Os tubos foram centrifugados por 2 min, e em 100 μ l do sobrenadante foram adicionados 20 μ l de Proteína A/G (*Protein G Sepharose beads*, Santa Cruz *Biotechnology*) e 1,4 μ l de anticorpo anti- G $\alpha_{q/11}$ ou anti-G $\alpha_{i1,2,3}$, a solução foi incubada durante 16 h a 4°C, em um rotador de tubos. Os imunocomplexos foram lavados duas vezes com o tampão de solubilização (na ausência de SDS) e a ligação ao [³⁵S]GTP γ S foi determinada por espectrometria de cintilação líquida (Wallac 1450 Microbeta, Trilux). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

9.12. Western blot para quantificação da expressão de ERK1/2

Trinta minutos após a injeção intraperitoneal de melatonina (n=4, 10 mg/kg) ou veículo (n=4, salina e DMSO) foi realizada a eutanásia dos animais para a retirada do hipotálamo e BO. As estruturas foram rapidamente dissecadas em gelo seco e depois estocadas a -80°C até o processamento. Utilizando um pistilo, as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise, contendo: 50mM Tris-HCl (pH 8,4), 150 mM NaCl, 0,5% Triton, 0,5% NP40 e

inibidores de protease e fosfatase (1 µg/ml AEBSF, 1 µg/ml pepstatina, 1 µg/ml leupeptina, 10 µg/ml benzamidina, 10 mM NaF e 2mM Na_3PO_4). As amostras foram homogeneizadas durante 30 min em agitador rotativo, a 4 °C, em seguida foram centrifugadas (12000 x g, 10 min, 4° C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado e utilizado para determinação da concentração de proteínas totais pelo método colorimétrico de BCA (método do ácido bicinconínico). O sobrenadante (20 µl, contendo 70 µg de proteína) foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para separação das proteínas por peso molecular. O gel (10%) foi montado em aparato de eletroforese vertical. Antes de aplicadas ao gel, as amostras foram aquecidas (95 °C, 5min). As proteínas migraram sob voltagem de 80 mV durante a passagem pelo gel de concentração, e de 100 mV no gel de resolução, em tampão de corrida (Tris-Glicina 1x, SDS 0,1%). As proteínas separadas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose através de um *Trans-Blot cell system* (Bio-Rad), e a eficiência da transferência foi verificada por coloração das proteínas na membrana com solução de Ponceau (5 min, sob agitação). Após 4 lavagens (5 min) com TBST (TBS e 0,1% Triton), foi feita a incubação em solução de bloqueio (3% de leite desnatado em 1% TBST; Triton X-100 e TBS) por 45 min a temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários anti-pERK e anti-ERK (diluições 1:1000; 18h, 4 °C, sob agitação). As membranas foram lavadas com TBST (4x5min), e foram adicionados os anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo, conjugados às moléculas fluorescentes (diluição 1:1000; 45 min, temperatura ambiente). Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas com TBST (4x5min), e a leitura foi realizada no aparelho Odyssey (LI-COR). As bandas foram quantificadas por densitometria óptica usando o software *Image J* (*National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA). Os resultados da quantificação de ERK, no hipotálamo e bulbo olfatório, foram expressos como razão entre ERK fosforilada pela quantidade total de ERK (pERK/tERK).

9.13. Ensaio de imunofluorescência

Ratos sem manipulação (*naive*, n=2) foram profundamente anestesiados com quetamina (90 mg/kg) e perfundidos transcardialmente, com auxílio de uma bomba peristáltica (Insight, Brasil) com aproximadamente 150 mL de PBS (*phosphate-buffered saline*, 0,01 M; pH 7,40), seguido por aproximadamente 150 ml de solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS (0,1 M; pH 7,40), ambos gelados. Os encéfalos foram removidos do crânio, mantidos em 4% paraformaldeído por 24 h a 4° C e crioprotégidos por imersão em solução de sacarose 30% em PBS (0,1 M; pH 7,40) a 4° C por 4 dias. As amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C até o seccionamento.

O tecido congelado foi seccionado em 10 cortes por animal (+7.56 a +7.08 mm, com um intervalo de 40 µm entre os cortes) de 10 µm de espessura ao longo BO em um criostato, os cortes foram distribuídos em lâminas de vidro (gelatinizadas), e armazenados em freezer a -80 °C até o momento de iniciar as reações de imunofluorescência.

Inicialmente, os cortes foram lavados com PBS, pH 7,4, (3x 5min, temperatura ambiente) para retirada de impurezas decorrentes do processamento de corte. Posteriormente, os cortes foram incubados com a solução de bloqueio, contendo 5% soro de cavalo e 0,1 % TBST (0,1% Triton em TBS; tampão Tris-salina) durante 45 minutos, a temperatura ambiente. Para a dupla marcação, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-receptor MT₁ (J50 e A06) ou anti-receptor MT₂ (I81 e A84, Tabela 2) durante 12 h, a 4°C. No dia seguinte, o material foi lavado com PBS (3x5min) para retirar o excesso de anticorpo primário, e incubado com o anticorpo primário anti-tirosina hidroxilase (*rabbit*, 1:100, em solução de bloqueio), durante 4h a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS (3x5min), e incubados com os anticorpos secundários (Tabela 2), durante 2h a temperatura ambiente, no escuro. Para a marcação nuclear, os cortes foram incubados 5 minutos com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:1000, em solução de bloqueio), seguido por lavagem com PBS (1x5min). As lâminas foram seladas com meio de montagem Dako Glycergel (Agilent) e fechadas com lamínula de vidro. A visualização da imunofluorescência foi realizada em microscópio de fluorescência (Axion, Carl

Zeiss), com objetiva de aumento de 40 vezes. As imagens foram adquiridas em diferentes campos do mesmo corte, e todos os parâmetros permaneceram os mesmos durante a análise de todo o experimento.

Para a marcação simples, os cortes foram incubados durante 12 h com os anticorpos primários anti-tirosina hidroxilase (1:100, em solução de bloqueio, ou anti-receptor MT_2 (H06, Tabela 2), a 4°C. No dia seguinte, foi feita a lavagem com PBS dos cortes (3x5min) para retirar o excesso de anticorpo primário, e as etapas seguintes foram realizadas no escuro. As lâminas, contendo os cortes, foram incubadas com o anticorpo secundário (1:200, Tabela 2), durante 2h a temperatura ambiente. Por fim, os cortes foram lavados com PBS (3x5min), incubados com DAPI (5min, 1:1000) e feita a montagem das lâminas.

Tabela 2. Especificações dos anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência

Alvo da imunofluorescência	Anticorpo primário	Concentração	Espécie ^a	Anticorpo secundário	Titulação
MT_1	J50	10 µg/ml	Camundongo	Alexa Fluor 555	1:200
		50 µg/ml			
	A06	5 µg/ml			
MT_2		10 µg/ml	Camundongo	Alexa Fluor 555	1:200
	I81	50 µg/ml			
	A84	10 µg/ml			
		50 µg/ml			
TH	TH	80 µg/ml	Coelho	Alexa Fluor 645	1:200

TH: tirosina hidroxilase, ^a espécie em que o anticorpo foi produzido.

9.14. Análise estatística

As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando análise de variância (ANOVA) de duas vias com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni para os experimentos 1 e 2. Os fatores utilizados no Experimento 1 foram: lesão (sham e 6-OHDA), tratamento (drogas melatonérgicas) e a interação entre esses fatores. No Experimento 2, os fatores analisados por ANOVA de duas vias foram: compartimento (familiar e não familiar), tratamento (drogas melatonérgicas) e a interação entre esses fatores. Para o Experimento 3 (*Western blot* e ensaio de ligação ao [³⁵S]GTPγS) foi utilizado o teste *t* de Student bicaudal não pareado. Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

10. RESULTADOS

10.1. Efeito antidepressivo da infusão no BO de ratos de melatonina, luzindole, IIK7 ou 4-P-PDOT, 7 e 14 dias após a lesão intranigral

O primeiro experimento avaliou o efeito tipo-antidepressivo da infusão no BO de melatonina, luzindole, IIK7 ou de 4-P-PDOT em ratos sham e lesionados com 6-OHDA intranigral (Figuras 10-14).

No tempo 7 dias após a lesão, a avaliação da imobilidade após a administração de melatonina (Figura 10A) por ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo da lesão, $[F(1,49)=15,79; p=0,0002]$, e do tratamento, $[F(1,49)=14,36; p=0,0004]$; entretanto a interação lesão x tratamento não foi significativa, $[F(1,49)=0,051; p=0,8206]$. Para os dados de frequência de natação, 7 dias após a lesão (Figura 10B), ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo da lesão, $[F(1,49)=20,86; p<0,0001]$, e do tratamento, $[F(1,49)=16,53; p=0,0002]$; porém não houve efeito da interação lesão x tratamento $[F(1,49)=1,186; p=0,2816]$. Para o grupo sham, a infusão no BO de melatonina reduziu a frequência de imobilidade (Figura 10A, $p \leq 0,01$), quando comparado ao grupo sham veículo, mas não foi observada alteração na natação (Figura 10B). A lesão com 6-OHDA resultou em maior frequência

de imobilidade ($p \leq 0,05$) e menor frequência de natação ($p \leq 0,001$), comparado ao grupo sham veículo. O tratamento com melatonina, no grupo lesionado resultou em redução significativa da frequência de imobilidade ($p \leq 0,05$) e aumento da frequência de natação ($p \leq 0,01$), quando comparado ao grupo 6-OHDA veículo. Porém, em relação ao respectivo sham, o grupo 6-OHDA melatonina apresentou aumento na imobilidade ($p \leq 0,01$) e redução na natação ($p \leq 0,05$).

Considerando o tempo de imobilidade avaliado 14 dias após a lesão detectou-se que a administração de melatonina (Figura 10C), demonstrou um efeito significativo da lesão, $[F(1,43) = 9,597; p = 0,0034]$, e do tratamento, $[F(1,43)=40,21; p < 0,0001]$; entretanto a interação lesão x tratamento não foi significativa, $[F(1,43)=0,009103; p = 0,9244]$. Para os dados de frequência de natação (Figura 11D), a ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo da lesão, $[F(1,42)=6,590; p = 0,0139]$, e do tratamento, $[F(1,42)=34,75; p < 0,0001]$; porém não houve efeito da interação lesão x tratamento $[F(1,42)=0,3953; p = 0,5329]$. No grupo sham 14 dias após a lesão, a infusão no BO de melatonina reduziu a frequência de imobilidade (Figura 10C, $p \leq 0,001$) e aumentou o comportamento de natação (Figura 10D, $p \leq 0,001$), quando comparado ao grupo sham veículo. A lesão com 6-OHDA resultou em maior frequência de imobilidade ($p \leq 0,05$) e menor frequência de natação ($p \leq 0,001$), comparado ao grupo sham veículo. Os animais do grupo 6-OHDA melatonina apresentaram significativa redução significativa da frequência de imobilidade ($p \leq 0,001$) e aumento da natação ($p \leq 0,001$), quando comparados ao grupo 6-OHDA veículo. O grupo 6-OHDA melatonina aos 14 dias apresentou maior frequência de natação ($p \leq 0,05$) em relação ao respectivo grupo aos 7 dias (Tabela 3)

Para o grupo luzindole, aos 7 dias após a lesão, o comportamento de imobilidade (Figura 11A), demonstrou efeito significativo da lesão, $[F(1,48)=8,753; p = 0,0048]$, e do tratamento, $[F(1,48)=34,67; p < 0,0001]$, não houve, entretanto, efeito da interação lesão x tratamento $[F(1,48)=0,039; p = 0,8435]$. Em relação ao comportamento de natação para o grupo luzindole aos 7 dias (Figura 11B), ANOVA de duas vias demonstrou significante efeito

para a lesão, $[F(1,48)=10,34; p=0,0023]$, tratamento $[F(1,48)=46,01; p<0,0001]$, e interação lesão x tratamento $[F(1,48)=0,030; p=0,8628]$. Para o grupo sham aos 7 dias, a administração de luzindole no BO reduziu o comportamento de imobilidade ($p\leq 0,001$; Figura 11A) e aumentou a frequência de natação ($p\leq 0,001$; Figura 11B), quando comparado ao grupo sham veículo. A administração de luzindole, 7 dias após a lesão com 6-OHDA, resultou em diminuição da imobilidade e aumento da natação comparado aos grupos 6-OHDA veículo (Imobilidade: $p\leq 0,001$; Natação: $p\leq 0,001$) e sham luzindole (Imobilidade: $p\leq 0,05$; Natação: $p\leq 0,05$).

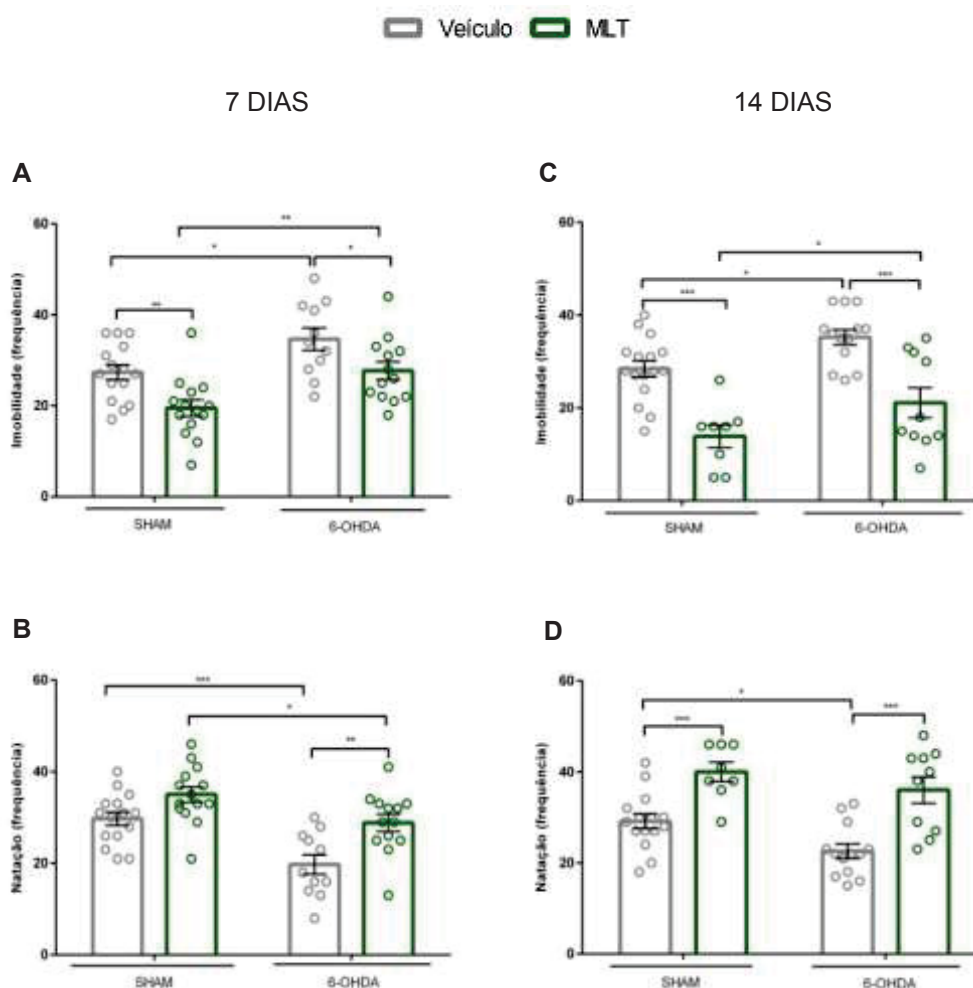


Figura 10. Efeito tipo-antidepressivo da infusão de MLT na camada glomerular do BO. Frequência de imobilidade e natação após a infusão de melatonina na camada glomerular do bulbo olfatório de ratos (A, B) 7 e (C, D) 14 dias após a lesão intranigral com 6-OHDA. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os círculos representam o número de animais em cada grupo. $p\leq 0,05$; $p\leq 0,01$; $p\leq 0,001$. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. MLT: melatonina, Veículo: DMSO.

No comportamento de imobilidade no grupo luzindole aos 14 dias (Figura 11C) não se demonstrou efeito significativo da lesão, [$F(1,38)=0,2883$; $p=0,5945$], tratamento, [$F(1,38)=2,365$; $p=0,1324$], e mesmo da interação lesão x tratamento [$F(1,38)=3,112$; $p=0,0858$]. No mesmo grupo, o comportamento de natação (Figura 12D), não demonstrou efeito associado à lesão, [$F(1,38)=0,0006859$; $p=0,9792$], tratamento [$F(1,38)=2,229$; $p=0,1437$], e para a interação lesão x tratamento [$F(1,38)=2,469$; $p=0,1244$]. Considerando o grupo sham aos 14 dias, a administração de luzindole no BO reduziu o comportamento de imobilidade ($p\leq 0,05$; Figura 11C) e aumentou a frequência de natação ($p\leq 0,05$, Figura 11D), quando comparado ao grupo sham veículo. A administração de luzindole no BO de ratos lesionados não alterou os comportamentos de imobilidade (Figura 11C) e natação (Figura 11D), comparado aos grupos 6-OHDA luzindole ($p>0,05$ e $p>0,05$, respectivamente) e sham luzindole ($p=0,2459$ e $p=0,5923$, respectivamente). A comparação entre os grupos 6-OHDA luzindole aos 7 e 14 dias, demonstrou a maior frequência de imobilidade ($p\leq 0,001$) e menor frequência de natação ($p\leq 0,001$) aos 14 dias para esse grupo (Tabela 3).

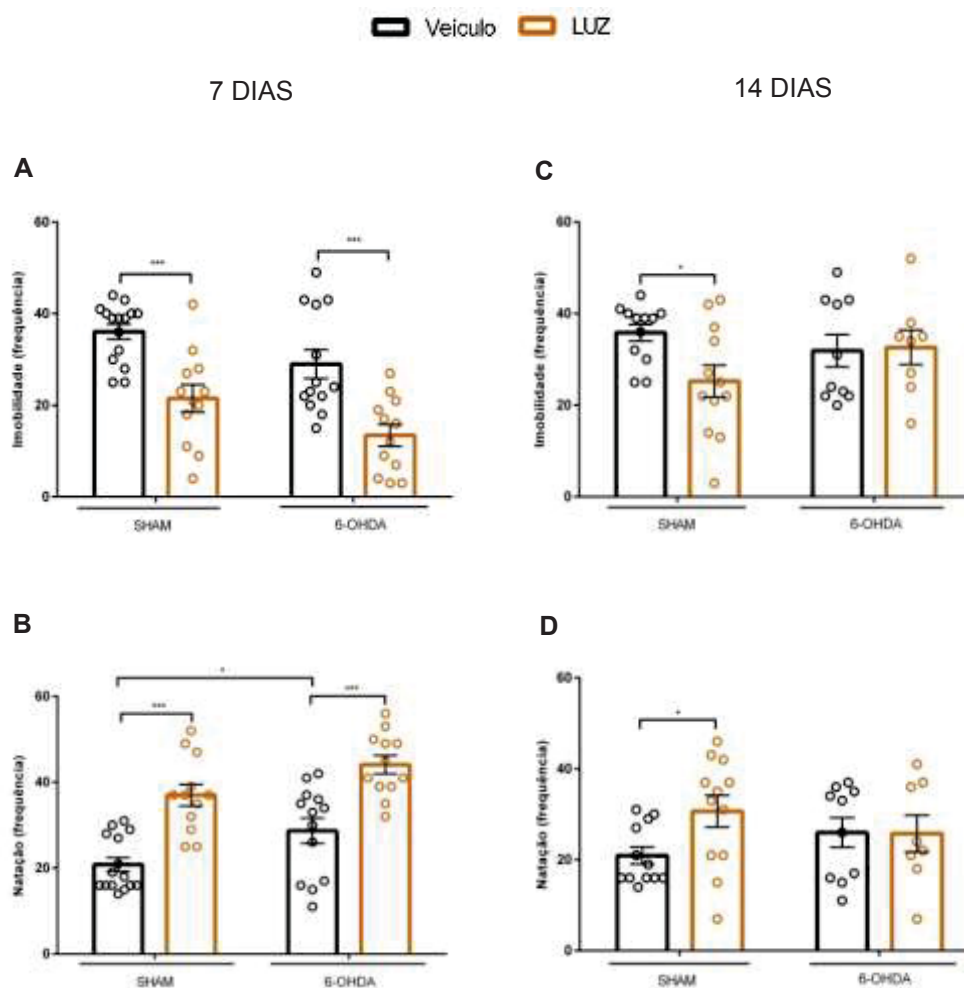


Figura 11. O bloqueio de receptores melatonérgicos do BO reverte comportamento tipo-depressivo induzido pela lesão de 7 dias com a 6-OHDA. Frequência de imobilidade e natação após a infusão de luzindole na camada glomerular do bulbo olfatório de ratos (A, C) 7 e (B, D) 14 dias após a lesão intranigral com 6-OHDA. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os círculos representam o número de animais em cada grupo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. LUZ: luzindole, Veículo: etanol 50%, BO: bulbo olfatório.

Para a frequência de imobilidade, o tratamento com I1K7 aos 7 dias (Figura 12A), demonstrou efeito significativo dos fatores lesão, $[F(1,45)=4,487; p=0,0397]$, e tratamento, $[F(1,45)=7,808; p=0,0076]$, mas não demonstrou efeito significativo da interação entre os estes, $[F(1,45)=0,3021; p=0,0890]$. Em relação à frequência de natação (Figura 12B), a ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo dos fatores lesão, $[F(1,48)=7,099; p=0,0105]$, tratamento, $[F(1,45)=4,481; p=0,0395]$, e da interação entre os fatores,

[$F(1,45)=9,082$; $p=0,0041$]. O grupo 6-OHDA veículo apresentou maior frequência de imobilidade ($p\leq 0,05$) e menor frequência de natação ($p\leq 0,001$), comparado ao grupo sham veículo. O grupo sham IIK7 apresentou aumento de imobilidade ($p\leq 0,01$) e redução do comportamento de natação ($p\leq 0,001$) comparado ao grupo sham veículo.

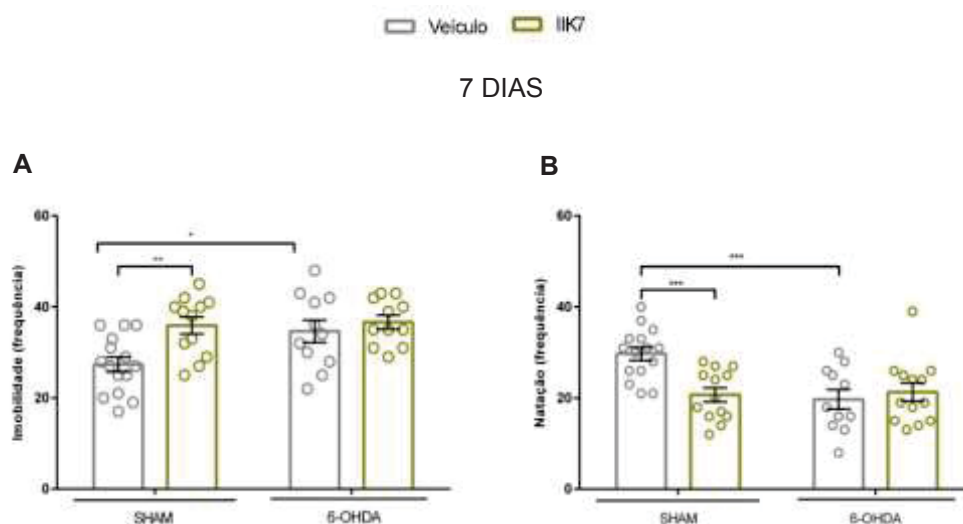


Figura 12: Agonista MT_2 seletivo induz efeito tipo-depressivo em ratos. Frequência de (A) imobilidade e (B) natação após a infusão de IIK7 na camada glomerular do bulbo olfatório de ratos, 7 dias após a lesão intranigral com 6-OHDA. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os círculos representam o número de animais em cada grupo. * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

Para os dados de imobilidade no grupo tratado com 4-P-PDOT aos 7 dias (Figura 13A), a ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo da lesão, [$F(1,52)=0,1277$; $p=0,7223$], do tratamento, [$F(1,52)=0,0069$; $p=0,9341$], e da interação entre os fatores lesão x tratamento, [$F(1,52)=13,66$; $p=0,0005$]. A análise da frequência de natação (Figura 13B) revelou um efeito significativo da lesão, [$F(1,52)=0,4522$; $p=0,5043$], do tratamento, [$F(1,52)=0,0240$; $p=0,8870$], e da interação entre esses fatores, [$F(1,52)=21,41$; $p<0,0001$]. Já o grupo sham 4-P-PDOT aos 7 dias apresentou maior frequência de imobilidade (Figura 13A; $p\leq 0,05$) e menor frequência de natação (Figura 14B; $p\leq 0,01$) quando comparado ao grupo sham veículo. Entretanto, a administração de 4-P-PDOT, no grupo lesionado aos 7 dias, reduziu a imobilidade e aumentou a

natação, comparado aos grupos 6-OHDA veículo (Imobilidade: $p \leq 0,05$; Natação: $p \leq 0,01$) e sham 4-P-PDOT (Imobilidade: $p \leq 0,01$; Natação: $p \leq 0,05$).

Considerando a frequência de imobilidade do grupo tratado com 4-P-PDOT aos 14 dias (Figura 13C), a ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo do tratamento, $[F(1,52)=9,827; p=0,0028]$, e da interação entre os fatores lesão x tratamento, $[F(1,52)=14,56; p=0,0004]$, mas não houve efeito significativo da lesão, $[F(1,52)=0,5384; p=0,4664]$. A análise da frequência de natação nesse grupo (Figura 13D) revelou um efeito significativo do tratamento, $[F(1,51) = 8,817; p= 0,0045]$, e da interação entre esses fatores, $[F(1,51)=16,14; p=0,0002]$, porém não demonstrou efeito da lesão, $[F(1,51)=0,7579; p=0,3881]$. Os animais do grupo 6-OHDA veículo de 14 dias apresentaram maior frequência de imobilidade ($p \leq 0,05$) e menor frequência de natação ($p \leq 0,055$), comparado ao grupo sham veículo. O grupo 6-OHDA 4-P-PDOT apresentou menor frequência de imobilidade e maior frequência de natação quando comprado aos grupos sham 4-P-PDOT (Imobilidade: $p \leq 0,01$, Natação: $p \leq 0,05$) e 6-OHDA 4-P-PDOT (Imobilidade: $p \leq 0,001$, Natação: $p \leq 0,001$). O grupo 6-OHDA 4-P-PDOT aos 14 dias apresentou maior frequência de natação ($p \leq 0,05$) em relação ao respectivo grupo aos 7 dias (Tabela 3).

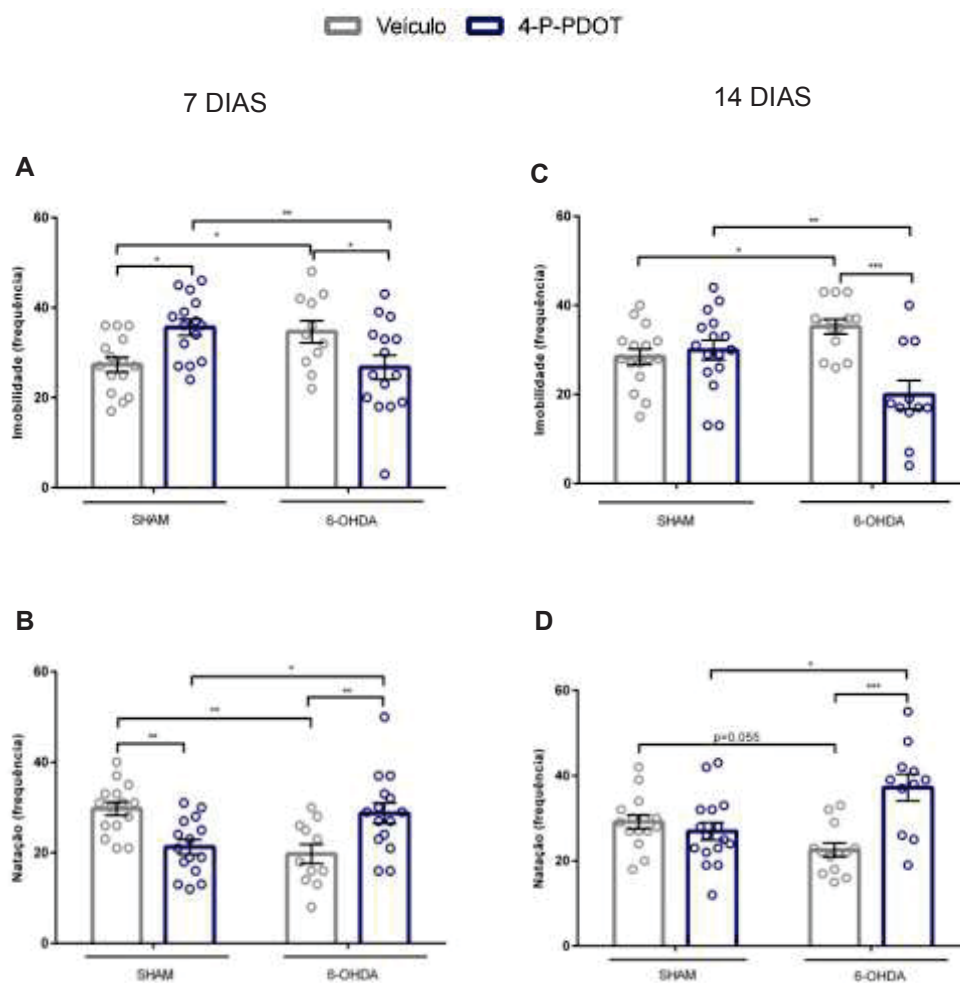


Figura 13. A ativação parcial de receptores MT_2 do BO induz ao comportamento tipo-antidepressivo. Frequência de imobilidade e natação após a infusão de 4-P-PDOT na camada glomerular do bulbo olfatório de ratos (A, B) 7 e (C, D) 14 dias após a lesão intranigral com 6-OHDA. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os círculos representam o número de animais em cada grupo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Veículo: DMSO, BO: bulbo olfatório.

Nos grupos aos 7 dias a comparação dos efeitos do luzindole e do 4-P-PDOT na imobilidade (Figura 14A), por ANOVA de duas vias, demonstrou efeito significativo da lesão, [$F(1,50)=11,55$; $p=0,0013$], e do tratamento, [$F(1,50)=30,23$; $p<0,0001$], mas não houve efeito da interação lesão x tratamento, [$F(1,50)=0,0246$; $p=0,8758$]. Para os dados da frequência de natação (Figura 14B) dos grupos luzindole e 4-P-PDOT, demonstrou-se haver um efeito significativo da lesão, [$F(1,50)=11,50$; $p=0,0014$], tratamento,

[F(1,50)=52,47; $p < 0,0001$], mas sem efeito significativo da interação lesão x tratamento, [F(1,50)=0,0079; $p = 0,9292$]. O grupo sham luzindole, quando comparado ao sham 4-P-PDOT apresentou menor frequência de imobilidade ($p \leq 0,001$) e maior frequência de natação ($p \leq 0,001$). A administração de luzindole no grupo 6-OHDA também apresentou menor frequência de imobilidade (Figura 15A; $p \leq 0,001$) e maior frequência de natação (Figura 15B; $p \leq 0,001$), quando comparado ao grupo 6-OHDA 4-P-PDOT.

Enquanto que para os grupos avaliados aos 14 dias observou-se que os efeitos do luzindole e do 4-P-PDOT na imobilidade (Figura 14C), foram significativos quanto a interação dos fatores lesão x tratamento, [F(1,43)=7,583; $p = 0,0086$], mas não demonstrou-se efeito significativo da lesão, [F(1,43)=0,1763; $p = 0,6767$], e do tratamento, [F(1,43)=1,614; $p = 0,2108$] isoladamente. Para os dados da frequência de natação dos grupos luzindole e 4-P-PDOT (Figura 14D), verificou-se haver um efeito significativo da interação entre os fatores lesão x tratamento, [F(1,43)=5,934; $p = 0,0191$], mas sem efeito significativo da lesão, [F(1,43)=0,7327; $p = 0,3967$], e do tratamento, [F(1,43)=1,532; $p = 0,2226$]. O grupo 6-OHDA luzindole, quando comparado ao 6-OHDA 4-P-PDOT apresentou menor frequência de imobilidade ($p \leq 0,05$) e maior frequência de natação ($p \leq 0,05$).

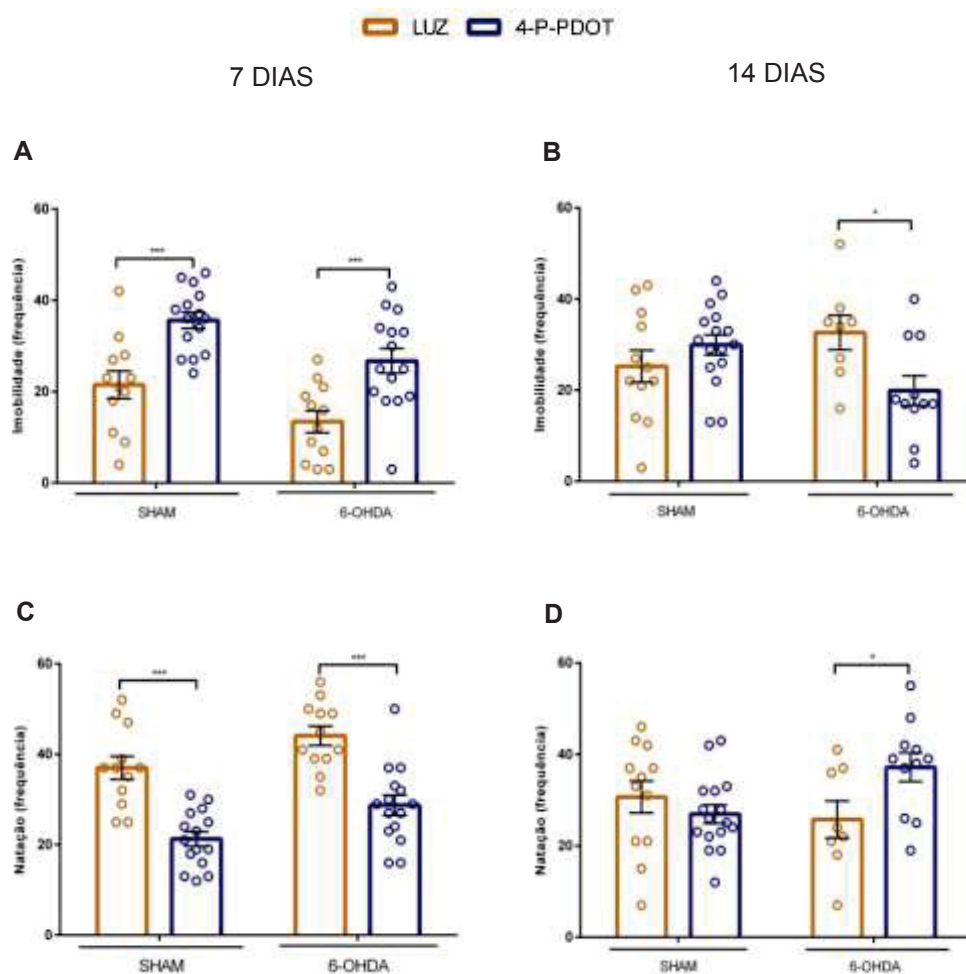


Figura 14. Efeito tipo-antidepressivo do LUZ é superior ao do 4-P-PDOT apenas 7 dias após a lesão. Frequência de imobilidade e natação após a infusão de luzindole ou 4-P-PDOT na camada glomerular do bulbo olfatório de ratos (A, B) 7 e (C,D) 14 dias após a lesão. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os círculos representam o número de animais em cada grupo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

10.2. Efeito da administração sequencial de drogas melatonérgicas no comportamento tipo-depressivo – 7 e 14 dias após a lesão

A segunda etapa do Experimento 1 foi avaliar o efeito no comportamento tipo-depressivo da administração sequencial de um do luzindole ou do 4-P-PDOT seguido pela administração de melatonina.

Os dados de imobilidade dos animais que receberam a infusão de luzindole + melatonina, demonstraram haver um efeito significativo da lesão,

[F(1,89)=0,4296; $p=0,5139$], do tratamento, [F(1,89)=10,56; $p<0,0001$], e da interação lesão x tratamento, [F(1,89)=7,847; $p=0,0001$]. Em relação ao comportamento de natação nesse grupo, a ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo da lesão, [F(3,89)=0,046; $p=0,7274$], do tratamento, [F(3,89) = 10,91; $p< 0,0001$], e da interação entre esses fatores, [F(3,89)=8,609; $p<0,0001$]. A administração sequencial de luzindole + melatonina apresentou menor frequência de imobilidade (Figura 15A) e maior frequência de natação (Figura 15B) apenas nos animais lesionados com 6-OHDA. Essa diferença pode ser observada quando comparado aos grupos: 6-OHDA veículo (Imobilidade: $p\leq 0,001$; Natação: $p\leq 0,001$), 6-OHDA melatonina (Imobilidade: $p\leq 0,01$; Natação: $p\leq 0,001$), sham luzindole + melatonina (Imobilidade: $p\leq 0,05$; Natação: $p\leq 0,05$). No grupo 6-OHDA luzindole é observado menor frequência de imobilidade ($p\leq 0,001$) e maior frequência do comportamento de natação comparado ao grupo 6-OHDA melatonina.

Considerando o tempo de 14 dias após a lesão, os dados de imobilidade dos animais que receberam a infusão de luzindole + melatonina (Figura 15C), revelaram a existência de um efeito significativo da lesão, [F(1,88)=10,68; $p=0,0015$], e do tratamento, [F(3,88)=10,54; $p<0,0001$], mas não demonstraram um efeito significativo da interação lesão x tratamento, [F(3,88)=0,2110; $p=0,8886$]. Em relação ao comportamento de natação nesse grupo (Figura 15D), a ANOVA de duas vias mostrou haver um efeito significativo da lesão, [F(1,87)=7,108; $p=0,0091$], e do tratamento, [F(3,87)=8,340; $p<0,0001$], não houve um efeito da interação entre esses fatores, [F(3,87)=0,1188; $p=0,9489$]. A administração sequencial de luzindole + melatonina, no grupo sham, resultou em maior frequência de imobilidade ($p\leq 0,05$) e menor frequência de natação ($p\leq 0,05$) em relação ao grupo sham melatonina. O grupo 6-OHDA luzindole + melatonina, comparado ao grupo 6-OHDA melatonina, apresentou maior frequência do comportamento de imobilidade ($p\leq 0,05$) e menor frequência de natação ($p\leq 0,05$). No grupo sham luzindole foi observado menor frequência de imobilidade ($p\leq 0,05$), comparado ao grupo 6-OHDA melatonina. O grupo 6-OHDA luzindole+melatonina aos 14 dias apresentou maior frequência de natação ($p\leq 0,001$) em relação ao respectivo grupo aos 7 dias (Tabela 3).

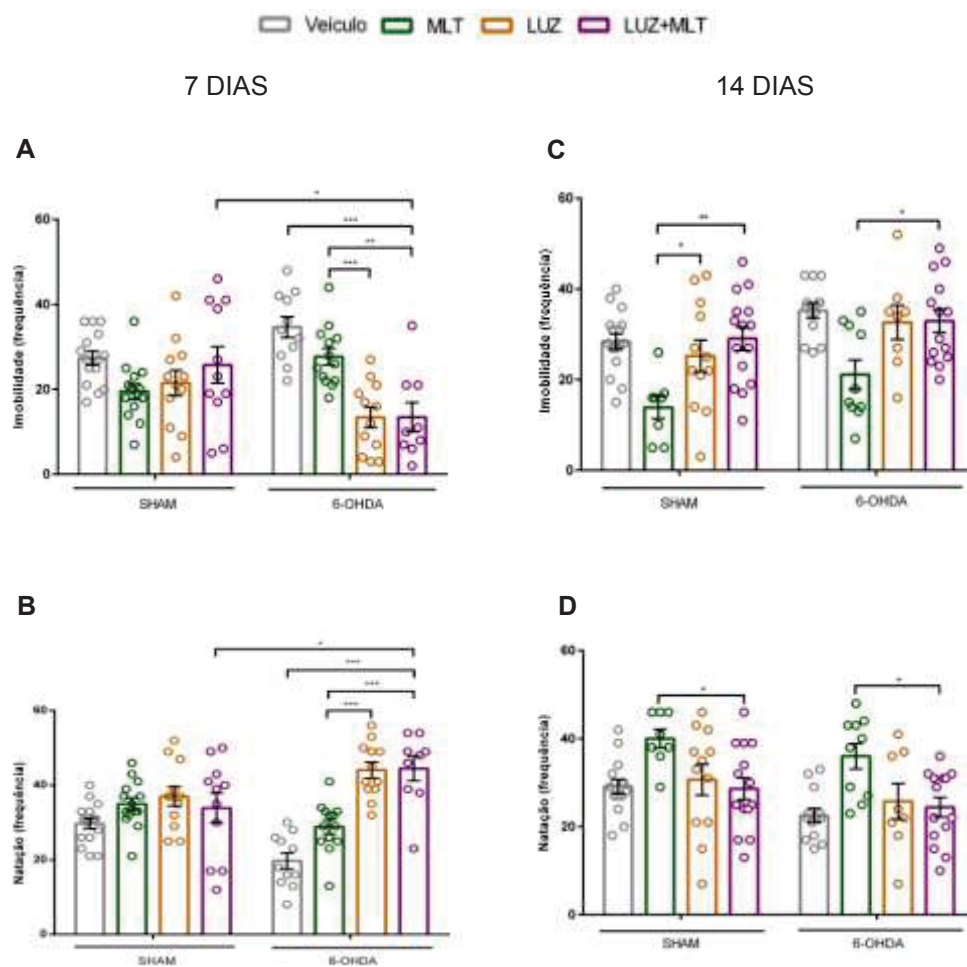


Figura 15. Efeito tipo-antidepressivo do luzindole+melatonina é dependente do estágio da DP. Frequências de imobilidade e natação após a administração sequencial de luzindole e melatonina, (A, B) 7 e (C, D) 14 dias após a cirurgia estereotáxica. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os círculos representam o número de animais em cada grupo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

Em relação à frequência de imobilidade dos grupos que sofreram a administração sequencial de 4-P-PDOT + melatonina, observou-se aos 7 dias (Figura 16A) um efeito significativo da lesão, $[F(3,100)=0,3201; p=0,5728]$, do tratamento, $[F(3,100)=8,251; p<0,0001]$, e da interação entre esses fatores, $[F(3,100)=9,907; p<0,0001]$. A análise de ANOVA de duas vias para a frequência de natação (Figura 16B) demonstrou efeito significativo da lesão, $[F(3,100)=0,1222; p=0,8290]$, do tratamento, $[F(3,100)=19,06; p<0,0001]$, e da interação lesão x tratamento, $[F(3,100)=12,07; p<0,0001]$. A administração de

4-P-PDOT e melatonina nos animais lesionados reduziu o comportamento de imobilidade (Figura 16A) comparado aos grupos 6-OHDA veículo ($p \leq 0,001$), 6-OHDA melatonina ($p \leq 0,05$), 6-OHDA 4-P-PDOT ($p \leq 0,05$) e sham 4-P-PDOT + melatonina ($p \leq 0,01$). A frequência de natação (Figura 16B) foi maior no grupo 6-OHDA 4-P-PDOT + melatonina, comparado aos grupos: 6-OHDA veículo ($p \leq 0,001$), 6-OHDA melatonina ($p \leq 0,05$), 6-OHDA 4-P-PDOT ($p \leq 0,01$) e sham 4-P-PDOT + melatonina ($p \leq 0,01$). A administração de 4-P-PDOT, no BO de animais sham, resultou em maior frequência de imobilidade comparado ao grupo sham melatonina ($p \leq 0,001$) e menor frequência de natação ($p \leq 0,001$).

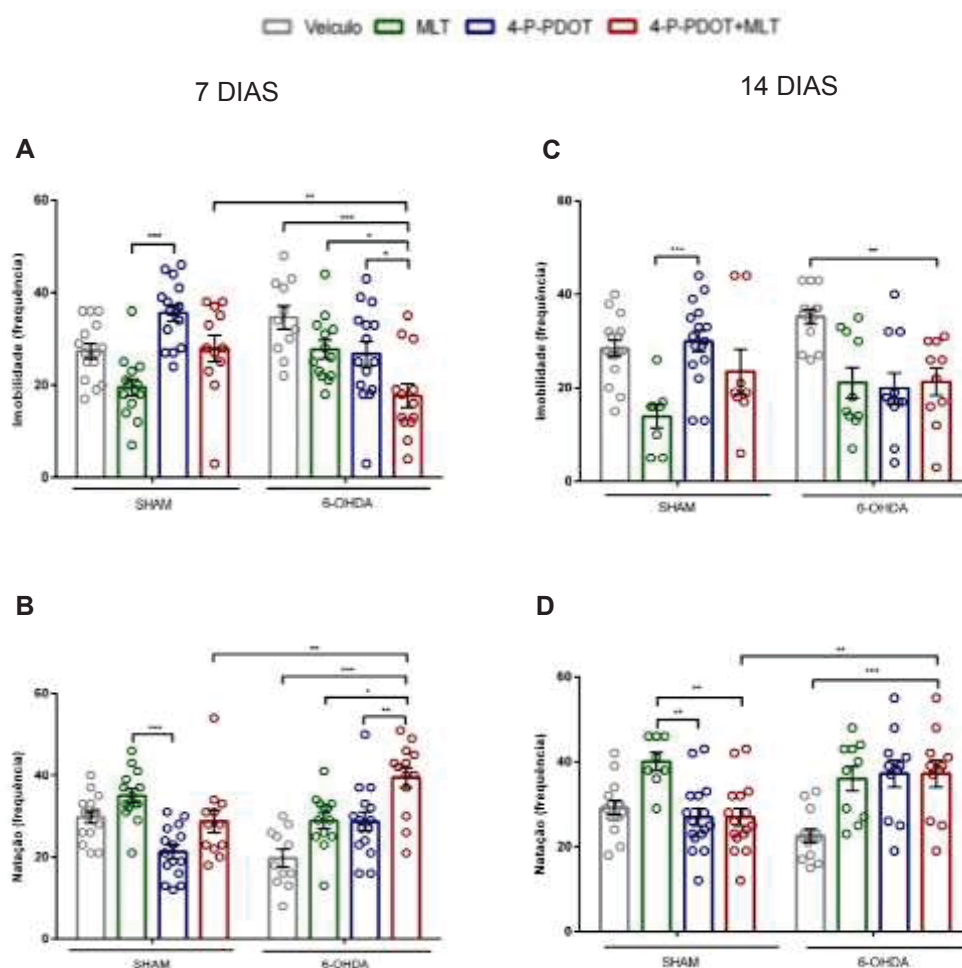


Figura 16. Efeito aditivo da associação de 4-P-PDOT + melatonina no comportamento tipo-antidepressivo ocorre apenas 7 dias após a lesão intranigral. Frequências de imobilidade e natação após a coadministração 4-P-PDOT e melatonina, (A, B) 7 e (C, D) 14 dias após a lesão. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os círculos representam o número de animais em cada grupo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

Em relação à frequência de imobilidade dos grupos aos 14 dias e que receberam a administração sequencial de 4-P-PDOT + melatonina (Figura 16C), a ANOVA de duas vias demonstrou haver um efeito significativo do tratamento, $[F(3,84)=10,19; p<0,0001]$, e da interação entre os fatores lesão x tratamento, $[F(3,84)=5,127; p=0,0026]$, porém não houve um efeito do fator lesão, $[F(1,84)=0,05356; p=0,8175]$. A análise da frequência de natação (Figura 16D) demonstrou a existência de um efeito significativo do tratamento, $[F(3,92)=8,350; p<0,0001]$, e da interação lesão x tratamento, $[F(3,92)=7,763; p=0,0001]$, porém não demonstrou-se um efeito significativo do fator lesão, $[F(1,92)=2,188; p=0,1425]$. A administração de 4-P-PDOT + melatonina aos 14 dias reduziu o comportamento de imobilidade comparado aos grupos 6-OHDA veículo ($p\leq 0,001$), 6-OHDA melatonina ($p\leq 0,05$), 6-OHDA 4-P-PDOT ($p\leq 0,05$) e sham 4-P-PDOT + melatonina ($p\leq 0,01$). A frequência de natação foi maior no grupo 6-OHDA 4-P-PDOT + melatonina, comparado aos grupos: 6-OHDA veículo ($p\leq 0,001$), 6-OHDA melatonina ($p\leq 0,05$), 6-OHDA 4-P-PDOT ($p\leq 0,01$) e sham 4-P-PDOT + melatonina ($p\leq 0,01$). A administração de 4-P-PDOT, no BO de animais sham, resultou em maior frequência de imobilidade ($p\leq 0,001$) e menor frequência de natação ($p\leq 0,001$), comparado ao grupo sham melatonina.

A análise de escalada aos 7 dias (Figura 17A), demonstrou um efeito significativo do tratamento, $[F(5,117)=5,502; p=0,0001]$, e da interação lesão x tratamento, $[F(5,117)=4,115; p=0,0018]$, porém não houve efeito significativo da lesão, $[F(1,117)=1,436; p=0,2332]$. Em relação à frequência de escalada (Figura 17A), o grupo sham melatonina apresentou maior frequência desse comportamento comparado aos grupos sham veículo ($p\leq 0,001$), sham luzindole ($p\leq 0,01$), sham 4-P-PDOT ($p\leq 0,001$), sham luzindole + melatonina ($p\leq 0,001$) e sham 4-P-PDOT + melatonina ($p\leq 0,01$). O grupo 6-OHDA 4-P-PDOT apresentou maior frequência de escalada quando comparado ao grupo sham 4-P-PDOT ($p\leq 0,05$).

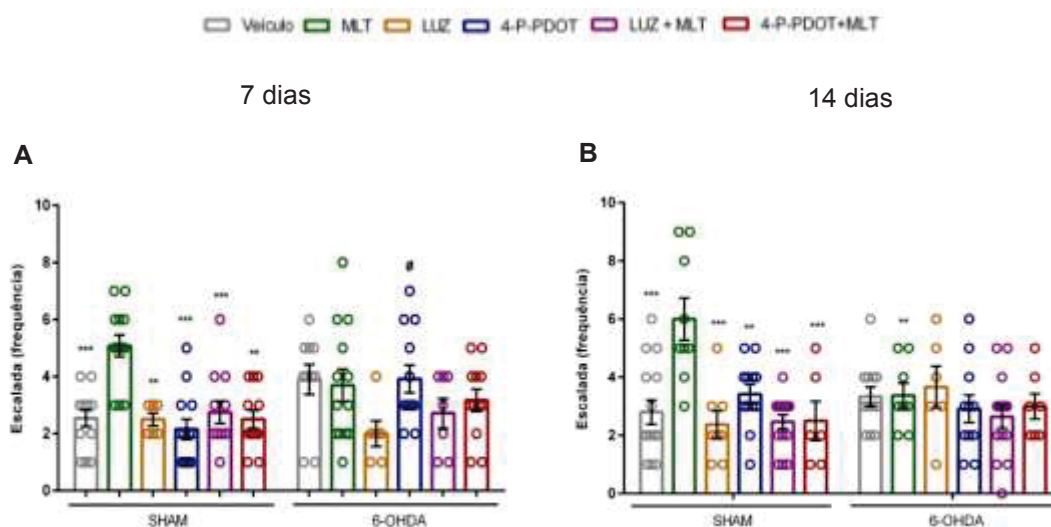


Figura 17. Melatonina intraglomerular aumenta o comportamento de escalada em ratos. Frequência de escalada após a infusão de drogas melatonérgicas na camada glomerular do bulbo olfatório de ratos (A) 7 e (B) 14 dias após a lesão. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os círculos representam o número de animais em cada grupo. [#] $p \leq 0,05$; comparado ao respectivo grupo sham; ^{**} $p \leq 0,01$; ^{***} $p \leq 0,001$; comparado ao grupo sham melatonina. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

Em relação ao tempo de 14 dias (Figura 17B), a análise do parâmetro escalada revelou um efeito significativo do tratamento, $[F(5,111)=5,176; p=0,0003]$, e da interação lesão x tratamento, $[F(5,111)=3,882; p=0,0031]$, porém não houve um efeito significativo da lesão, $[F(1,111)=0,1504; p=0,6989]$. Ainda, o grupo sham melatonina apresentou maior frequência desse comportamento comparado aos grupos sham veículo ($p \leq 0,001$), sham luzindole ($p \leq 0,001$), sham 4-P-PDOT ($p \leq 0,01$), sham luzindole + melatonina ($p \leq 0,001$) e sham 4-P-PDOT + melatonina ($p \leq 0,001$). Enquanto que o grupo 6-OHDA melatonina apresentou redução da frequência de escalada, quando comparado ao grupo sham melatonina ($p \leq 0,01$) (Figura 17B).

Tabela 3. Comparação entre grupos de 7 x 14 dias nos parâmetros de comportamento tipo-depressivo.

7 dias x 14 dias			
Grupo	Imobilidade	Natação	
sham	Veículo	p>0,9	p>0,10
	MLT	p=0,2232	p=0,2393
	LUZ	p=0,7697	p=0,2562
	4-P-PDOT	p= 0,1877	p=0,1279
	LUZ+MLT	p=0,8974	p=0,3931
	4-P-PDOT+MLT	P=0,7054	p>0,10
6-OHDA	Veículo	p>0,9	p=0,5369
	MLT	p=0,1026	p=0,0424 *
	LUZ	p≤0,001 *	p=0,0005 *
	4-P-PDOT	p=0,1364	p=0,0273 *
	LUZ+MLT	p=0,0003	p< 0,0001 *
	4-P-PDOT+MLT	P=0,8191	p>0,10

* $p < 0,05$; 7 dias x 14 dias. Teste *t* de Student bicaudal não pareado

10.3. Efeito da modulação dos receptores melatonérgicos do BO e a função olfatória, 7 e 14 dias após a lesão nigral com 6-OHDA

Nos grupos sham aos 7 dias (Figura 18A), a ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo para o fator compartimento, [F(1,154)=105,2; $p < 0,0001$], e para a interação entre os fatores compartimento e tratamento, [F(6,154)6,186; $p < 0,0001$], mas sem efeito significativo para o fator tratamento, [F(6, 154)=0,004843; $p > 0,9999$]. Os animais do grupo sham veículo, aos 7 dias (Figura 19A; $p \leq 0,001$), apresentaram maior tempo de permanência no compartimento com o odor familiar comparado ao compartimento com odor não familiar ($p \leq 0,001$). Semelhante ao grupo sham veículo, os grupos sham melatonina ($p \leq 0,001$), sham luzindole ($p \leq 0,01$), sham 4-P-PDOT ($p \leq 0,001$) também discriminaram os dois odores.

Para os grupos 6-OHDA aos 7 dias (Figura 18B), demonstrou-se haver um efeito significativo do fator compartimento, [F(1,142)=64,86; $p < 0,0001$], e na interação entre os fatores, [F(6,142)=3,250; $p = 0,0050$], porém sem efeito do fator tratamento, [F(6,142)=0,003441; $p > 0,9999$]. O grupo lesionado aos 7 dias

não apresentou diferença estatística no tempo de permanência nos compartimentos analisados ($p=0,1366$), assim como o grupo Zicam ($p>0,1$), utilizado como controle positivo para o prejuízo olfatório. Os animais 6-OHDA que receberam a administração de luzindole ($p=0,1578$) também permaneceram tempos semelhantes nos dois compartimentos. Entretanto, os animais lesionados que receberam a administração de melatonina ($p\leq 0,001$), 4-P-PDOT ($p\leq 0,001$) permaneceram mais tempo no compartimento com o odor familiar.

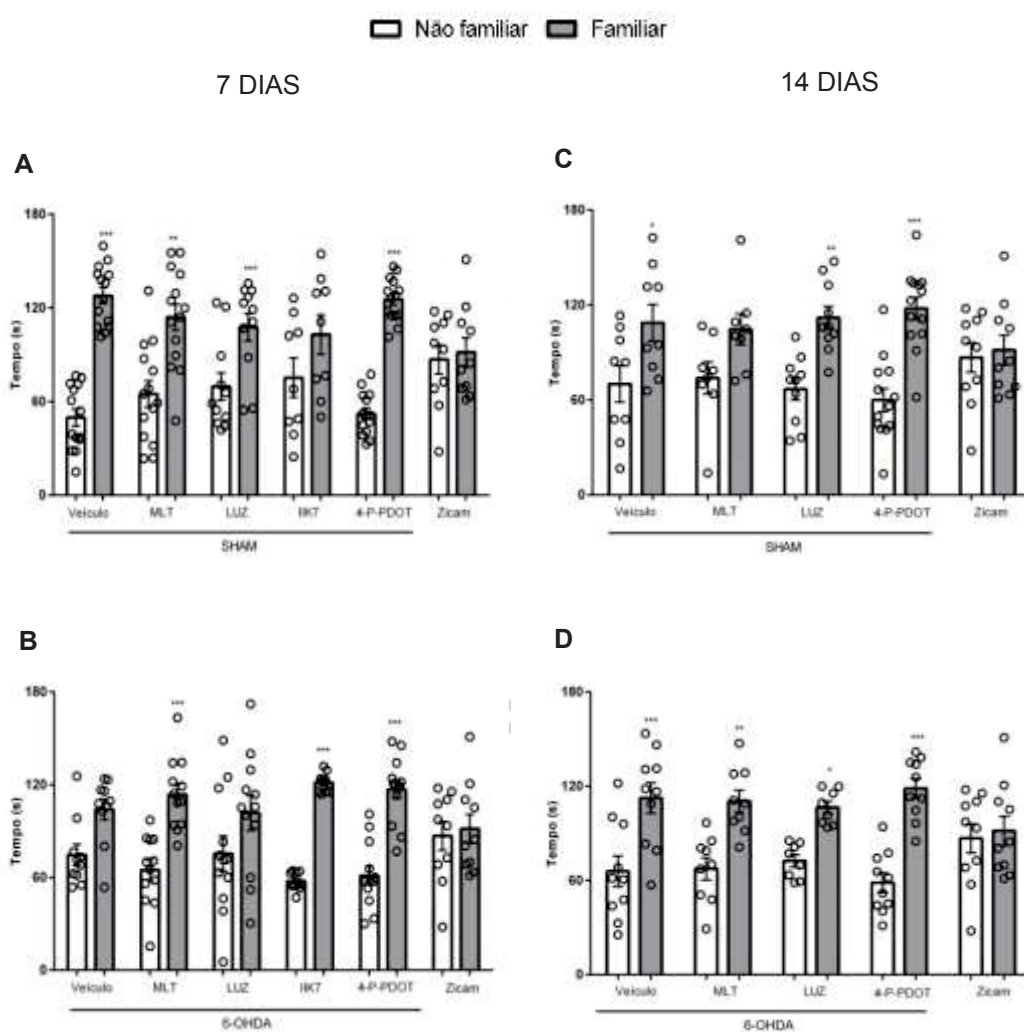


Figura 18. Envolvimento dos receptores de melatonina expressos no BO na função olfatória. Tempo de discriminação entre os compartimentos familiar e não familiar de na tarefa de discriminação olfatória, após a infusão de MLT, LUZ, IKT, 4-P-PDOT ou veículo (A, B) 7 e (C, D) 14 dias após a cirurgia estereotáxica. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os círculos representam o número de animais em cada grupo. ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$; compartimento familiar x não familiar. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

A análise por ANOVA de duas vias para os grupos sham aos 14 dias (Figura 18C) demonstrou um efeito significativo do fator compartimento, $[F(1,120)=60,91; p<0,0001]$, e da interação entre os fatores compartimento e tratamento, $[F(6,120)=2,683; p=0,0177]$, porém sem efeito do fator tratamento, $[F(6,120)=0,003125; p>0,9999]$. O grupo sham veículo aos 14 dias discriminou os dois odores, permanecendo mais tempo no compartimento familiar, comparado ao compartimento com o odor não familiar ($p\leq 0,05$). Resultados semelhantes podem ser observados nos grupos: sham luzindole ($p\leq 0,01$), sham 4-P-PDOT ($p\leq 0,001$). A administração de melatonina ($p=0,1583$) no BO de animais sham resultou em prejuízo olfatório.

Nos grupos lesionados com a 6-OHDA, aos 14 dias (Figura 18D), a demonstrou-se um efeito significativo do fator compartimento, $[F(1,120)=98,16; p<0,0001]$, e da interação entre os fatores compartimento e tratamento, $[F(6,120)=5,409; p<0,0001]$, mas não demonstrou efeito do fator tratamento, $[F(6,120)=0,003223; p>0,9999]$. No grupo 6-OHDA veículo, aos 14 dias, a lesão intranigral não alterou a discriminação olfatória dos animais, sendo que esses permaneceram mais tempo no compartimento familiar comparado ao compartimento não familiar ($p\leq 0,001$). Os grupos 6-OHDA melatonina ($p\leq 0,01$), 6-OHDA luzindole ($p\leq 0,01$) e 6-OHDA 4-P-PDOT ($p\leq 0,001$) também apresentaram maior tempo de permanência no compartimento familiar.

A infusão de luzindole e melatonina aos 7 dias ($p=0,5808$) e 14 dias ($p=0,7632$), resultou em prejuízo olfatório em ratos sham (Figura 19A). No grupo 6-OHDA aos 7 dias, o prejuízo olfatório permaneceu nesses animais mesmo após a infusão de luzindole + melatonina. A infusão de luzindole+melatonina, no grupo 6-OHDA, aos 14 dias, resultou ausência de discriminação entre os dois compartimentos ($p=0,6557$).

A administração de 4-P-PDOT + melatonina no grupo 6-OHDA, aos 7 dias (Figura 19B), resultou na restauração da função olfatória ($p\leq 0,001$). Os grupos sham (7 e 14 dias) e 6-OHDA (14 dias) que receberam a administração sequencial permaneceram discriminando os dois odores, com preferência pelo compartimento com o odor familiar.

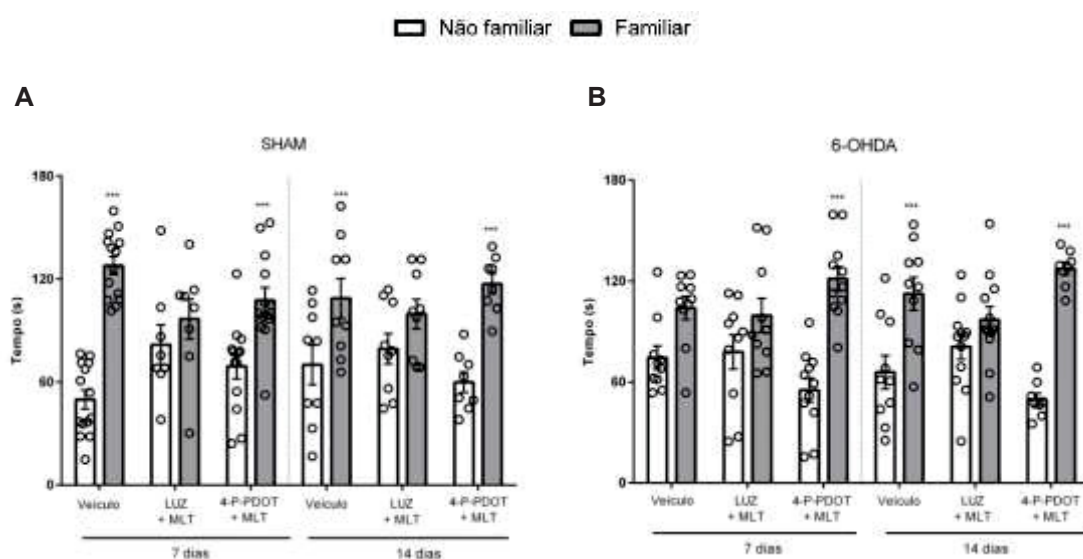


Figura 19. Prejuízo olfatório pela infusão de luzindole+melatonina no BO de ratos. Discriminação olfatória de ratos (A) sham e (B) 6-OHDA após a infusão de luzindole + melatonina ou 4-P-PDOT + melatonina no BO, de 7 e 14 dias após a lesão intranigral com 6-OHDA. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os círculos representam o número de animais em cada grupo. $^{***} p \leq 0,001$; compartimento familiar x não familiar. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

10.4. Expressão de RNAm dos receptores MT_1 e MT_2 no BO

Foi avaliada a expressão dos genes *MTR1NR* e *MTR2N*, responsáveis pela síntese dos receptores MT_1 e MT_2 , respectivamente (Tabela 4). A expressão do gene *MTR1N* no BO foi menor nos animais 6-OHDA 4-P-PDOT aos 7 dias comparado ao grupo sham 4-P-PDOT ($p=0,059$). Porém, não foram observadas diferenças na expressão de receptores MT_1 entre os grupos sham e 6-OHDA aos 7 e 14 dias. O grupo 6-OHDA melatonina aos 14 dias apresentou a expressão de *MT1RN* aumentada em relação ao respectivo grupo aos 7 dias ($p \leq 0,05$). A análise da expressão do gene *MTR2N* no BO também não demonstrou diferenças significativas entre os grupos sham e 6-OHDA aos 7 dias.

Tabela 4. Expressão relativa dos níveis de RNAm para MT₁ e MT₂ no BO, 7 e 14 dias após a lesão intranigral com 6-OHDA.

Grupos	7 dias		14 dias	
	MT1	MT2	MT1	
sham	Veículo	$1,2 \times 10^{-2} \pm 6,4 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3} \pm 1,0 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2} \pm 1,4 \times 10^{-2}$
	Melatonina	$1,8 \times 10^{-1} \pm 1,4 \times 10^{-1}$	$4,5 \times 10^{-4} \pm 4,5 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-1} \pm 4,3 \times 10^{-1}$
	Luzindole	$1,9 \times 10^{-2} \pm 1,5 \times 10^{-2}$		$5,9 \times 10^{-4} \pm 4,05 \times 10^{-4}$
	4-P-PDOT	$6,7 \times 10^{-3} \pm 7,7 \times 10^{-4}$		$2,5 \times 10^{-2} \pm 6,5 \times 10^{-3}$
	Luzindole + melatonina	$1,7 \times 10^{-3} \pm 1,5 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3} \pm 8,9 \times 10^{-4}$	$8,2 \times 10^{-3} \pm 3,6 \times 10^{-3}$
	4-P-PDOT + melatonina	$6,3 \times 10^{-5} \pm 1,9 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-4} \pm 5,5 \times 10^{-6}$	$5,05 \times 10^{-3} \pm 4,2 \times 10^{-3}$
6-OHDA	Veículo	$3 \times 10^{-3} \pm 1,2 \times 10^{-3}$	$7,4 \times 10^{-3} \pm 2,4 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-1} \pm 8,4 \times 10^{-1}$ ^b
	Melatonina	$1,5 \times 10^{-3} \pm 1,2 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-3}$	$1,09 \times 10^{-1} \pm 3,7 \times 10^{-1}$ ^a
	Luzindole	$3,6 \times 10^{-3} \pm 2,7 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3} \pm 1,2 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-2} \pm 1,6 \times 10^{-2}$
	4-P-PDOT	$2,0 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$ *		$4,5 \times 10^{-2} \pm 2,8 \times 10^{-2}$
	Luzindole + melatonina	$7,8 \times 10^{-4} \pm 3,6 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4} \pm 1,9 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-2} \pm 1,2 \times 10^{-2}$ ^c
	4-P-PDOT + melatonina	$1,6 \times 10^{-3} \pm 1,3 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-4} \pm 9,7 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-2} \pm 1,3 \times 10^{-2}$

A expressão foi normalizada pelos níveis de HPRT ($E=2^{-\Delta Ct}$). Os valores representam a média \pm erro padrão da média. Cada amostra (n=2-5) foi avaliada em triplicata. * $p \leq 0,059$; comparado ao respectivo grupo sham, ^a $p \leq 0,05$; ^b $p \leq 0,073$; ; ^c $p \leq 0,081$ relativo a expressão de MT₁ aos 7 dias x 14 dias. Valores expressão como média. Teste *t* de Student bicaudal não pareado.

A verificação da integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese, pela presença das bandas 28S e 18S (Figura 20).

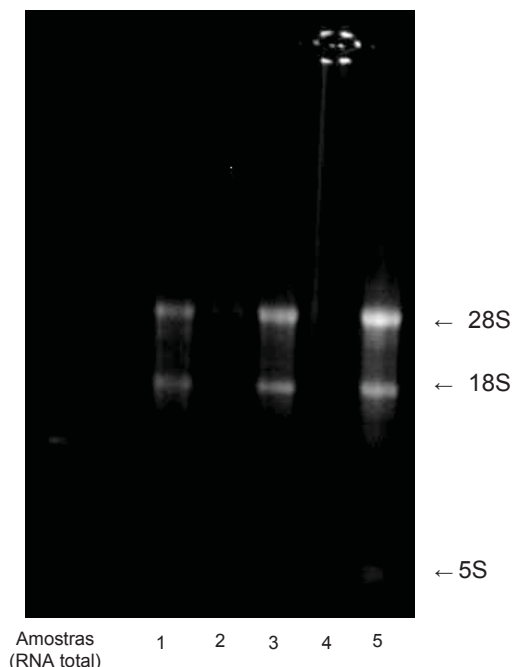


Figura 20. Eletroforese para RNA para avaliação da integridade das amostras. As bandas 28S, 18S e 5S demonstram a presença de RNA ribossômico nas amostras de RNA total extraídas pelo método TRizol.

10.5. Ativação dos receptores melatonérgicos no BO de ratos

A investigação da presença e ativação dos receptores da melatonina no BO foi realizada pelo ensaio de ligação ao [35 S]GTP γ S seguido por imunoprecipitação das proteínas G_i ou G_q . No hipotálamo (Figura 21A), utilizado como controle positivo, as membranas incubadas com iodomelatonina apresentaram maior ativação das proteínas G_i ($p \leq 0,05$) e G_q ($p \leq 0,05$), comparado ao estado basal. No BO (Figura 21B) a presença do composto iodomelatonina aumentou a ativação das proteínas G_i , comparado ao estado basal ($p \leq 0,05$). Esse resultado pode ser observado pelo aumento de ligação de [35 S]GTP γ S à amostra quando incubado com o agonista melatonérgico iodomelatonina.

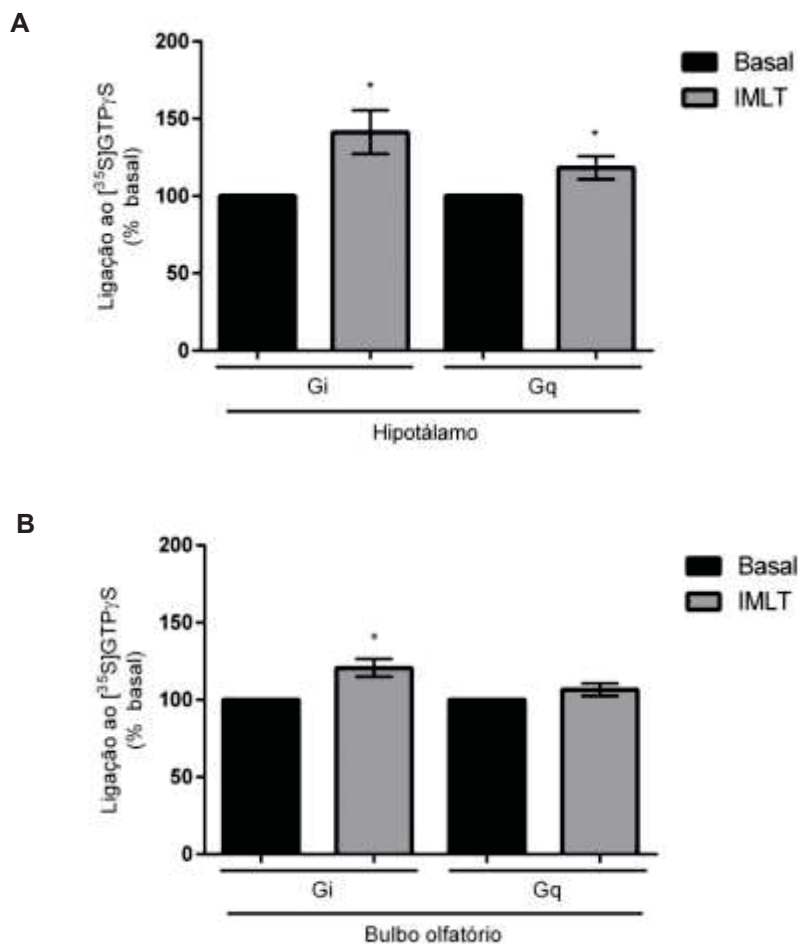


Figura 21. Receptores de melatonina do BO ativam a proteína G_i . Porcentagem em relação ao basal de ligação ao [³⁵S]GTPγS após a ativação dos receptores melatonérgicos pela iodomelatonina (IMLT) no (A) hipotálamo e no (BO). As barras representam a média \pm erro padrão da média. * $p \leq 0,05$ em relação ao respectivo grupo basal. Teste *t* de Student bicaudal não pareado.

10.6. Análise da expressão da via ERK

A análise da expressão da via ERK pela melatonina foi realizada no BO e hipotálamo de ratos. No hipotálamo (Figura 22A), a administração intraperitoneal de melatonina (10 mg/kg) aumentou a expressão de ERK fosforilada ($p \leq 0,05$) comparado aos ratos que receberam a injeção de veículo (grupo basal). Entretanto, no BO não houve diferença entre os animais que receberam melatonina ou veículo (Figura 22B).

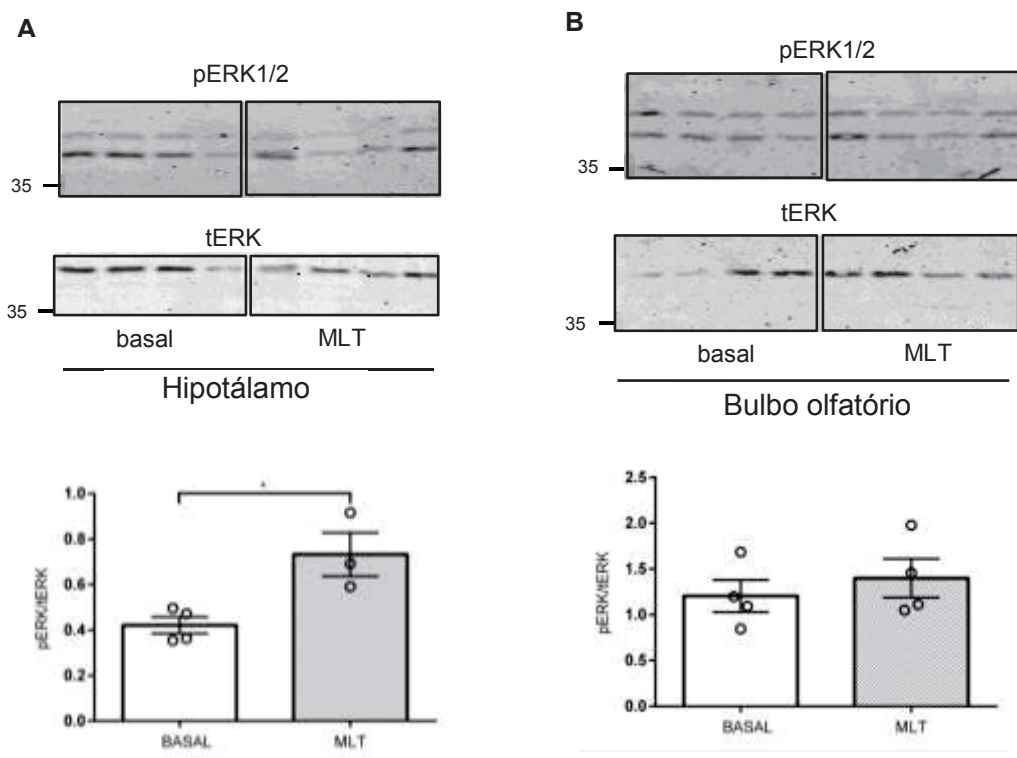


Figura 22. Melatonina não induz fosforilação da ERK1/2 no BO. Géis representativos da detecção de pERK1/2 e ERK 1/2 por *Western blot* em ratos tratados com melatonina (10 mg/kg) ou com veículo (basal). A quantificação da ativação da via ERK1/2 pela melatonina foi avaliada no (A) hipotálamo e (B) BO de ratos. Dados representados como média \pm erro padrão da média. $n=3-4$ ratos. $^*p<0,05$, com relação ao respectivo grupo basal. Teste *t* de Student bicaudal não pareado.

10.7. Imunofluorescência para os receptores MT₁ e MT₂ no BO de ratos

As análises qualitativas e de co-localização por imunofluorescência demonstraram a presença de neurônios imunorreativos para a enzima TH na camada glomerular do BO. As imunomarcações produzidas pelos anticorpos J50 (Figura 23) e A06 (Figura 24), para os receptores MT₁, demonstram existir uma co-localização com a marcação obtida para os neurônios TH-ir.

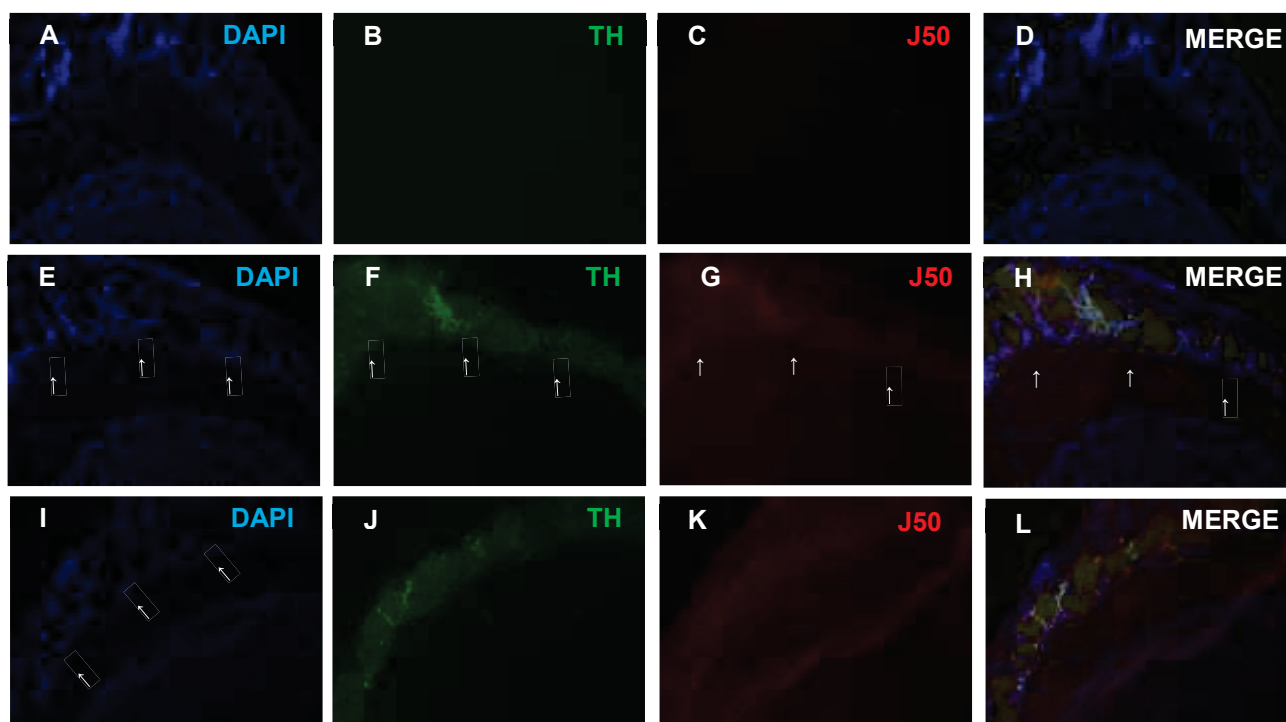


Figura 23. Microscopia de fluorescência demonstrando a imunorreatividade para receptores MT_1 no BO de ratos. As imagens representativas demonstram a (A, E, I) marcação do núcleo, com DAPI, (B) controle negativo para a marcação de TH, (F, J) neurônios que expressam TH, (C) controle negativo para reação com o anticorpo J50, imunorreatividade para receptores MT_1 utilizando o anticorpo J50 (G) 10 $\mu\text{g/ml}$ e (K) 50 $\mu\text{g/ml}$, (D, H, L) sobreposição das imagens (merge). As setas indicam a localização da camada glomerular do BO. TH: tirosina hidroxilase.

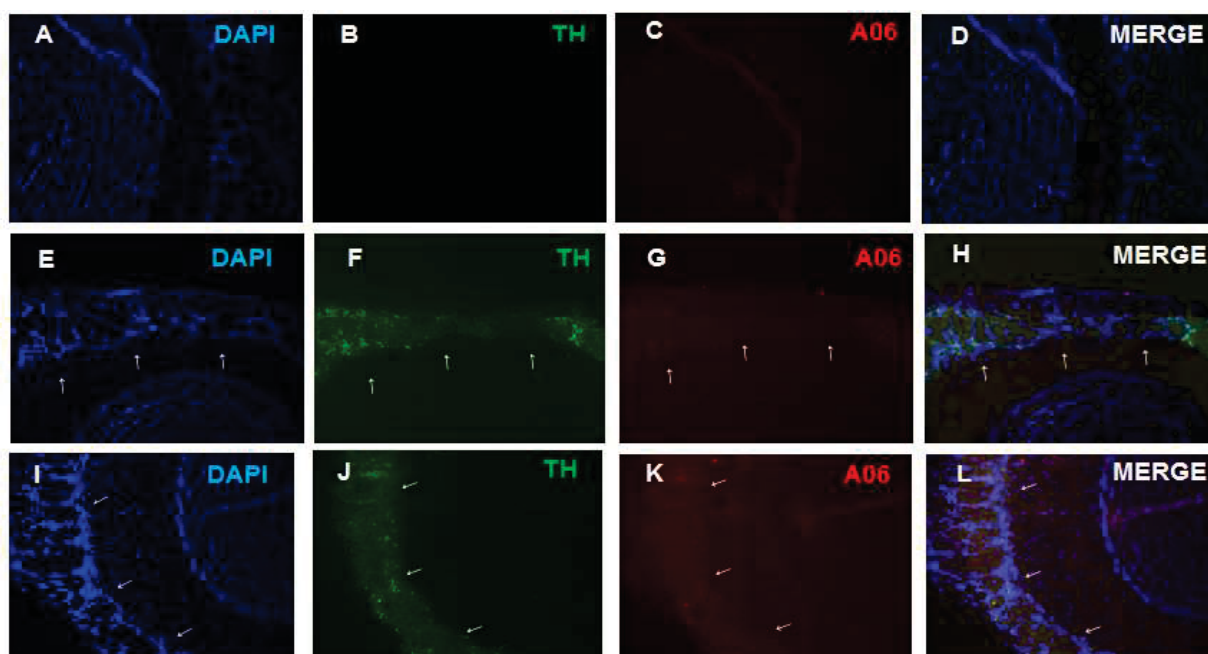


Figura 24. Microscopia de fluorescência demonstrando a imunorreatividade para receptores MT_1 no BO de ratos. As imagens representativas demonstram a (A, E, I) marcação do núcleo, com DAPI, (B) controle negativo para a marcação de TH, (F, J) neurônios que expressam TH, (C) controle negativo para reação com o anticorpo A06, imunorreatividade para receptores MT_1 utilizando o anticorpo A06 (G) 5 $\mu\text{g/ml}$ e (K) 10 $\mu\text{g/ml}$, (D, H, L) sobreposição das imagens (merge). As setas indicam a localização da camada glomerular do BO. TH: tirosina hidroxilase.

Em relação à avaliação da densidade dos receptores MT_2 , foi possível observar a sobreposição da marcação dos neurônios TH-ir com a marcação obtida pelos anticorpos H06 (Figura 25), I81 (Figura 26) e A84 (Figura 27). O anticorpo H06 (anti- MT_2), também produziu intensa imuno-marcação nas camadas mais internas do BO.

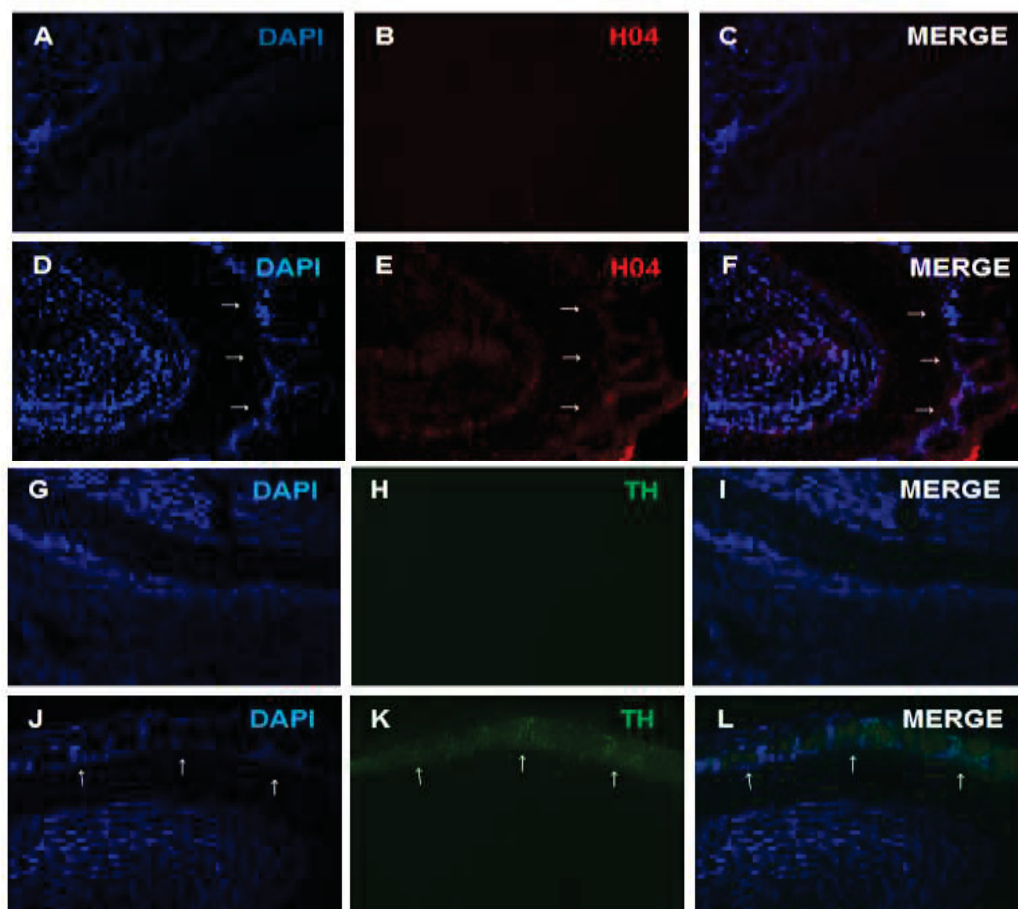


Figura 25. Microscopia de fluorescência demonstrando a imunorreatividade para receptores MT_2 no BO de ratos. (A, D, G, J) marcação do núcleo com DAPI (em azul), (B) controle negativo para a reação com o anticorpo H06, (E) anticorpo H06, 10 $\mu\text{g/ml}$ (em vermelho), (H) controle negativo para a reação com o anticorpo anti-TH, (K) neurônios TH imunorreativos (em verde), (C, F, I, L) sobreposição das imagens (*merge*). As setas indicam a localização da camada glomerular do BO. TH: tirosina hidroxilase.

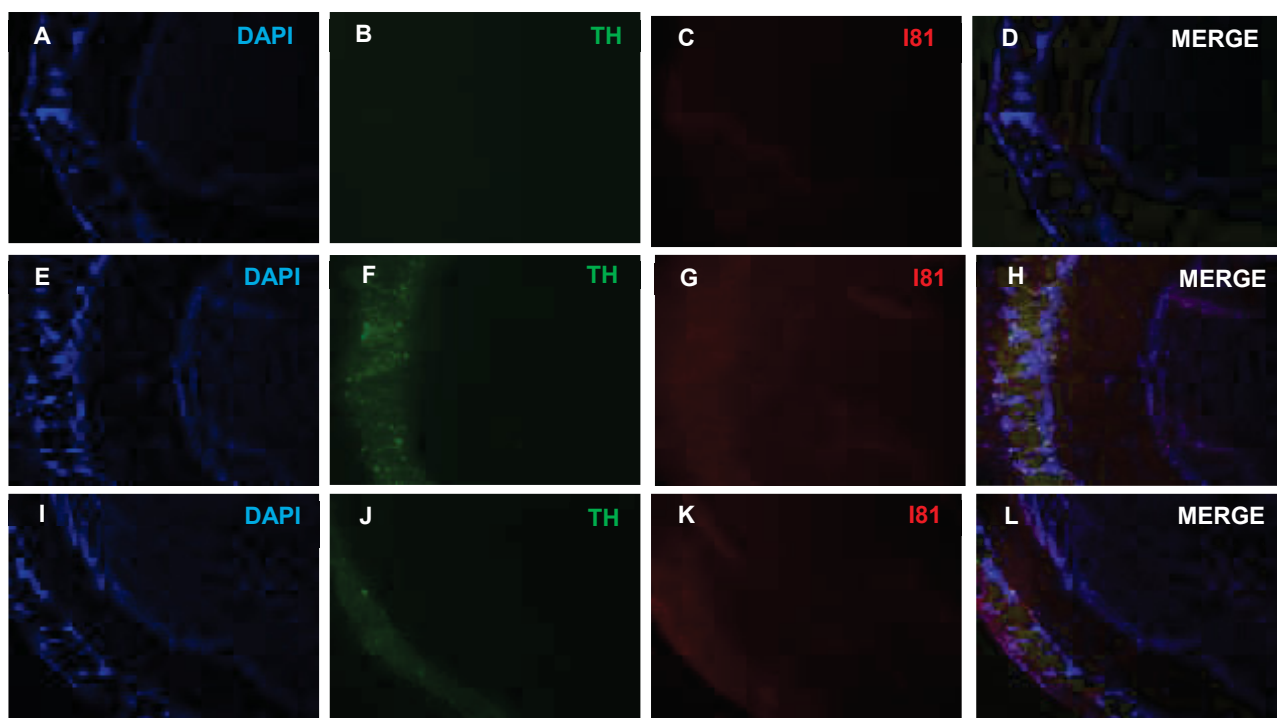


Figura 26. Imunorreatividade para receptores MT_2 no BO. (A, E, I) marcação do núcleo com DAPI (em azul), (B) controle negativo para a reação com o anticorpo anti-TH, (C) controle negativo para a reação com o anticorpo I81, (F, J) neurônios TH imunorreativos (em verde), anticorpo I81 (G) 10 $\mu\text{g/ml}$ e (K) 50 $\mu\text{g/ml}$ (em vermelho), (D, H, L) sobreposição das imagens (*merge*). As setas indicam a localização da camada glomerular do BO. TH: tirosina hidroxilase.

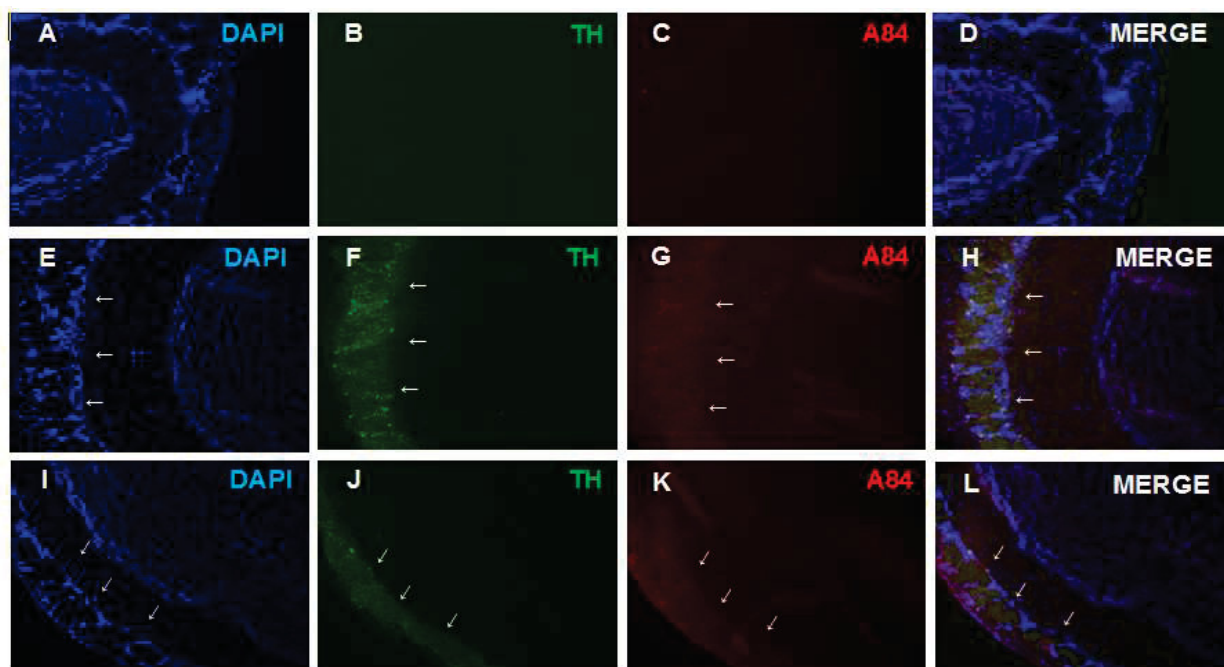


Figura 27. Imunorreatividade para receptores MT_2 no BO. (A, E, I) marcação do núcleo com DAPI (em azul), (B) controle negativo para a reação com o anticorpo anti-TH, (C) controle negativo para a reação com o anticorpo A84, (F, J) neurônios TH imunorreativos (em verde), anticorpo A84 (G) 10 $\mu\text{g/ml}$ e (K) 50 $\mu\text{g/ml}$ (em vermelho), (D, H, L) sobreposição das imagens (*merge*). As setas indicam a localização da camada glomerular do BO. TH: tirosina hidroxilase.

11. DISCUSSÃO

A etapa inicial do Experimento 1 foi avaliar o envolvimento da modulação dos receptores melatonérgicos presentes no BO de ratos no comportamento tipo-depressivo, 7 e 14 dias após a lesão com 6-OHDA na SNpc.

O modelo de DP induzido pela neurotoxina 6-OHDA induziu ao comportamento tipo-depressivo 7 dias após a lesão, demonstrado pelo teste de natação forçada modificado (Figura 10A, 10B). Esse efeito permaneceu mesmo após 14 dias após a lesão (Figuras 10C, 10D). Como demonstrado na literatura, em apenas 7 dias a 6-OHDA induz ao comportamento tipo-depressivo, e esse efeito pode ser observado até 23 dias após uma única exposição a essa neurotoxina (Santiago et al., 2010). Em contrapartida, no modelo de DP pela neurotoxina rotenona o comportamento tipo-depressivo é observado apenas: a) 23 dias após a lesão intranigral (Santiago et al., 2010); ou b) pela administração prolongada e sistêmica (Bassani et al., 2014). Dessa forma, para a avaliação do comportamento tipo-depressivo na DP, o modelo induzido pela 6-OHDA está bem estabelecido na literatura e apresenta vantagens em relação a outras neurotoxinas. Estudos demonstraram que o comportamento tipo-depressivo induzido pela 6-OHDA ocorre pela redução de neurotransmissores (dopamina, serotonina e noradrenalina) em estruturas envolvidas na depressão, tais como a SNpc, estriado, córtex pré-frontal e hipocampo (Kamińska, Lenda, Konieczny, Czarnecka, & Lorenc-Koci, 2017; Santiago et al., 2014; Tadaiesky et al., 2008).

Diversos estudos demonstram uma relação entre o sistema olfatório e a ocorrência de depressão, como no modelo de bulbectomia (pela retirada cirúrgica do BO de roedores) (Maturana et al., 2014; van Riezen, Schnieden, & Wren, 1976), bem como em pacientes com rinite alérgica ou hiposmia (Bedolla-Barajas et al., 2017; Deems et al., 1991). Os distúrbios olfatórios (Ansari & Johnson, 1975) e depressivos (Mayeux, Stern, Rosen, & Leventhal, 1981) também estão associados à DP. Em relação à associação entre depressão e DP, é sugerido o envolvimento do sistema melatonérgico na depressão associada à DP. De fato, tanto a melatonina quanto alguns de seus análogos sintéticos apresentam efeitos antidepressivos na DP (Avila et al., 2015; Bassani

et al., 2014; Nosedá et al., 2014). Com a descrição de genes *MTNR1A* e *MTNR1B*, e receptores MT_1 e MT_2 , expressos no BO, foi questionado o possível envolvimento desses receptores com a função olfatória e comportamento tipo-depressivo em um modelo de DP. Desta forma, o estudo aqui apresentado se configura como sendo absolutamente inédito e inovador no que tange a investigação de um possível envolvimento dos receptores de melatonina nesses distúrbios não motores da DP.

Nos grupos lesionados com a 6-OHDA, a melatonina reverteu o efeito tipo-depressivo induzido por essa neurotoxina. Esse efeito da melatonina no BO foi observado em animais tanto no grupo lesionados há sete dias, quanto nos que tinham recebido a infusão intranigral de 6-OHDA há 14 dias (Figura 10C). O efeito tipo-antidepressivo da melatonina é descrito em diferentes modelos de depressão, como no modelo de estresse crônico moderado, pela administração crônica de dexametasona e no modelo de neuroinflamação mediado pelo lipopolissacarídeo (LPS) (Detanico et al., 2009; Ruksee, Tongjaroenbuangam, Mahanam, & Govitrapong, 2014; Taniguti et al., 2018). No contexto da DP, a melatonina induziu ao efeito tipo-antidepressivo modelo animal induzido pela rotenona (Bassani et al., 2014). Estudos têm demonstrado que os possíveis mecanismos pelos quais a melatonina induz ao efeito antidepressivo são extremamente diversos, como: a) interação com o sistema dopaminérgico (Binfaré, Mantovani, Budni, Santos, & Rodrigues, 2010); b) interação com o sistema serotoninérgico (Micale, Arezzi, Rampello, & Drago, 2006); c) envolvimento com a via L-arginina óxido nítrico e dos receptores N-metil-D-aspartato, NMDA (Mantovani, Pértile, Calixto, Santos, & Rodrigues, 2003); d) aumento da neurogênese hipocampal (Ramírez-Rodríguez et al., 2014; Ruksee et al., 2014) e níveis de BDNF (Imbesi, Uz, & Manev, 2008); e) inibição do sistema ceramida/ácido esfingomielinase (Hoehn et al., 2016); f) regulação da MAO-A (Stefanovic et al., 2016) e g) bloqueio de receptores de melatonina MT_2 (Sumaya, Masana, & Dubocovich, 2005).

A infusão de luzindole no BO em ratos sham (Figura 11) apresentou efeito tipo-antidepressivo, no entanto, só reverteu o comportamento tipo-depressivo induzido pela 6-OHDA no grupo de 7 dias, enquanto que nos

animais lesionados de 14 dias, o luzindole, não apresentou efeito. O luzindole é um antagonista competitivo de receptores MT_1 e MT_2 , e apresenta alta seletividade para os receptores de melatonina, uma vez que não interage com receptores α - e β -adrenérgicos, $5-HT_1$, $5-HT_2$, muscarínicos, adenosinérgicos, histaminérgicos e benzodiazepínicos (M. Dubocovich, Mogilnicka, & Areso, 1990; Margarita L Dubocovich, 1987). A redução do comportamento tipo-depressivo pelo luzindole é consistente com relatos prévios em camundongos da linhagem C3H/HeN (M. Dubocovich et al., 1990). Em contraste ao demonstrado por estudos que utilizaram camundongos C3H/HeN, em outras linhagens como a C57B/6 e ND/4, o luzindole não reduz a imobilidade (Adamah-Biassi, Hudson, & Dubocovich, 2014; M. Dubocovich et al., 1990). É importante ressaltar que mesmo com diferenças metodológicas entre os estudos, até o momento, não havia relatos na literatura do efeito tipo-antidepressivo do luzindole: a) mediante administração local no BO, b) em ratos e c) em modelo de DP.

Apesar de ser sugerido o envolvimento dos receptores MT_2 no efeito tipo-antidepressivo da melatonina, e de alguns de seus análogos sintéticos (Liu, Clough, & Dubocovich, 2017; Sumaya et al., 2005), não existem estudos avaliando esse papel dos receptores MT_2 em estruturas específicas, como no BO. Portanto, no presente estudo, foi verificado o efeito no comportamento tipo-depressivo pela modulação seletiva dos receptores MT_2 , expressos na camada gIBO, por um agonista MT_2 (I1K7) ou um agonista parcial MT_2 (4-P-PDOT). Nesse sentido, a administração do I1K7 no BO de ratos sham, aos 7 dias, resultou em efeito tipo-depressivo (Figura 13A). Uma nota de observação se faz necessária nesse momento, o efeito aqui descrito, induzido pelo I1K7 no BO, só está demonstrado aos 7 dias pós lesão, uma vez que devido a descontinuidade de produção dessa droga pelo seu único fabricante (Sigma-Aldrich), não foi possível darmos continuidade aos experimentos no tempo de 14 dias.

Corroborando com um trabalho anterior de nosso grupo que demonstrou o efeito tipo-antidepressivo do 4-P-PDOT (Noseda et al., 2014), a infusão de 4-P-PDOT, no BO, foi capaz de reverter o efeito tipo-depressivo induzido pela 6-

OHDA aos 7 (Figura 13A, 13B) e 14 dias (Figura 13C,13D). Porém, em animais sham o 4-P-PDOT resultou em efeito tipo-depressivo em ratos sham aos 7 dias (Figura 13A), enquanto que aos 14 dias não alterou esse comportamento (Figura 13C).

Em células expressando receptores melatonérgicos humanos, ensaios de *binding* de competição utilizando os radioligantes 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina ou ³H]-melatonina demonstram alta afinidade do 4-P-PDOT pelos receptores MT₂, em comparação com os receptores MT₁. Dubocovich et al (1997) demonstraram que o 4-P-PDOT apresenta 300 vezes maior afinidade por receptores MT₂, em relação ao MT₁, em células COS-7, enquanto que em células NIH3T3 e CHO (*Chinese hamster ovary cells*) a afinidade desse composto é, respectivamente, 22 000 e 61 vezes maior para MT₂ em comparação aos receptores MT₁ (Browning, Beresford, Fraser, & Giles, 2000; Nonno et al., 1999). O 4-P-PDOT foi descrito inicialmente como um antagonista altamente seletivo para receptores MT₂, pois inibiu o bloqueio da liberação de dopamina na retina de coelhos (Margarita L. Dubocovich et al., 1997) e a mudança de fase no NSQ (Margarita L Dubocovich, Yun, Al-ghoul, Benloucif, & Masana, 1998), sendo ambos efeitos induzidos pela melatonina. Entretanto, estudos utilizando tecidos (Lotufo, Lopes, Dubocovich, Farsky, & Markus, 2001) e cultura de células (Browning et al., 2000; Nonno et al., 1999) demonstraram que o 4-P-PDOT apresenta atividade de agonista parcial. No trabalho de Lotufo e colaboradores (2001) a melatonina e o 4-P-PDOT bloquearam o rolamento leucocitário na microcirculação de ratos. Esse efeito de agonista do 4-P-PDOT foi bloqueado pela administração prévia do luzindole. Nonno e colaboradores (1999) demonstraram aumento da ligação de [³⁵S]-GTPγS às membranas tratadas com 4-P-PDOT, semelhante a agonistas como a melatonina e iodomelatonina, enquanto que o antagonista luzindole aumentou a ligação em comparação ao basal. Semelhante a melatonina, o 4-P-PDOT apresentou efeito agonista ao inibir a produção de AMP cíclico (AMPC) de forma concentração-dependente (Browning et al., 2000). Entretanto, o 4-P-PDOT foi considerado um agonista parcial, apresentando baixa atividade intrínseca (AI=0,37), em comparação a melatonina (AI=1) (Nonno et al., 1999). No presente trabalho, o 4-P-PDOT foi

escolhido inicialmente para ser utilizado como uma antagonista, porém, como relatado por outros estudos, observamos efeito de agonista desse análogo melatonérgico. Desta forma, podemos sugerir que o efeito tipo-antidepressivo do 4-P-PDOT no modelo de DP ocorre pela ativação parcial dos receptores MT_2 do BO de ratos, uma vez que esse efeito foi semelhante ao da melatonina.

O envolvimento de receptores MT_2 de melatonina no comportamento tipo-depressivo é sugerido por diversos trabalhos. Foi observado que camundongos nocaute para os receptores MT_2 apresentam maior comportamento anedônico, no teste de preferência a sacarose, comparado a animais selvagem e nocaute para MT_1 (Liu et al., 2017). No estudo de Sumaya e colaboradores (2005), foi evidenciado que o efeito tipo-antidepressivo do luzindole é dependente do bloqueio dos receptores MT_2 da melatonina, uma vez que animais nocaute para esses receptores não apresentavam redução na imobilidade em resposta ao luzindole. Dentro do contexto de DP, a administração estriatal de 4-P-PDOT reduziu o comportamento tipo-depressivo em um modelo de DP induzido pela neurotoxina rotenona (Noseda et al., 2014). Por outro lado, assim como observamos no presente trabalho com o IIK7 no BO, a administração estriatal de um agonista MT_2 , 8-M-PDOT, não alterou o comportamento tipo-depressivo no modelo de DP induzido por rotenona. Desta forma, os resultados do presente trabalho, assim como de estudos anteriores (Noseda et al., 2014), demonstram o envolvimento dos receptores MT_2 no efeito tipo-antidepressivo na DP. Esse efeito pode ser observado independente do modelo de DP utilizado, rotenona ou 6-OHDA, assim como do local de administração do antagonista, estriado ou BO.

Aos 7 dias, a comparação entre o 4-P-PDOT e o luzindole demonstrou que o efeito tipo-antidepressivo do luzindole foi superior ao 4-P-PDOT em animais sham e lesionados (Figuras 14A, 14B). Em oposição a esses dados, aos 14 dias (Figuras 14C, 14D) o 4-P-PDOT foi mais eficaz que o luzindole em reduzir o comportamento de imobilidade dos animais.

O presente trabalho demonstrou que a administração no BO de agonistas (melatonina e 4-P-PDOT) e o antagonista não seletivo (luzindole), reduzem o comportamento tipo-depressivo. Esses dados, assim como outros já

presentes na literatura (Bassani et al., 2014; M. Dubocovich et al., 1990; Sumaya et al., 2005), levantam a questão de como a melatonina, um agonista endógeno, apresenta o mesmo efeito que antagonistas em relação ao comportamento tipo-depressivo. Apesar, de não estar estabelecido por qual mecanismo o bloqueio dos receptores MT_2 resulta em efeito tipo-antidepressivo, foi proposto que o efeito tipo-antidepressivo dos antagonistas melatonérgicos se deva pelo bloqueio da ligação da melatonina endógena aos seus receptores (M. Dubocovich et al., 1990). Essa hipótese se baseia na ausência de efeito tipo-antidepressivo pela administração sistêmica, e aguda, de melatonina em camundongos, sendo que o luzindole reduziu a imobilidade desses animais. De fato, esses resultados corroboram com efeito antidepressivo em pacientes Parkinsonianos durante a terapia de exposição à luz, que atua inibindo a melatonina endógena (Paus et al., 2007; Rutten et al., 2016). Entretanto, no presente trabalho, a administração aguda de melatonina no BO apresentou efeito tipo-antidepressivo em animais sham e 6-OHDA (aos 7 e 14 dias). Uma explicação plausível para esse efeito recai sobre a internalização dos receptores de melatonina. A exposição à melatonina reduziu a ligação de 2-[125 I]-iodomelatonina aos receptores, bem como diminuiu a densidade de receptores MT_2 , mas não MT_1 , na superfície das células, resultando no aumento de receptores MT_2 em seu interior (Gerdin, Masana, Rivera-Bermudez, et al., 2004). Nesse estudo de Gerdin et al. (2004), a internalização foi observada expondo as células a concentrações fisiológicas de melatonina (30 pM) ou supra-fisiológicas (10 nM) por longos períodos de tempo (480 min), mas a exposição por apenas 10 min à concentração supra-fisiológica já foi capaz de reduzir presença de receptores MT_2 na superfície celular. Ademais, foi demonstrado que a internalização de receptores MT_2 de melatonina, assim como outros GPCRs, ocorre pela fosforilação do terminal-C por GPCRs kinases que resulta no recrutamento de proteínas chamadas β -arrestinas, que se ligam ao terminal fosforilado do receptor, e subsequente internalização dos receptores em endossomos, assim o receptor não está mais disponível na membrana plasmática (Jockers et al., 2008;

Maurice, Kamal, & Jockers, 2011; Sethi, Adams, Pollock, & Witt-Enderby, 2008).

Desta forma, é possível propor que o efeito tipo-antidepressivo observado ocorra pela internalização dos receptores MT₂ do BO após a administração de melatonina, bem como do agonista parcial 4-P-PDOT (Gerdin, Masana, Ren, Miller, & Dubocovich, 2003). Outra evidência que suporta essa hipótese é o fato da concentração de melatonina utilizada no presente trabalho (1 µg/µl) corresponder a uma dose suprafisiológica (4,30 mM ou 4300 nM) do hormônio, inclusive sendo superior a concentração considerada suprafisiológica (10 nM) no estudo de Gerdin e colaboradores (2004).

Em relação ao luzindole, um estudo demonstrou a internalização de MT₁ em células CHO expressando receptores humanos MT₁ expostas a 1 µM luzindole (Bondi et al., 2008), enquanto que concentrações superiores a 10 µM de luzindole reduziram a ligação a 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina em células expressando MT₂ (Gerdin, Masana, & Dubocovich, 2004). Assim, na concentração utilizada no presente trabalho (17 mM) é possível que o luzindole induza o comportamento tipo-antidepressivo aos 7 dias pela internalização de receptores MT₁ e MT₂. Entretanto, a internalização de receptores melatonérgicos frente a esse antagonista só foi relatada em sistemas transfectados, e não em modelos *in vivo*. Ademais, não foi observado efeito tipo-antidepressivo do luzindole em animais 6-OHDA aos 14 dias. Essa ausência de efeito tipo-antidepressivo também pode ser observada no grupo 6-OHDA luzindole + melatonina aos 14 dias, demonstrando que a infusão de melatonina não altera o efeito do luzindole. Assim, tanto a administração sequencial de luzindole + melatonina, quanto apenas o luzindole, ambos aos 14 dias, não replicaram o efeito tipo-antidepressivo observados em 7 dias. Esses resultados sugerem um possível envolvimento da melatonina endógena durante os estágios iniciais da DP que poderia estar induzindo o efeito tipo-antidepressivo. Em condições basais, a melatonina é sintetizada na microglia, mas sua produção é aumentada frente a processos inflamatórios, apresentando uma importante função na fagocitose (Adriessa Aparecida dos

Santos, 2015) e na neuroproteção (Pinato et al., 2015). Portanto, é possível que a melatonina sintetizada na micróglia frente ao insulto da 6-OHDA induza o efeito tipo-antidepressivo observado nos grupos luzindole e luzindole + melatonina aos 7 dias. Porém, aos 14 dias devido ao avanço da neurodegeneração a melatonina sintetizada na micróglia não seja suficiente para induzir a um efeito tipo-antidepressivo, assim não sendo observadas alterações no comportamento tipo-depressivo do grupo 6-OHDA luzindole.

Outro fator que pode ter modificado o efeito do luzindole no comportamento tipo-depressivo nos dois tempos testados são alterações na expressão de receptores melatonérgicos. No presente trabalho foi observado o aumento na expressão do RNAm para o receptor MT_1 no grupo 6-OHDA veículo aos 14 dias ($p=0,073$) em comparação respectivo grupo aos 7 dias (Tabela 4). De forma semelhante, Kang e colaboradores (2016) relataram o aumento na expressão de *MTNR1A* no mesencéfalo ventral de ratos, 8 semanas após a lesão com 6-OHDA. Deste modo, é possível sugerir que o aumento de MT_1 em estágios avançados da DP no modelo de 6-OHDA e altere o efeito tipo-antidepressivo de drogas, como do luzindole.

A administração sequencial de 4-P-PDOT + melatonina em animais 6-OHDA resultou em um efeito tipo-antidepressivo superior em comparação à melatonina ou 4-P-PDOT isolados, sugerindo um efeito aditivo das duas drogas melatonérgicas. Efeitos aditivos de antidepressivos também foram relatados pela administração combinada e sistêmica de melatonina e imipramina em camundongos (Ergün, Orhan, & Karaaslan, 2008). Em humanos, a buspirona (ansiolítico, agonista parcial de receptores $5-HT_{1a}$ e D_2) associada à melatonina apresentou efeito antidepressivo superior ao da monoterapia com buspirona (Fava et al., 2012). A indução ao comportamento tipo-antidepressivo pela administração de 4-P-PDOT + melatonina permaneceu aos 14 dias, porém o não demonstrou o efeito aditivo observado aos 7 dias, podendo estar relacionado com o avanço da neurodegeneração induzida pela 6-OHDA.

O terceiro parâmetro avaliado no teste de natação forçada modificado foi à frequência de escalada (Figura 17). Os grupos sham melatonina aos 7 (Figura 17A) e 14 dias (Figura 17B) apresentaram maior frequência de

escalada comparado aos outros grupos sham. (Detke & Lucki, 1995; Detke et al., 1995). O comportamento de escalada está relacionado a drogas que atuam no sistema noradrenérgico.

O presente trabalho também avaliou o envolvimento dos receptores de melatonina na função olfatória no modelo de DP induzido pela 6-OHDA, 7 (Experimentos 2A, 2C) e 14 dias (Experimentos 2B, 2D) após a lesão. A tarefa de discriminação olfatória utilizada para avaliar o prejuízo olfatório induzido pela neurotoxina foi padronizado por Prediger et al. (2006), e baseia-se nas observações de Carr e colaboradores (1976) da preferência de ratos machos pelo próprio odor em comparação com a ausência de odor.

Os animais sham, em 7 (Figura 18A) e 14 dias (Figura 18C), exibiram a função olfatória intacta, observado pela discriminação entre os compartimentos (odor familiar x odor não familiar). Como esperado, os grupos Zicam e 6-OHDA em 7 dias (Figura 18B) não discriminaram os compartimentos com o odor familiar e odor não familiar. Apesar de ambos os grupos resultarem em prejuízos olfatórios os mecanismos pelos quais o Zicam e a 6-OHDA atuam são distintos. A administração intranasal de Zicam resulta em necrose do epitélio olfatório e degeneração dos receptores sensoriais olfativos (Lim et al., 2009). Por outro lado, a 6-OHDA intranigral além de induzir a neurodegeneração nigroestriatal, lesiona a via nigro-olfatória (Höglinger et al., 2015). A via nigro-olfatória projeta neurônios dopaminérgicos da SNpc para as camadas internas do BO, como a camada plexiforme externa, camada mitral e camada granular, assim, a neurodegeneração da SNpc também resulta na redução de neurônios dopaminérgicos no BO. Uma suposta resposta compensatória a redução de projeções da SNpc seria o aumento no número de interneurônios dopaminérgicos na camada glomerular, e foi sugerido estar relacionado com a disfunção olfatória em pacientes com DP (Mundiñano et al., 2011), assim como um modelo de Parkinsonismo induzido pela rotenona (Rodrigues et al., 2014). Porém, no modelo de DP induzido pela 6-OHDA já foi demonstrado que o prejuízo olfatório não está meramente relacionado a alterações na densidade de neurônios TH-ir na camada glomerular do BO (Höglinger et al., 2015; Ilkiw et al., 2018).

A descrição da via nigro-olfatória, permitiu o melhor entendimento da interação entre essas duas estruturas e o início do distúrbio olfatório na DP, pois foi observada a relação entre uma lesão no BO e a posterior degeneração da SNpc, corroborando com a hipótese de Hawkes, Shephard e Daniel (1999), de que a DP tem início no BO. Adicionalmente, o estagiamento topográfico (estágios 1-5) proposto por Braak e colaboradores, demonstrou a presença de agregados de alfa-sinucleína, inicialmente no BO (estágio 1), enquanto que na SNpc foi observado em fases mais avançadas da DP (estágio 3). Posteriormente, e confirmando a hipótese de Braak et al., foi demonstrada a propagação de agregados de alfa-sinucleína pelo encéfalo a partir do BO, esse feito foi evidenciado após a injeção da proteína no BO de camundongos e a posterior presença desses agregados proteicos em diversas estruturas encefálicas (Rey, Petit, Bousset, Melki, & Brundin, 2013).

Contrastando com os resultados observados em 7 dias, os animais 6-OHDA aos 14 dias (Figura 18D) permaneceram um maior período no compartimento com odor familiar, sugerindo que o prejuízo olfatório induzido 6-OHDA presente em 7 dias foi revertido após 14 dias da lesão. Apesar desse resultado já ter sido demonstrado na literatura (Ilkiw et al., 2018; Tadaiesky et al., 2008), o mecanismo pelo qual induz o retorno da função olfatória após a lesão com 6-OHDA ainda não é conhecido. Entretanto, Ilkiw e colaboradores (2018) demonstraram que a restauração da função olfatória, 14 dias após infusão intranigral de 6-OHDA, não é dependente do aumento no número de neurônios TH-ir glomerulares. Entretanto, os autores sugerem a presença de um mecanismo compensatório do sistema olfatório, em particular, pelo aumento da neurogênese, com a migração de neuroblastos provenientes da zona subventricular que chegam ao BO pela via rostral migratória (Brann & Firestein, 2014). A diferenciação dessas células em interneurônios dopaminérgicos e GABAérgicos ocorre nas camadas glomerular e granular do BO em aproximadamente 7 dias (Lazarini et al., 2014). Portanto, como sugerido por Ilkiw e colaboradores (2018), é plausível propor que o retorno da função olfatória observado no grupo 6-OHDA aos 14 dias ocorra pela restauração da lesão da via nigro-olfatória.

Em relação à modulação dos receptores e a função olfatória, a administração de melatonina no BO de ratos lesionados, aos 7 dias, reverteu o prejuízo olfatório induzido pela neurotoxina (Figura 18B). Já aos 14 dias, o grupo sham melatonina exibiu prejuízo olfatório ($p=0,1583$; Figura 18C), mas os animais 6-OHDA melatonina, aos 14 dias, apresentaram a função olfatória normal (Figura 18D).

Avaliando a função olfatória frente à infusão de luzindole ou 4-P-PDOT, ambos não alteraram a discriminação olfatória nos grupos sham (7 e 14 dias). No grupo 6-OHDA, o 4-P-PDOT reverteu o prejuízo olfatório induzido pela 6-OHDA (7 e 14 dias), enquanto que no grupo 6-OHDA luzindole de 7 dias o prejuízo olfatório se manteve presente (Figura 18B). Entretanto, no grupo de 14 dias o luzindole prejudicou a discriminação olfatória dos animais 6-OHDA (Figura 19D).

A infusão de luzindole+melatonina em ratos sham (Figura 19A), resultou em prejuízo olfatório, observado nos grupos de 7 e 14 dias. Em animais 6-OHDA, essa administração sequencial também prejudicou a discriminação olfatória em 14 dias (Figura 19B). Em relação aos grupos sham 4-P-PDOT+melatonina, não foram observadas alterações na olfação desses animais (Figura 19A). Aos 7 dias, a administração de 4-P-PDOT+melatonina reverteu o prejuízo olfatório induzido pela 6-OHDA (Figura 19B), enquanto que nos animais 6-OHDA em 14 dias não houve influência do tratamento na olfação.

Resumidamente, a administração sequencial de luzindole+melatonina prejudicou a olfação dos animais sham (7 e 14 dias) e 6-OHDA (14 dias), além disso não reverteu o prejuízo olfatório presente no grupo 6-OHDA. Em contraste a esse grupo, a infusão de 4-P-PDOT + melatonina não alterou a função olfatória de animais sham (7 e 14 dias), porém no grupo 6-OHDA de 7 dias reverteu o prejuízo olfatório induzido pela neurotoxina.

Diversos trabalhos, pré-clínicos e clínicos, demonstram correlação entre depressão e distúrbios olfatórios, além da função olfatória ser um marcador de sucesso terapêutico durante o tratamento da depressão (Croy & Hummel, 2017). Entretanto, a relação causa-consequência entre a depressão e o

prejuízo olfatório ainda não está bem definida. No entanto, na DP a depressão e a hiposmia parecem ser dois fatores independentes (Hasegawa, Onuma, Nakamura, Kumon, & Horiuchi, 2016). Rossi e colaboradores (2015) demonstraram que pacientes depressivos com DP apresentavam o mesmo prejuízo olfatório que indivíduos Parkinsonianos sem depressão. Diferentemente dos distúrbios olfatórios, alterações na função visual estão relacionadas com a depressão na DP, uma vez que a distinção de cores foi inferior em pacientes depressivos com DP, comparado a indivíduos Parkinsonianos não depressivos (Li et al., 2018). No presente trabalho, os animais 6-OHDA aos 14 dias apresentaram o restabelecimento da função olfatória, porém os distúrbios tipo-depressivos permaneceram nesse grupo. Apesar do trabalho não ter como objetivo relacionar a presença da depressão com os distúrbios olfatórios na DP, esses dados corroboram com os estudos em humanos (Hasegawa et al., 2016; Rossi et al., 2015), assim como em modelos animais de DP (Ilkiw et al., 2018).

O presente trabalho também buscou investigar a expressão dos genes *MTNR1A* e *MTNR1B*, envolvidos na síntese de receptores MT_1 e MT_2 , respectivamente, no BO de ratos, e avaliar se no modelo de 6-OHDA intranigral ocorrem alterações na expressão desses genes. Os resultados não demonstraram diferenças significativas nos grupos 6-OHDA (7 e 14 dias) em relação aos grupos sham, na expressão de genes para MT_1 e MT_2 . A presença de RNAm para MT_1 e MT_2 no BO foi descrita unicamente por Corthell e colaboradores (2014), sem replicação dos dados por outros grupos até o presente momento. Conjuntamente, foi avaliado se o tratamento com drogas melatonérgicas poderia influenciar na expressão de *MTNR1A* e *MTNR1B* no BO. A administração das drogas não modulou a expressão de *MTNR1A* ou *MTNR1B* no BO, exceto no grupo 6-OHDA 4-P-PDOT aos 7 dias que apresentou menor expressão de *MTNR1A* em relação ao grupo sham 4-P-PDOT de 7 dias. A redução da expressão de RNAm para MT_1 não apresentou relação com os resultados comportamentais de depressão e de discriminação olfatória, pois o efeito do 4-P-PDOT nos grupos 6-OHDA e sham foi semelhante. Comparando os dados de 7 e 14 dias, o grupo 6-OHDA

melatonina aos 7 dias que exibiu maior expressão de *MTNR1A* em relação ao grupo 6-OHDA melatonina em 14 dias.

No estudo de Corthell e colaboradores (2014) a expressão de genes relacionados à síntese de receptores de melatonina foi avaliada em diferentes momentos do dia durante 48h. Os autores demonstraram que a expressão de RNAm para MT_1 e MT_2 apresenta flutuações, porém diferentemente do NSQ, não são alterações rítmicas (Waly & Hallworth, 2015). No presente trabalho, entretanto, as amostras utilizadas para o ensaio foram coletadas apenas durante o período claro (10:00-11:00h), o que pode ter influenciado a baixa quantificação em relação ao demonstrado pelo trabalho de Corthell e colaboradores (2014). Deve-se salientar que quantificação de RNAm para MT_2 aos 14 dias foi realizada, porém não foi observada expressão para nenhum dos grupos, inclusive para o sham veículo. Desta forma, a degradação das amostras pode ter influenciado na quantificação de RNAm.

O uso de anticorpos para avaliar a presença ou expressão de receptores de melatonina em ratos e camundongos é um tema ainda em investigação, uma vez que atualmente não há anticorpos comerciais anti- MT_1 e anti- MT_2 específicos para ratos e camundongos, fato este que limita imensamente o emprego de técnicas como *Western blot* e imunohistoquímica/imunofluorescência, como já avaliado e descrito por Corthell e colaboradores (2014). Os anticorpos testados no presente trabalho foram gentilmente disponibilizados pelo Dr. Ralf Jockers (INSERM, Instituto Cochin, Paris, França). Foram utilizados dois anticorpos anti-receptor MT_1 , J50 (Figura 23) e A06 (Figura 24), ambos demonstraram produzir imuno-marcação na camada glomerular no BO de ratos. Em relação presença de receptores MT_2 no BO, foram testados os anticorpos H06, I81 e A84. A imuno-marcação com H06 (Figura 25) demonstrou presença de receptores MT_2 na camada glomerular do BO, bem como em camadas mais internas do BO, enquanto que com os anticorpos A84 (Figura 26) e I81 (Figura 27) a marcação esteve mais presente na camada glomerular do BO. No trabalho de Cecon e colaboradores (2018) foi avaliada a reatividade desses anticorpos em células HEK23T expressando receptores MT_1 ou MT_2 de camundongo, rato ou humano. Os

autores demonstraram, por imunofluorescência, que os anticorpos A06 e J50 apresentam reatividade para receptores MT₁ de camundongo e humano, enquanto que os anticorpos A84, H04 e I81 marcam receptores MT₂ de camundongo e apenas A84 e I81 MT₂ humano. Para as células expressando MT₁ ou MT₂ de rato nenhum anticorpo apresentou reatividade. Cecon et al. (2018) também demonstraram marcação para os receptores de melatonina na retina, NSQ e pineal, porém apenas de camundongos uma vez que o uso de modelos nocaute é essencial na validação de anticorpos. Embora Cecon et al. (2018) não relataram reatividade dos anticorpos utilizados frente aos receptores de melatonina de rato, no presente trabalho os anticorpos foram testados *in vivo*, podendo assim apresentar diferenças com células transfectadas.

Outra forma de investigar a presença de receptores melatonérgicos é pela ativação de vias de transdução celular, como da ERK1/2. No presente trabalho, a administração de melatonina (10 mg/kg) ativou a via ERK1/2 pelo aumento de ERK fosforilada (pERK) no hipotálamo de ratos (Figura 22). Entretanto, no BO a melatonina não aumentou a presença de pERK nessa estrutura. Esses dados podem ser interpretados de duas maneiras: 1) a janela de tempo (30 min) entre a administração intraperitoneal de melatonina e a coleta das estruturas não possibilitou verificar a ativação da via ou 2) a dose de melatonina utilizada não ativou a via. Imbesi et al. demonstraram a redução da fosforilação de ERK1/2 a partir de 10 min após a exposição de 1 nM de melatonina, sendo esse resultado significativo com 30 minutos da administração. Os autores também demonstraram ausência de ativação da via ERK em células de cerebelo quando incubadas com concentrações de melatonina superiores a 10 nM. Portanto, no presente trabalho o tempo entre a administração de melatonina e coleta das estruturas, bem como a dose de melatonina utilizada podem ter interferido na ativação da via ERK no BO de ratos.

O ensaio de ligação ao [³⁵S]GTPγS foi realizado para investigar a presença de receptores de melatonina pela ativação das proteínas G_i e G_q pela iodomelatonina. A iodomelatonina resultou na ativação de G_i e G_q no

hipotálamo de ratos (Figura 21A). O hipotálamo foi utilizado como controle positivo do ensaio, visto que a ativação de G_i e G_q nessa estrutura já está bem estabelecida na literatura (Jockers et al., 2016). Em contra partida, no BO, a iodomelatonina resultou na ativação apenas da proteína G_i (Figura 21B). Esses dados demonstram a presença de receptores de melatonina no BO de ratos, bem como a sua co-localização com neurônios dopaminérgicos (TH-ir), sendo estes tipicamente neurônios periglomerulares. Além disso, também demonstramos, de maneira inédita na literatura, que a ativação desses receptores de melatonina no BO ocorre mediante mecanismo dependente de proteína G_i . Desta forma, é possível confirmar que os resultados comportamentais observados no presente trabalho são decorrentes da modulação de receptores melatonérgicos presentes no BO configurando-os como possíveis alvos terapêuticos para o alívio dos distúrbios de humor e de olfação característicos nas fases iniciais da DP.

12. CONCLUSÕES

Os experimentos para avaliar o envolvimento no comportamento tipo-depressivo dos receptores melatonérgicos da camada glBO mostraram que a modulação pela melatonina, luzindole e 4-P-PDOT reverteram o efeito tipo-depressivo induzido pela 6-OHDA aos 7 dias. A administração sequencial de luzindole + melatonina aos 7 dias reverteu o efeito tipo-depressivo da 6-OHDA, mas aos 14 dias esse efeito foi perdido. Foi observado um efeito tipo-antidepressivo aditivo da administração sequencial de 4-P-PDOT + melatonina aos 7 dias.

Verificou-se também o envolvimento dos receptores de melatonina do BO na função olfatória. Em animais 6-OHDA aos 7 dias as modulações pela melatonina, ILK7, 4-P-DOT e 4-P-PDOT+melatonina reverteram o prejuízo olfatório induzido pela 6-OHDA. Aos 14 dias foi observado o retorno da função olfatória dos animais lesionados, enquanto que as infusões de luzindole e luzindole+melatonina prejudicaram a olfação do grupo 6-OHDA.

A quantificação de RNAm para MT_1 demonstrou aumento na expressão aos 14 dias em relação a 7 dias nos animais 6-OHDA (veículo, melatonina e luzindole), enquanto que a infusão de 4-P-PDOT no grupo 6-OHDA aos 7 dias reduziu a expressão de RNAm para MT_1 .

A presença de receptores melatonérgicos foi confirmada pelo ensaio de [35 S]GTP γ S, evidenciando que a ativação de receptores melatonérgicos expressos no BO atua por proteínas G_i . A imunofluorescência confirmou esses dados, demonstrando a presença de receptores MT_1 e MT_2 na camada glBO.

Desta forma, foram confirmadas a expressão e funcionalidade dos receptores de melatonina da camada glBO, bem como demonstrado o envolvimento desses receptores no comportamento tipo-depressivo e na função olfatória no modelo de DP induzido pela 6-OHDA.

13. REFERÊNCIAS

- Aarsland, D., Pålhagen, S., Ballard, C. G., Ehrt, U., & Svenningsson, P. (2012). Depression in Parkinson disease - Epidemiology, mechanisms and management. *Nature Reviews Neurology*, 8(1), 35–47. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.189>
- Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Monti, M. G., Ortiz, G. G., & Reite, R. J. (1997). MELATONIN IS PROTECTIVE AGAINST MPTP-INDUCED STRIATAL AND HIPPOCAMPAL LESIONS. *Life Sciences*, 60(2), 23–29.
- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., ... Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(16), 2997–3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
- Adamah-Biassi, E. B., Hudson, R. L., & Dubocovich, M. L. (2014). Genetic deletion of MT1 melatonin receptors alters spontaneous behavioral rhythms in male and female C57BL/6 mice. *Hormones and Behavior*, 66(4), 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.08.012>
- Adi, N., Mash, D. C., Ali, Y., Singer, C., Shehadeh, L., & Papapetropoulos, S. (2010). Melatonin MT1 and MT2 receptor expression in Parkinson's disease. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 16(2), BR61-7. <https://doi.org/10.1016/j.math.2012.06.009>
- Adriessa Aparecida dos Santos. (2015). MELATONINA SINTETIZADA POR MICROGLIAS DE CEREBELO EM CULTURA REGULA O PROCESSO DE FAGOCITOSE.
- Alzoubi, K. H., Mokhemer, E., & Abuirmeileh, A. N. (2018). Beneficial effect of etazolate on depression-like behavior and, learning, and memory impairment in a model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 350(May), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.004>
- Amritwar, A. U., Lowry, C. A., Brenner, L. A., Hoisington, A. J., Stiller, J. W., Hamilton, R., & Postolache, T. T. (2017). Mental Health in Allergic Rhinitis: Depression and Suicidal Behavior. *Current Treatment Options in Allergy*, 4(1), 71–97. <https://doi.org/10.1007/s40521-017-0110-z>
- Ansari, K. A., & Johnson, A. (1975). Olfactory Function Parkinson ' S in Patients Disease. *Journal Chron Dis*, 28, 493–497.
- Antón-Tay, F., Díaz, J. L., & Fernández-Guardiola, A. (1971). On the effect of melatonin upon human brain. Its possible therapeutic implications. *Life Sciences*, 10(15 PART 1), 841–850. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(71\)90155-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(71)90155-X)
- Avila, A., Cardona, X., Martin-Baranera, M., Leon, L., Caballol, N., Millet, P., & Bello, J. (2015). Agomelatine for depression in Parkinson disease: Additional effect on sleep and motor dysfunction. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 35(6), 719–723. <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000000404>
- Ayoub, M. A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., & Jockers, R. (2002). Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living

- cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 277(24), 21522–21528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200729200>
- Ayoub, M. A., Delagrangé, P., & Jockers, R. (2004). Preferential Formation of MT 1 / MT 2 Melatonin Receptor Heterodimers with Distinct Ligand Interaction Properties. *Molecular Pharmacology*, 66(2), 312–321. <https://doi.org/10.1124/mol.104.000398.reasonable>
- Baba, K., Benleulmi-Chaachoua, A., Journé, A.-S., Kamal, M., Guillaume, J.-L., Dussaud, S., ... Tosini, G. (2014). Heteromeric MT1 /MT2 Melatonin Receptors Modulate Photoreceptor Function. *Sci Signal*, 6(296), 1–27. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004302.Heteromeric>
- Barbosa, M. T., Caramelli, P., Maia, D. P., Cunningham, M. C. Q., Guerra, H. L., Lima-Costa, M. F., & Cardoso, F. (2006). Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). *Movement Disorders*, 21(6), 800–808. <https://doi.org/10.1002/mds.20806>
- Bartels, A. L., & Leenders, K. L. (2009). Parkinson's disease: The syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex*, 45(8), 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2008.11.010>
- Bassani, T. B., Gradowski, R. W., Zaminelli, T., Barbiero, J. K., Santiago, R. M., Boschen, S. L., ... Vital, M. A. B. F. (2014). Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. *Brain Research*, 1593, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.068>
- Batailler, M., Mullier, A., Sidibe, A., Delagrangé, P., Prévot, V., Jockers, R., & Migaud, M. (2012). Neuroanatomical distribution of the orphan GPR50 receptor in adult sheep and rodent brains. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(5), 798–808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02274.x>
- Bedolla-Barajas, M., Morales-Romero, J., Pulido-Guillén, N. A., Robles-Figueroa, M., & Plascencia-Domínguez, B. R. (2017). Rhinitis as an associated factor for anxiety and depression amongst adults. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 83(4), 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.05.008>
- Belaid, H., Adrien, J., Karachi, C., Hirsch, E. C., & François, C. (2015). Effect of melatonin on sleep disorders in a monkey model of Parkinson's disease. *Sleep Medicine*, 16(10), 1245–1251. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2015.06.018>
- Benleulmi-Chaachoua, A., Hegron, A., Le Boulch, M., Karamitri, A., Wierzbicka, M., Wong, V., ... Jockers, R. (2018). Melatonin receptors limit dopamine reuptake by regulating dopamine transporter cell-surface exposure. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2876-y>
- Betarbet, R., Sherer, T. B., & Timothy Greenamyre, J. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays*, 24(4), 308–318. <https://doi.org/10.1002/bies.10067>
- Binfaré, R. W., Mantovani, M., Budni, J., Santos, A. R. S., & Rodrigues, A. L. S. (2010). Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *European Journal of Pharmacology*, 638(1–3), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.04.011>

- Bondi, C. D., McKeon, R. M., Bennett, J. M., Ignatius, P. F., Brydon, L., Jockers, R., ... Witt-Enderby, P. A. (2008). MT1 melatonin receptor internalization underlies melatonin-induced morphologic changes in Chinese hamster ovary cells and these processes are dependent on Gi proteins, MEK 1/2 and microtubule modulation. *Journal of Pineal Research*, *44*(3), 288–298. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00525.x>
- Bonito-Oliva, A., Masini, D., & Fisone, G. (2014). A mouse model of non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00290>
- Bonnefond, A., Clément, N., Fawcett, K., & Yengo, L. (2013). MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet.*, *44*(3), 297–301. <https://doi.org/10.1038/ng.1053>.Rare
- Bonnet, A. M., & Houeto, J. L. (1999). Pathophysiology of Parkinson ' s disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *53*, 117–121.
- Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, *211*, 51–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
- Bovolenta, T. M., Cesar De Azevedo Silva, S. M., Saba, R. A., Borges, V., Ferraz, H. B., & Felicio, A. C. (2017). Average annual cost of Parkinson's disease in São Paulo, Brazil, with a focus on disease-related motor symptoms. *Clinical Interventions in Aging*, *12*, 2095–2108. <https://doi.org/10.2147/CIA.S151919>
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(2), 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)
- Brann, J. H., & Firestein, S. J. (2014). A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Frontiers in Neuroscience*, *8*(8 JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00182>
- Browning, C., Beresford, I., Fraser, N., & Giles, H. (2000). Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt1 and MT2 receptors. *British Journal of Pharmacology*, *129*, 877–886.
- Brydon, L., Petit, L., Delagrangé, P., Strosberg, A. D., & Jockers, R. (2001). Receptors in Human PAZ6 Adipocytes. *Endocrinology*, *142*(10), 4264–4271.
- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., Coppet, P. de, Tissot, M., Barrett, P., ... Jockers, R. (1999). Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol*, *13*(12), 2025–2038. <https://doi.org/10.1210/mend.13.12.0390>
- Capitelli, C., Sereniki, A., Lima, M. M. S., Reksidler, A. B., Tufik, S., & Vital, M. A. B. F. (2008). Melatonin attenuates tyrosine hydroxylase loss and hypolocomotion in MPTP-lesioned rats. *European Journal of Pharmacology*, *594*(1–3), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.07.022>
- Cardinal, D. P., & Pevet, P. (1998). Basic aspects of melatonin action, *2*(3), 175–190.
- Cardinali, D. P., & Rosner, J. M. (1971). Retinal localization of the

- hydroxyindole-o-methyl transferase (hiomt) in the rat. *Endocrinology*, 89(1), 301–303. <https://doi.org/10.1210/endo-89-1-301>
- Carpentieri, A., Díaz De Barboza, G., Areco, V., Peralta López, M., & Tolosa De Talamoni, N. (2012). New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research*, 65(4), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.01.003>
- Carr, W. J., Yee, L., Gable, D., & Marasco, E. (1976). Ournal of comparative and. *Psychology*, 90(9).
- Carvalho, M. M., Campos, F. L., Coimbra, B., Pêgo, J. M., Rodrigues, C., Lima, R., ... Salgado, A. J. (2013). Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 12–14. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-14>
- Cecon, E., Ivanova, A., Luka, M., Gbahou, F., Friederich, A., Guillaume, J.-L., ... Jockers, R. (2018). Detection of recombinant and endogenous mouse melatonin receptors by monoclonal antibodies targeting the C-terminal domain. *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1111/jpi.12540>
- Chaste, P., Clement, N., Botros, H. G., Guillaume, J. L., Konyukh, M., Pagan, C., ... Bourgeron, T. (2011). Genetic variations of the melatonin pathway in patients with attention-deficit and hyperactivity disorders. *Journal of Pineal Research*, 51(4), 394–399. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00902.x>
- Chaste, P., Clement, N., Mercati, O., Guillaume, J. L., Delorme, R., Botros, H. G., ... Bourgeron, T. (2010). Identification of pathway-biased and deleterious melatonin receptor mutants in autism spectrum disorders and in the general population. *PLoS ONE*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011495>
- Chaudhuri, K. R., Odin, P., Antonini, A., & Martinez-Martin, P. (2011). Parkinson's disease: The non-motor issues. *Parkinsonism and Related Disorders*, 17(10), 717–723. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.02.018>
- Chen, D., & Dalton, P. (2005). The effect of emotion and personality on olfactory perception. *Chemical Senses*, 30(4), 345–351. <https://doi.org/10.1093/chemse/bji029>
- Chen, S., Tan, H. Y., Wu, Z. H., Sun, C. P., He, J. X., Li, X. C., & Shao, M. (2014). Imaging of olfactory bulb and gray matter volumes in brain areas associated with olfactory function in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *European Journal of Radiology*, 83(3), 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2013.11.024>
- Corthell, J. T., Olcese, J., & Trombley, P. Q. (2014). Melatonin in the mammalian olfactory bulb. *Neuroscience*, 261, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.12.033>
- Cramer, C. K., Friedman, J. H., & Amick, M. M. (2010). Olfaction and apathy in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 16(2), 124–126. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.09.004>
- Croy, I., Bojanowski, V., & Hummel, T. (2013). Men without a sense of smell exhibit a strongly reduced number of sexual relationships, women exhibit reduced partnership security - A reanalysis of previously published data. *Biological Psychology*, 92(2), 292–294.

- <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2012.11.008>
- Croy, I., & Hummel, T. (2017). Olfaction as a marker for depression. *Journal of Neurology*, 264(4), 631–638. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8227-8>
- Croy, I., Negoias, S., Novakova, L., Landis, B. N., & Hummel, T. (2012). Learning about the functions of the olfactory system from people without a sense of smell. *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033365>
- Croy, I., Nordin, S., & Hummel, T. (2014). Olfactory disorders and quality of life—an updated review. *Chemical Senses*, 39(3), 185–194. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjt072>
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4–5), 547–569. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.008>
- De Berardis, D., Fornaro, M., Serroni, N., Olivieri, L., Marini, S., Moschetta, F. S., ... Di Giannantonio, M. (2013). Agomelatine treatment of major depressive disorder in Parkinson's disease: A case series. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 25(4), 343–345. <https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.12110286>
- Deems, D. A., Doty, R. L., Settle, R. G., Moore-Gillon, V., Shaman, P., Mester, A. F., ... Snow, J. B. (1991). Smell and taste disorders, a study of 750 patients from the University of Pennsylvania Smell and Taste Center. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery*, 117(5), 519–528. <https://doi.org/10.1001/archotol.1991.01870170065015>
- Detanico, B. C., Piato, Â. L., Freitas, J. J., Lhullier, F. L., Hidalgo, M. P., Caumo, W., & Elisabetsky, E. (2009). Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *European Journal of Pharmacology*, 607(1–3), 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.02.037>
- Detke, M. J., & Lucki, I. (1995). Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behavioural Brain Research*, 73(1–2), 43–46. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00067-8](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00067-8)
- Detke, M. J., Rickels, M., & Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, 121(1), 66–72. <https://doi.org/10.1007/BF02245592>
- Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., ... Tanner, C. M. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68(5), 384–386. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03>
- Doty, R. L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 8(6), 329–339. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80>
- Doty, R. L., Deems, D. a, & Stellar, S. (1988). Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology*, 38(8), 1237–1244. <https://doi.org/10.1212/WNL.38.8.1237>
- Drew, J. E., Barrett, P., Mercer, J. G., Moar, K. M., Canet, E., Delagrangé, P., &

- Morgan, P. J. (2001). Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *Journal of Neuroendocrinology*, *13*(5), 453–458. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2001.00651.x>
- Dubocovich, M. L. (1987). Luzindole (N-0774): A Novel Melatonin Receptor Antagonist '. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 902–910.
- Dubocovich, M. L., Benloucif, S., & Masana, M. I. (1996). Melatonin receptors in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Behav Brain Res*, *73*(1–2), 141–147.
- Dubocovich, M. L., Delagrangé, P., Krause, D. N., Sugden, D., Cardinali, D. P., & Olcese, J. (2010). Nomenclature , Classification , and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharmacological Reviews*, *62*(3), 343–380. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002832.343>
- Dubocovich, M. L., Masana, M. I., Iacob, S., & Sauri, D. M. (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel(1a) and Mel(1b) recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML(1) presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *355*(3), 365–375. <https://doi.org/10.1007/PL00004956>
- Dubocovich, M. L., Yun, K., Al-ghoul, W. M., Benloucif, S., & Masana, M. I. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *The FASEB Journal*, *12*, 1211–1220.
- Dubocovich, M., Mogilnicka, E., & Areso, P. (1990). Antidepressant-like activity of the melatonin receptor antagonist, luzindole (N-0774), in the mouse behavioral despair test. *European Journal of Pharmacology*, *182*(2), 313–325. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)90290-M](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90290-M)
- Duty, S., & Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson ' s disease : a source of novel treatments and clues to the cause of the. *British Journal of Pharmacology*, *164*(4), 1357–1391. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x>
- Ergün, Y., Orhan, F. Ö., & Karaaslan, M. F. (2008). Combination therapy of imipramine and melatonin: Additive antidepressant effect in mouse forced swimming test. *European Journal of Pharmacology*, *591*(1–3), 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.070>
- Fava, M., Targum, S. D., Nierenberg, A. A., Bleicher, L. S., Carter, T. A., Wedel, P. C., ... Barlow, C. (2012). An exploratory study of combination buspirone and melatonin SR in Major Depressive Disorder (MDD): A possible role for neurogenesis in drug discovery. *Journal of Psychiatric Research*, *46*(12), 1553–1563. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.08.013>
- Fearnley, J. M., & Lees, A. J. (1991). Ageing and Parkinson's Disease : Substantia Nigra Regional Selectivity. *Brain*, *114*, 2283–2301.
- Francardo, V. (2017). Modeling Parkinson's disease and treatment complications in rodents: potentials and pitfalls of the current options. *Behavioural Brain Research*, (2010). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.014>
- Fu, W., Xie, H., Laudon, M., Zhou, S., Tian, S., & You, Y. (2016). Piromelatine ameliorates memory deficits associated with chronic mild stress-induced

- anhedonia in rats. *Psychopharmacology*, 233(12), 2229–2239. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4272-3>
- Georgy, E. (2010). Freezing of gait in Parkinson's disease: impact on falls risk, walking aids utilization, and assistance-seeking behaviour. *European Journal of Adapted Physical Activity*, 3(1), 49–59.
- Gerdin, M., Masana, M., & Dubocovich, M. (2004). Melatonin-mediated regulation of human MT1melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochemical Pharmacology*, 67(11), 2023–2030. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.01.027>
- Gerdin, M., Masana, M., Ren, D., Miller, R., & Dubocovich, M. (2003). Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(3), 931–939. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.044990>
- Gerdin, M., Masana, M., Rivera-Bermudez, M., Hudson, R., Earnest, D., Gillette, M., & Dubocovich, L. M. (2004). Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(14), 1646–1656. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1339com>
- Golan, K., Kumari, A., Kollet, O., Khatib-Massalha, E., Subramaniam, M. D., Ferreira, Z. S., ... Lapidot, T. (2018). Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. *Cell Stem Cell*, 23(4), 572–585.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.08.002>
- Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., ... Olesen, J. (2011). Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, 21(10), 718–779. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.08.008>
- Gutierrez-Valdez, A. L., Anaya-Martínez, V., Ordoñez-Librado, J. L., García-Ruiz, R., Torres-Esquivel, C., Moreno-Rivera, M., ... Avila-Costa, M. R. (2012). Effect of Chronic L-Dopa or Melatonin Treatments after Dopamine Deafferentation in Rats: Dyskinesia, Motor Performance, and Cytological Analysis. *ISRN Neurology*, 2012, 1–16. <https://doi.org/10.5402/2012/360379>
- Hardeland, R., & Poeggeler, B. (2003). Non-vertebrate melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34(4), 233–241. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00040.x>
- Hawkes, C. H., Del Tredici, K., & Braak, H. (2010). A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 16(2), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.08.007>
- Hawkes, C. H., Shephard, B. C., & Daniel, S. E. (1999). Is Parkinson's disease a primary olfactory disorder? *Q J Med*, 92(8), 473–480. <https://doi.org/10.1093/qjmed/92.8.473>
- Ho, A. K., & Chik, C. L. (2010). Modulation of Aanat gene transcription in the rat pineal gland. *Journal of Neurochemistry*, 112(2), 321–331. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06457.x>

- Hoehn, R., Monse, M., Pohl, E., Wranik, S., Wilker, B., Keitsch, S., ... Gulbins, E. (2016). Melatonin acts as an antidepressant by inhibition of the acid sphingomyelinase/ ceramide system. *NeuroSignals*, 24(1), 48–58. <https://doi.org/10.1159/000442611>
- Höglinger, G. U., Alvarez-Fischer, D., Arias-Carrión, O., Djufri, M., Windolph, A., Keber, U., ... Oertel, W. H. (2015). A new dopaminergic nigro-olfactory projection. *Acta Neuropathologica*, 130(3), 333–348. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1451-y>
- Hunt, A. E., Al-ghoul, W. M., Gillette, M. U., Dubocovich, M. L., Amanda, E., Al-ghoul, W. M., ... Dubocovich, M. L. (2001). Activation of MT 2 melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, 110–118.
- Ilkiw, J. L., Kmita, L. C., Targa, A. D. S., Nosedá, A. C. D., Rodrigues, L. S., Dorieux, F. W. C., ... Lima, M. M. S. (2018). Dopaminergic Lesion in the Olfactory Bulb Restores Olfaction and Induces Depressive-Like Behaviors in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1134-5>
- Imbesi, M., Uz, T., & Manev, H. (2008). Role of melatonin receptors in the effects of melatonin on BDNF and neuroprotection in mouse cerebellar neurons. *Journal of Neural Transmission*, 115(11), 1495–1499. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0066-z>
- Ishii, H., Tanaka, N., Kobayashi, M., Kato, M., & Sakuma, Y. (2009). Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors. *The Journal of Physiological Sciences*, 59(1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/s12576-008-0003-9>
- Itoh, M. T., Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Amemiya, A., & Sumi, Y. (1999). Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, 5(5), 402–408. <https://doi.org/10.1093/molehr/5.5.402>
- Jasinska-Myga, B., Putzke, J. D., Wider, C., Wszolek, Z. K., & Uitti, R. J. (2010). Depression in Parkinson's Disease. *Can J Neurol Sci*, 37(1), 61–66.
- Jockers, Maurice, P., Boutin, J. A., & Delagrangé, P. (2008). Melatonin receptors , heterodimerization , signal transduction and binding sites : what ' s new? *British Journal of Pharmacology*, 154, 1182–1195. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.184>
- Jockers, R., Delagrangé, P., Dubocovich, M. L., Markus, R. P., Renault, N., Tosini, G., ... Zlotos, D. P. (2016). Update on Melatonin Receptors. IUPHAR Review Short. *British Journal of Pharmacology*, 173(18), 2702–2725. <https://doi.org/10.1002/BPH.13536>
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(1), 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kamal, M., Gbahou, F., Guillaume, J. L., Daulat, A. M., Benleulmi-Chaachoua, A., Luka, M., ... Jockers, R. (2015). Convergence of melatonin and serotonin (5-HT) signaling at MT₂/5-HT_{2C} receptor heteromers. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11537–11546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.559542>
- Kamińska, K., Lenda, T., Konieczny, J., Czarnecka, A., & Lorenc-Koci, E. (2017). Depressive-like neurochemical and behavioral markers of

- Parkinson's disease after 6-OHDA administered unilaterally to the rat medial forebrain bundle. *Pharmacological Reports*, 69(5), 985–994. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.05.016>
- Kang, N. H., Carriere, C. H., Bahna, S. G., & Niles, L. P. (2016). Altered melatonin MT1 receptor expression in the ventral midbrain following 6-hydroxydopamine lesions in the rat medial forebrain bundle. *Brain Research*, 1652(September), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.09.036>
- Kinker, G. S., Oba-Shinjo, S. M., Carvalho-Sousa, C. E., Muxel, S. M., Marie, S. K. N., Markus, R. P., & Fernandes, P. A. (2016). Melatonergic system-based two-gene index is prognostic in human gliomas. *Journal of Pineal Research*, 60(1), 84–94. <https://doi.org/10.1111/jpi.12293>
- Kupsch, A., Schmidt, W., Gizatullina, Z., Debska-Vielhaber, G., Voges, J., Striggow, F., ... Gellerich, F. N. (2014). 6-Hydroxydopamine impairs mitochondrial function in the rat model of Parkinson's disease: Respirometric, histological, and behavioral analyses. *Journal of Neural Transmission*, 121(10), 1245–1257. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1185-3>
- Lacoste, B., Angeloni, D., Dominguez-Lopez, S., Calderoni, S., Mauro, A., Fraschini, F., ... Gobbi, G. (2015). Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. *Journal of Pineal Research*, 58(4), 397–417. <https://doi.org/10.1111/jpi.12224>
- Lang, A. E., & Loranzo, A. M. (1998). Parkinson's Disease: First of Two Parts. *The New England Journal of Medicine*, 339(15), 1044–1053.
- Lazarini, F., Gabellec, M.-M., Moigneu, C., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., & Lledo, P.-M. (2014). Adult Neurogenesis Restores Dopaminergic Neuronal Loss in the Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, 34(43), 14430–14442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5366-13.2014>
- Leentjens, A. F. G. (2004). Depression in Parkinson's disease: Conceptual issues and clinical challenges. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 17(3), 120–126. <https://doi.org/10.1177/0891988704267456>
- Lerner, A. B., Cash, J. D., Takahashi, Y., & Mori, W. (1957). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes, 934(2), 2907.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J.-L., Couturier, C., Delagrangé, P., & Jockers, R. (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J*, 25(13), 3012–3023. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601193>
- Levoye, A., Jockers, R., Ayoub, M. A., Delagrangé, P., Savaskan, E., & Guillaume, J. L. (2006). Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance? - Focus on melatonin receptors. *Chronobiology International*, 23(1–2), 419–426. <https://doi.org/10.1080/07420520500521863>
- Li, J., Gu, C. Z., Su, J. Bin, Zhu, L. H., Zhou, Y., Huang, H. Y., & Liu, C. F. (2016). Changes in olfactory bulb volume in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 11(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149286>
- Li, Q., Yang, D., Wang, J., Liu, L., Feng, G., Li, J., ... Li, Z. (2015). Reduced amount of olfactory receptor neurons in the rat model of depression.

- Neuroscience Letters*, 603, 48–54.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.07.007>
- Lim, J. H., Davis, G. E., Wang, Z., Li, V., Wu, Y., Rue, T. C., & Storm, D. R. (2009). Zicam-induced damage to mouse and human nasal tissue. *PLoS ONE*, 4(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007647>
- Lima, M. M. S. (2013). Sleep disturbances in Parkinson's disease: The contribution of dopamine in REM sleep regulation. *Sleep Medicine Reviews*, 17(5), 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2012.10.006>
- Lin, C. H., Huang, J. Y., Ching, C. H., & Chuang, J. I. (2008). Melatonin reduces the neuronal loss, downregulation of dopamine transporter, and upregulation of D2 receptor in rotenone-induced parkinsonian rats. *Journal of Pineal Research*, 44(2), 205–213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00510.x>
- Liu, J., Clough, S. J., & Dubocovich, M. L. (2017). Role of the MT1 and MT2 melatonin receptors in mediating depressive- and anxiety-like behaviors in C3H/HeN mice. *Genes, Brain and Behavior*, 16(5), 546–553. <https://doi.org/10.1111/gbb.12369>
- Lotufo, C. M. C., Lopes, C., Dubocovich, M. L., Farsky, S. H. P., & Markus, R. P. (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *European Journal of Pharmacology*, 430(2–3), 351–357. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01369-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01369-3)
- Ma, J., Shaw, V. E., & Mitrofanis, J. (2009). Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice? *Parkinsonism and Related Disorders*, 15(4), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.07.008>
- Mack, J. M., Schamne, M. G., Sampaio, T. B., Piçotile, R. A. N., Fernandes, P. A. C. M., Markus, R. P., & Prediger, R. D. (2016). Melatonergic System in Parkinson's Disease: From Neuroprotection to the Management of Motor and Nonmotor Symptoms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3472032>
- Malnic, B., Godfrey, P. a, & Buck, L. B. (2004). The human olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(8), 2584–2589.
- Mantovani, M., Pértile, R., Calixto, J. B., Santos, A. R. S., & Rodrigues, A. L. S. (2003). Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: Evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neuroscience Letters*, 343(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00306-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00306-9)
- Markus, R. P., Cecon, E., & Pires-Lapa, M. A. (2013). Immune-pineal axis: Nuclear factor κB (NF-κB) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 10979–10997. <https://doi.org/10.3390/ijms140610979>
- Markus, R. P., Fernandes, P. A., Kinker, G. S., da Silveira Cruz-Machado, S., & Marçola, M. (2018). Immune-pineal axis – acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *British Journal of Pharmacology*, 175(16), 3239–3250. <https://doi.org/10.1111/bph.14083>
- Maturana, M. J., Pudell, C., Targa, A. D. S., Rodrigues, L. S., Nosedá, A. C. D., Fortes, M. H., ... Lima, M. M. S. (2014). REM Sleep Deprivation Reverses Neurochemical and Other Depressive-Like Alterations Induced by Olfactory

- Bulbectomy. *Molecular Neurobiology*, 51(1), 349–360. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8721-x>
- Maurice, P., Kamal, M., & Jockers, R. (2011). Asymmetry of GPCR oligomers supports their functional relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(9), 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.05.006>
- Mayeux, R., Stern, Y., Rosen, J., & Leventhal, J. (1981). Depression, intellectual impairment, and Parkinson disease. *Neurology*, 31(6), 645–650. <https://doi.org/10.1212/WNL.32.4.455-a>
- Mazzoni, P., Shabbott, B., & Cortés, J. C. (2012). Motor control abnormalities in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(6), 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009282>
- McDonald, W. M., Richard, I. H., & DeLong, M. R. (2003). Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *Biological Psychiatry*, 54(3), 363–375. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00530-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00530-4)
- Medeiros, C. A. M., Carvalhedo De Bruin, P. F., Lopes, L. A., Magalhães, M. C., De Lourdes Seabra, M., & Sales De Bruin, V. M. (2007). Effect of exogenous melatonin on sleep and motor dysfunction in Parkinson's disease: A randomized, double blind, placebo-controlled study. *Journal of Neurology*, 254(4), 459–464. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-0390-x>
- Micale, V., Arezzi, A., Rampello, L., & Drago, F. (2006). Melatonin affects the immobility time of rats in the forced swim test: The role of serotonin neurotransmission. *European Neuropsychopharmacology*, 16(7), 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2006.01.005>
- Miller, E., Morel, A., Saso, L., & Saluk, J. (2015). Melatonin Redox Activity. Its Potential Clinical Applications in Neurodegenerative Disorders. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(2), 163–169. <https://doi.org/10.2174/1568026615666141209160556>
- Milligan, G. (2003). Principles: extending the utility of [35S]GTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol Sci*, 24(2), 87–90.
- Morgan, W. W., & Nelson, J. F. (2001). Chronic administration of pharmacological levels of melatonin does not ameliorate the MPTP-induced degeneration of the nigrostriatal pathway. *Brain Research*, 921(1–2), 115–121. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03106-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03106-7)
- Müller, B., Assmus, J., Herlofson, K., Larsen, J. P., & Tysnes, O. B. (2013). Importance of motor vs. non-motor symptoms for health-related quality of life in early Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 19(11), 1027–1032. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.07.010>
- Mundiñano, I. C., Caballero, M. C., Ordóñez, C., Hernandez, M., DiCaudo, C., Marcilla, I., ... Luquin, M. R. (2011). Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathologica*, 122(1), 61–74. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0830-2>
- Mundiñano, I. C., Hernandez, M., Dicaudo, C., Ordoñez, C., Marcilla, I., Tuñon, M. T., & Luquin, M. R. (2013). Reduced cholinergic olfactory centrifugal inputs in patients with neurodegenerative disorders and MPTP-treated monkeys. *Acta Neuropathologica*, 126(3), 411–425. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1144-3>
- Negoias, S., Croy, I., Gerber, J., Puschmann, S., Petrowski, K., Joraschky, P.,

- & Hummel, T. (2010). Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. *Neuroscience*, *169*(1), 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.012>
- Nonno, R., Pannacci, M., Lucini, V., Angeloni, D., Fraschini, F., Stankov, B. M., ... Farmacologia, D. (1999). Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. *British Journal of Pharmacology*, *127*, 1288–1294.
- Nordlund, J. J., & Lerner, A. B. (1977). The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *45*(4), 768–774. <https://doi.org/10.1210/jcem-45-4-768>
- Nosedá, A. C. D., Rodrigues, L. S., Targa, A. D. S., Aurich, M. F., Vital, M. A. B. F., Da Cunha, C., & Lima, M. M. S. (2014). Putative role of monoamines in the antidepressant-like mechanism induced by striatal MT2 blockade. *Behavioural Brain Research*, *275*, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.007>
- Nosedá, A. C. D., Targa, A. D. S., Rodrigues, L. S., Aurich, M. F., & Lima, M. M. S. (2016). REM sleep deprivation promotes a dopaminergic influence in the striatal MT2 anxiolytic-like effects. *Sleep Science*, *9*(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.slsci.2015.10.002>
- Nowak, J. Z., Zurawska, E., & Zawilska, J. (1989). Melatonin and its generating system in vertebrate retina: circadian rhythm, effect of environmental lighting and interaction with dopamine. *Neurochemistry International*, *14*(4), 397–406. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(89\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0197-0186(89)90027-2)
- Ochoa-Sanchez, R., Rainer, Q., Comai, S., Spadoni, G., Bedini, A., Rivara, S., ... Gobbi, G. (2012). Anxiolytic effects of the melatonin MT2receptor partial agonist UCM765: Comparison with melatonin and diazepam. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *39*(2), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.07.003>
- Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J. M., Zisapel, N., & Cardinali, D. P. (2008). Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*, *85*(3), 335–353. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.04.001>
- Paus, S., Schmitz-Hübsch, T., Wüllner, U., Vogel, A., Klockgether, T., & Abele, M. (2007). Bright light therapy in Parkinson's disease: A pilot study. *Movement Disorders*, *22*(10), 1495–1498. <https://doi.org/10.1002/mds.21542>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition by. *Academic Press*. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(83\)90049-5](https://doi.org/10.1016/0143-4179(83)90049-5)
- Phillipson, O. T. (2014). Management of the aging risk factor for Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *35*(4), 847–857. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.073>
- Pinato, L., da Silveira Cruz-Machado, S., Franco, D. G., Campos, L. M. G., Cecon, E., Fernandes, P. A. C. M., ... Markus, R. P. (2015). Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. *Brain Structure and Function*,

- 220(2), 827–840. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0686-4>
- Poeggeler, B., Rj, R., D-x, T., L-d, C., Lc, M., & Chen, L. (1993). Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. *Journal of Pineal Research*, *14*, 151–168.
- Prado, R. C. P. do, & Barbosa, E. R. (2005). Depression in Parkinson's disease: study of 60 cases. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, *63*(3B), 766–771. <https://doi.org/S0004-282X2005000500009>
- Prediger, R. D. S., De-Mello, N., & Takahashi, R. N. (2006). Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats. *European Journal of Pharmacology*, *531*(1–3), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.032>
- Quelhas, R., & Costa, M. (2009). Quality of Life in Parkinson ' s Disease, 413–419.
- Raikhlín, N. T., Kvetnoy, I. M., & Tolkachev, V. N. (1975). Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature*, *255*(5506), 344–345. <https://doi.org/10.1038/255344a0>
- Rajaratnam, S. M. W., Cohen, D. A., & Rogers, N. L. (2009). Melatonin and Melatonin Analogues. *Sleep Medicine Clinics*, *4*(2), 179–193. <https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2009.02.007>
- Ramírez-Rodríguez, G., Vega-Rivera, N. M., Oikawa-Sala, J., Gómez-Sánchez, A., Ortiz-López, L., & Estrada-Camarena, E. (2014). Melatonin synergizes with citalopram to induce antidepressant-like behavior and to promote hippocampal neurogenesis in adult mice. *Journal of Pineal Research*, *56*(4), 450–461. <https://doi.org/10.1111/jpi.12136>
- Ravina, B., Camicioli, R., Como, P. G., Marsh, L., Jankovic, J., Weintraub, D., & Elm, J. (2007). The impact of depressive symptoms in early Parkinson disease. *Neurology*, *69*(4), 342–347. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000268695.63392.10>
- Raynaud, A., Meunier, N., Acquistapace, A., & Bombail, V. (2015). Chronic variable stress exposure in male Wistar rats affects the first step of olfactory detection. *Behavioural Brain Research*, *291*, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.013>
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., Ebisawa, T., Mahle, C. D., & Kolakowski, L. F. (1996). Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Letters*, *386*(2–3), 219–224. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00437-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00437-1)
- Rey, N. L., Petit, G. H., Bousset, L., Melki, R., & Brundin, P. (2013). Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta Neuropathologica*, *126*(4), 555–573. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1160-3>
- Rochet, M., El-Hage, W., Richa, S., Kazour, F., & Atanasova, B. (2018). Depression, olfaction, and quality of life: A mutual relationship. *Brain Sciences*, *8*(80), 1–22. <https://doi.org/10.3390/brainsci8050080>
- Rodrigues, L. S., Targa, A. D. S., Nosedá, A. C. D., Aurich, M. F., Da Cunha, C., & Lima, M. M. S. (2014). Olfactory impairment in the rotenone model of Parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(December), 383. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00383>
- Rodríguez-Violante, M., Zerón-Martínez, R., Cervantes-Arriaga, A., & Corona,

- T. (2017). Who Can Diagnose Parkinson's Disease First? Role of Pre-motor Symptoms. *Archives of Medical Research*, 48(3), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.08.005>
- Rottstädt, F., Han, P., Weidner, K., Schellong, J., Wolff-Stephan, S., Strauß, T., ... Croy, I. (2018). Reduced olfactory bulb volume in depression—A structural moderator analysis. *Human Brain Mapping*, 39(6), 2573–2582. <https://doi.org/10.1002/hbm.24024>
- Ruksee, N., Tongjaroenbuangam, W., Mahanam, T., & Govitrapong, P. (2014). Melatonin pretreatment prevented the effect of dexamethasone negative alterations on behavior and hippocampal neurogenesis in the mouse brain. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.011>
- Rutten, S., Vriend, C., Smit, J. H., Berendse, H. W., Hoogendoorn, A. W., van den Heuvel, O. A., & van der Werf, Y. D. (2016). A double-blind randomized controlled trial to assess the effect of bright light therapy on depression in patients with Parkinson's disease. *BMC Psychiatry*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12888-016-1050-z>
- Sachs, C., & Jonsson, G. (1975). Mechanisms of action of 6-OHDA. *Biochemical Pharmacology*, 24, 1–8. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(75\)90304-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(75)90304-4)
- Sallinen, P., Saarela, S., Ilves, M., Vakkuri, O., & Leppäluoto, J. (2005). The expression of MT 1 and MT 2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sciences*, 76(10), 1123–1134. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.016>
- Samii, A., Nutt, J. G., & Ransom, B. R. (2004). Parkinson ' S Disease. *The L*, 363, 1783–1793.
- Sandyk, R. (1990). Pineal melatonin functions and the depression of Parkinson's disease: a hypothesis. *The International Journal of Neuroscience*, 51(1–2), 73–77. <https://doi.org/10.3109/00207459009000510>
- Santiago, R. M., Barbiero, J., Lima, M. M. S., Dombrowski, P. A., Andreatini, R., & Vital, M. A. B. F. (2010). Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(6), 1104–1114. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.004>
- Santiago, R. M., Barbiero, J., Gradowski, R. W., Bochen, S., Lima, M. M. S., Da Cunha, C., ... Vital, M. A. B. F. (2014). Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. *Behavioural Brain Research*, 259, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.035>
- Saravanan, K. S., Sindhu, K. M., & Mohanakumar, K. P. (2007). Melatonin protects against rotenone-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. *Journal of Pineal Research*, 42(3), 247–253. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00412.x>
- Sauer, H., & Oertel, W. H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and

- immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, 59(2), 401–415. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90605-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90605-X)
- Schablitzky, S., & Pause, B. M. (2014). Sadness might isolate you in a non-smelling world: Olfactory perception and depression. *Frontiers in Psychology*, 5(FEB), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00045>
- Schippers, K. J., & Nichols, S. A. (2014). Deep, dark secrets of melatonin in animal evolution. *Cell*, 159(1), 9–10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.004>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Sethi, S., Adams, W., Pollock, J., & Witt-Enderby, P. A. (2008). C-terminal domains within human MT1 and MT2 melatonin receptors are involved in internalization processes. *Journal of Pineal Research*, 45(2), 212–218. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00579.x>
- Sharma, R., McMillan, C. R., Tenn, C. C., & Niles, L. P. (2006). Physiological neuroprotection by melatonin in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 1068(1), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.10.084>
- Sharma, S., Moon, C. S., Khogali, A., Haidous, A., Chabenne, A., Ojo, C., ... Ebadi, M. (2013). Biomarkers in Parkinson's disease (recent update). *Neurochemistry International*, 63(3), 201–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.005>
- Shaw, K. M., Stern, G. M., & Sandler, M. (1972). Melatonin and Parkinsonism. *The Lancet*, 3, 1973.
- Shulman, L. M., Taback, R. L., Rabinstein, a a, & Weiner, W. J. (2002). Non-recognition of depression and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 8, 193–197.
- Simola, N., & Morelli, M. (2007). Mechanisms of Neurotoxicity of 6-OHda, 11, 151–167. Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-03356-5.pdf>
- Skene, D. J. (1979). *The Evaluation of Melatonin as a Possible Antidepressive*.
- Slaugenhaupt, S. A., Roca, A. L., Liebert, C. B., Altherr, M. R., Gusella, J. F., & Reppert, S. M. (1995). Mapping of the gene for the Mel1a Melatonin Receptor to Human Chromosome 4 (MTNR1A) and Mouse Chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics*, 27(2), 355–357.
- Stefanovic, B., Spasojevic, N., Jovanovic, P., Jasnic, N., Djordjevic, J., & Dronjak, S. (2016). Melatonin mediated antidepressant-like effect in the hippocampus of chronic stress-induced depression rats: Regulating vesicular monoamine transporter 2 and monoamine oxidase A levels. *European Neuropsychopharmacology*, 26(10), 1629–1637. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.07.005>
- Stefulj, J., Hortner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wolfler, A., ... Liebmann, P. M. (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res*, 30(4), 243–247. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2001.300408.x>
- Stella, F., Banzato, C. E. M., Barasnevicus Quagliato, E. M. A., & Viana, M. A. (2008). Depression in patients with Parkinson's disease: Impact on

- functioning. *Journal of the Neurological Sciences*, 272(1–2), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.05.018>
- Sumaya, I. C., Masana, M. I., & Dubocovich, M. L. (2005). The antidepressant-like effect of the melatonin receptor ligand luzindole in mice during forced swimming requires expression of MT2 but not MT1 melatonin receptors. *Journal of Pineal Research*, 39(2), 170–177. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00233.x>
- Tadaiesky, M. T., Dombrowski, P. A., Figueiredo, C. P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C., & Takahashi, R. N. (2008). Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 156(4), 830–840. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.08.035>
- Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M., ... Reiter, R. J. (2010). The changing biological roles of melatonin during evolution: From an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biological Reviews*, 85(3), 607–623. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x>
- Taniguti, E. H., Ferreira, Y. S., Stupp, I. J. V., Fraga-Junior, E. B., Mendonça, C. B., Rossi, F. L., ... Vandresen-Filho, S. (2018). Neuroprotective effect of melatonin against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Physiology and Behavior*, 188, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.034>
- Tapias, V., Cannon, J. R., & Greenamyre, J. T. (2010). Melatonin treatment potentiates neurodegeneration in a rat rotenone parkinson's disease model. *Journal of Neuroscience Research*, 88(2), 420–427. <https://doi.org/10.1002/jnr.22201>
- Thomas, B., & Mohanakumar, K. P. (2004). Melatonin protects against oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse nigrostriatum. *Journal of Pineal Research*, 36(1), 25–32. <https://doi.org/096> [pii]
- Tosini, G., Owino, S., Guillaume, J. L., & Jockers, R. (2014). Understanding melatonin receptor pharmacology: Latest insights from mouse models, and their relevance to human disease. *BioEssays*, 36(8), 778–787. <https://doi.org/10.1002/bies.201400017>
- Ungerstedt, U. (1968). CENTRAL INDUCED DEGENERATION OF MONOAMINE NEURONS, 5, 107–110.
- Uz, T., Arslan, A. D., Kurtuncu, M., Imbesi, M., Akhisaroglu, M., Dwivedi, Y., ... Manev, H. (2005). The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Molecular Brain Research*, 136(1–2), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.01.002>
- van Riezen, H., Schnieden, H., & Wren, A. (1976). Behavioral changes following olfactory bulbectomy in rats: a possible model for the detection of antidepressant drugs. *Proceedings of the B.P.S.*, 426–427.
- Venegas, C., García, J. A., Escames, G., Ortiz, F., López, A., Doerrier, C., ... Acuña-Castroviejo, D. (2012). Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Journal of Pineal Research*, 52(2), 217–227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x>

- Vingill, S., Connor-Robson, N., & Wade-Martins, R. (2018). Are rodent models of Parkinson's disease behaving as they should? *Behavioural Brain Research*, 352(July 2017), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.021>
- Waly, N. E., & Hallworth, R. (2015). Circadian Pattern of Melatonin MT1 and MT2 Receptor Localization in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Circadian Rhythms*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.5334/jcr.ab>
- Yildirim, F. B., Ozsoy, O., Tanriover, G., Kaya, Y., Ogut, E., Gemici, B., ... Aslan, M. (2014). Mechanism of the beneficial effect of melatonin in experimental Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, 79, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.09.005>
- Yu, C. X., Zhu, C. Bin, Xu, S. F., Cao, X. D., & Wu, G. C. (2000). Selective MT2 melatonin receptor antagonist blocks melatonin-induced antinociception in rats. *Neuroscience Letters*, 282(3), 161–164. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)00883-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)00883-1)

14. ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 853

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.


PROCESSO/PROCESS: 23075.049460/2014-71

APROVADO/APPROVAL: 16/12/2014 – R.O. 10/2014

TÍTULO/TITLE: Envolvimento do silenciamento por RNA de interferência dos receptores melatonérgicos MT1, MT2 e GPCR50 hipocámpais no comportamento tipo-depressivo em ratos

AUTORES/AUTHORS: Marcelo de Meira Santos Lima, Ana Carolina Duarte Noseda

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA