

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Luiza Paul Géa

**Avaliação de Efeitos Sensório-
motores em Ratos Submetidos à
Microinjeção Unilateral de
6-hidroxidopamina no Feixe
Prosencefálico Medial**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2014**

Luiza Paul Géa

Avaliação de Efeitos Sensório- motores em Ratos Submetidos à Microinjeção Unilateral de 6-hidroxidopamina no Feixe Prosencefálico Medial

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Arlete Hilbig
Co-orientadoras: Dra. Mônica F. R. de Lima
e Dra. Márcia Giovenardi

**Porto Alegre
2014**

Agradecimentos

A meus pais pelo apoio e suporte, mesmo quando tudo estava confuso e do avesso. Agradeço pelo estímulo, carinho e amor que me deram sempre. Amo muito vocês!

Ao programa de pós-graduação em patologia da UFCSPA e a Maristela pelo auxílio, disponibilidade e eficiência de sempre.

A minha orientadora, Dra. Arlete Hilbig, pela confiança e pelo contínuo aprendizado ao longo da realização deste trabalho. As minhas co-orientadoras, Dra. Mônica e Dra. Márcia pela orientação na elaboração do projeto, pela disponibilidade e pelo auxílio com a metodologia. Ao Dr. Rasia pela disponibilidade e auxílio com a captura das imagens. A Dra. Marilda pela disponibilização de equipamentos e do espaço do Laboratório de Patologia desta universidade para realização deste trabalho.

Aos meus futuros colegas e bolsistas de iniciação científica (André, Flávia, Gabriela, Jéssica, Júlia e Thailan) por toda ajuda, interesse e por serem as melhores companhias nos finais de semana de experimentos. Adoro vocês, obrigada por tudo!

Especialmente aos funcionários desta universidade como a Keli, a Rosalva e a Teresinha (do Laboratório de Patologia) pelo auxílio incansável na realização da metodologia deste trabalho, com os cortes histológicos e imunoistoquímicas. A Inês (do Biotério da pós-graduação) por todo o acolhimento, auxílio nos dias de experimento e preocupação com os animais. Ao fotógrafo, Luciano, que fotografou imagens excelentes das lâminas para o artigo científico. Muito obrigada!

Às minhas colegas e amigas maravilhosas de laboratório – Bárbara, Camila, Carol, Dine, Eliza, Fernanda, Gio, Keli, Lisi, Marília, Taia – pelas trocas de ideias, pelas discussões sobre ciência e sobre a vida, pelos momentos de risada e de apoio moral. Espero que tenhamos muitos mais anos juntas, Princesas da Patologia!

Agradeço as minhas amigas de profissão e de vida também pelo apoio, pela presença em todos os eventos e consideração de sempre. Estarei na plateia de vocês sempre para retribuir o carinho! Muito sucesso!

Ao meu namorado (quase) engenheiro pela troca de conhecimentos, tornando mais simples os problemas que eu encontrava no caminho. Além do auxílio com tabelas, planilhas e softwares, e as caronas para os experimentos em horários não tão agradáveis! Obrigada, amor!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, através da bolsa de pesquisa.

Sumário

1. Introdução	11
1.1. A doença de Parkinson (DP).....	11
1.1.2. Fisiopatologia.....	15
1.1.3. Etiologia	19
1.2. O olfato e a sua relação com a DP	21
1.2.1. O BO e a disfunção olfatória na DP	22
1.3. Modelos animais de DP	26
1.4. O modelo de 6-OHDA e suas limitações.....	27
1.4.1. Características comportamentais.....	30
1.4.2. Histopatologia	31
1.5. Alterações no BO de modelos animais de DP	33
2. Objetivos	35
2.1. Geral	35
2.2. Específicos.....	35
Referências bibliográficas	36
3. Artigo científico redigido em inglês (vide ANEXO II para revista).....	45
4. Considerações finais	65
5. Anexos	66

Lista de abreviaturas

AS: α -sinucleína

BO: bulbo olfatório

CL: corpos de Lewy

DA: dopamina

DP: doença de Parkinson

EROS: espécies reativas de oxigênio

FPM: feixe prosencefálico medial

GABA: ácido γ -aminobutírico

GL: glomérulo

GLU: glutamato

GRA: camada granular

IH: imunistoquímica

LC: *locus coeruleus*

MI: camada de células mitrais

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

NA: noradrenalina

NB: núcleos da base

NT(s): neurotransmissor(es)

Pe: camada plexiforme externa

Pint: camada plexiforme interna

SNC: sistema nervoso central

SNpc: substância *nigra pars compacta*

ST: estriado

TH: tirosina hidroxilase

TH-ir: imunorreatividade à TH

ZSV: zona subventricular

5-HT: serotonina

6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina

Resumo da Dissertação

Introdução: a doença de Parkinson (DP) é classicamente descrita pela presença de sinais motores. Entretanto, sintomas não-motores são relatados e o mais frequente é a disfunção olfatória. A etiologia da hiposmia na DP não está clara, mas estudos indicam que este sintoma surja frente a modificações nas células do bulbo olfatório (BO). O BO possui grande número de células dopaminérgicas e é incerto se a disfunção do mesmo deve-se a sua lesão ou é secundária a modificações decorrentes da doença, como denervação dopaminérgica. Para estudar a DP, modelos experimentais foram desenvolvidos e o mais antigo e largamente utilizado é o da 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).

Objetivos: avaliar e quantificar a lesão dopaminérgica na substância *nigra* e sua relação com alterações no BO, além de possíveis modificações comportamentais sensório-motoras nos animais tratados.

Material e Métodos: 48 ratos Wistar machos (\pm 200-250g) foram divididos em três grupos. Um de animais tratados com 6-OHDA e outro com salina que foram submetidos à estereotaxia para administração das soluções no feixe prosencefálico medial direito, além de um grupo controle. A extensão da lesão dopaminérgica foi avaliada 21, 28 e 57 dias pós-cirurgia concomitantemente a testes de motricidade e discriminação olfatória. Os encéfalos foram processados e submetidos à imunistoquímica contra tirosina hidroxilase (TH). Foram realizadas contagem de neurônios TH positivos na SNpc e mensuração da imunorreatividade à TH (TH-ir) no BO.

Resultados: foi observada importante lesão dopaminérgica na SNpc ipsilateral dos animais lesionados, que levou a redução da TH-ir no estriado e a apresentação de comportamento rotacional. Não foram observados prejuízo motor e disfunção olfatória estatisticamente significativos nos mesmos, bem como alterações da TH-ir no BO.

Conclusão: o modelo experimental que utiliza 6-OHDA possui alta reprodutibilidade, sendo útil para a pesquisa da fisiopatologia da DP. A redução dopaminérgica observada, após lesão da SNpc, não foi suficiente para induzir alteração na discriminação olfatória ou nas células dopaminérgicas dos BOs dos animais tratados com 6-OHDA.

Palavras-chave: doença de Parkinson, sintomas não-motores, disfunção olfatória, bulbo olfatório, modelos animais, 6-hidroxidopamina.

1. Introdução

1.1. A doença de Parkinson (DP)

Primeiramente descrita em 1817 por James Parkinson, em seu trabalho intitulado “*An essay on the shaking palsy*”, a DP possui caráter neurodegenerativo progressivo e o diagnóstico definitivo é anatomopatológico, com a observação de perda de neurônios dopaminérgicos na substância *nigra* e inclusões citoplasmáticas de α -sinucleína (AS) (Braak e cols., 2003; Barone, 2010).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente, após a doença de Alzheimer (Parkinson, 2002; Ghavami e cols., 2014). Atualmente, a estimativa mundial é de que 10 milhões de pessoas manifestem a doença e acredita-se que sejam diagnosticados cerca de 50.000-60.000 novos casos a cada ano. A incidência aumenta com a idade, sendo apenas 4% dos casos diagnosticados antes dos 50 anos (Goldman, 2014). O envelhecimento é um dos mais importantes fatores de risco, com incidência crescente de 2,5 a cada 100.000 pessoas por ano em indivíduos com 50 anos e de 100 em 100.000 em indivíduos com 80 anos (Goldman, 2014). O envelhecimento associado à exposição tóxica ou alteração genética favorável pode ser um fator potencializador para o desenvolvimento da DP (Bueler, 2009). Além disso, já foram observadas algumas diferenças em relação ao gênero, sendo os homens mais propensos a desenvolver a doença do que as mulheres, em uma frequência de 2:1 (Miller e Cronin-Golomb, 2010).

1.1.1. Características clínicas

A DP é classicamente descrita por sua clínica, na qual o paciente apresenta sinais motores como tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (Parkinson, 2002; Jankovic, 2008). A apresentação deste complexo de sinais em um paciente é conhecida como parkinsonismo. O aparecimento assimétrico destes sinais motores irá sugerir a presença da DP e possibilitar o diagnóstico clínico de probabilidade da doença (Jankovic, 2008).

A manifestação dos sinais motores é consequência da degeneração e morte dos neurônios dopaminérgicos da substância *nigra pars compacta* (SNpc), que causa a redução da quantidade de dopamina (DA) liberada em áreas do sistema nervoso central (SNC) que regulam o movimento, como os núcleos da base (NB), em especial o estriado (ST) (Taylor e cols., 2010). As projeções dopaminérgicas facilitam o início dos movimentos voluntários, mas até que exista uma redução em torno de 70-80% da DA no ST e a morte dos neurônios dopaminérgicos atinja cerca de 50-60% na SNpc, os sinais motores clássicos da DP apresentam-se pouco evidentes (Braak e cols., 2003; Riquelme e cols., 2012; Goldman, 2013).

Além do aspecto motor, os NB estão envolvidos com o comportamento cognitivo e emocional, e outras regiões encefálicas também estão envolvidas na DP (Bear e cols., 2008). Assim, nas últimas décadas, tem sido enfatizado que pacientes com DP também podem sofrer com sintomas não-motores, os quais podem surgir mesmo antes daqueles motores (Muslimovic e cols., 2005; Taylor e cols., 2009). Dentre os sintomas não-motores já foram descritos distúrbios do sono, ansiedade, depressão, demência, constipação e disfunção olfatória (Doty e cols., 1992; Santin e cols., 2010; Schnabel, 2010).

Estes sintomas não-motores não são exclusivos da DP e sua manifestação não define o diagnóstico clínico da doença, que é tradicionalmente reconhecida pelos sinais motores e confirmada somente pelo exame histopatológico revelando perda de neurônios da SNpc, que expressam neuromelanina, e presença dos “corpos de Lewy” (CL) (Sulzer, 2007). Entretanto, os sintomas não-motores podem contribuir para o diagnóstico pré-clínico.

Considerando que exista a manifestação de sintomas não-motores e que as terapias de reposição de DA normalmente têm pouco ou nenhum efeito sobre estes sintomas, é possível inferir que a alteração de outras vias neuronais e de neurotransmissores (NTs) também possa exercer influência no quadro clínico da doença. Os sintomas não-motores não estão diretamente associados a disfunção de vias neuronais específicas, o que se sabe é que, para manter as funções motoras e não-motoras, é de grande importância a existência de uma circuitaria neuronal complexa, com vários graus de interconectividade e utilização de diferentes NTs – incluindo a DA, o glutamato (GLU), a acetilcolina, o ácido γ -aminobutírico (GABA), entre outros (Barone, 2010). Portanto, a redução da quantidade de DA liberada no ST é, definitivamente, o principal motivo das manifestações motoras, mas a liberação deste NT pode sofrer influência e modulação dessas outras vias neuronais.

Os neurônios serotoninérgicos, por exemplo, estão mais presentes nos núcleos da rafe e projetam-se para diferentes regiões do encéfalo, entre elas a SNpc e a área tegmental ventral – além de suas áreas de projeção, como o ST (Fink e Gothert, 2007; Bear e cols., 2008). A serotonina (5-HT) pode agir em heteroreceptores inibitórios, que uma vez localizados em interneurônios

também inibitórios, como os gabaérgicos, facilitam a liberação de DA no ST (Fink e Gothert, 2007). Quando a concentração de 5-HT nos NB está diminuída em pacientes com DP ocorre uma redução na atividade do globo pálido e na via motora direta dos NB, resultando em um prejuízo na iniciação de movimentos voluntários (Rav-Acha e cols., 2008; Barone, 2010).

Ainda há a relação da DP com neurônios noradrenérgicos, os quais se encontram em considerável número no *locus coeruleus* (LC) e cujas projeções destinam-se a diversas áreas do SNC, dentre elas o bulbo olfatório (BO), o cerebelo, os núcleos do tálamo e difusamente para o córtex cerebral (Bear e cols., 2008). A região do LC está envolvida com diversas funções, tais como: atenção, vigília, aprendizado, memória, ansiedade e humor. Desta forma, a redução de noradrenalina (NA) na DP está relacionada com a perda neuronal que também ocorre no LC e, conforme descrito em alguns estudos, esta redução piora a progressão da doença por aumentar a suscetibilidade dos neurônios dopaminérgicos à degeneração e inibir o reparo dos que já degeneraram (Fornai e cols., 2007; Perez e cols., 2009).

Outras vias de NTs também podem sofrer alteração, como a glutamatérgica. O GLU é o NT excitatório mais abundante no SNC e está associado tanto à via motora direta quanto à indireta dos NB (Bear e cols., 2008). Assim, a perda dos neurônios dopaminérgicos é um fator que possibilita o aumento da atividade glutamatérgica, podendo resultar em uma considerável excitotoxicidade pelo aumento do cálcio intracelular e, conseqüente, ativação de morte celular e vias de apoptose (Aldakheel e cols., 2014).

O distúrbio do sono é outro sintoma não-motor observado em pacientes com DP e alguns estudos relatam que a redução de sono REM (*rapid eye movement*) nestes pacientes, pela supressão da atividade do receptor colinérgico, pode auxiliar na melhora do quadro motor (Barone, 2010). Os NTs dopaminérgicos e colinérgicos possuem influência no sono REM, uma vez que nesta circunstância há aumento da atividade de receptores colinérgicos e redução dos dopaminérgicos (Barone, 2010). Além disto, a redução da atividade da enzima colina acetiltransferase, devido à perda de neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert, parece ter papel importante na demência em pacientes com DP (Matilla e cols, 2001).

É possível perceber que a alteração de um sistema de NT pode afetar outros. Contudo, alguns autores relatam que há pouca ou nenhuma associação entre alterações motoras e não-motoras, sugerindo que as alterações neuropatológicas responsáveis, por exemplo, pelo prejuízo cognitivo nos estágios iniciais da DP diferenciam-se daquelas responsáveis pela disfunção motora (Barone, 2010). É indiscutível que a redução de DA *per se* tem relação direta com o déficit motor; porém, como discutido nesta seção, sua modulação ou interação com outros NTs pode, levar a observação pré-clínica de sintomas não-motores em pacientes com DP.

1.1.2. Fisiopatologia

Através da análise *post mortem* de encéfalos de pacientes, Braak e cols. (2003) sugeriram que a DP apresenta um padrão característico de desenvolvimento ao longo do SNC, associado aos depósitos de AS, a saber: as

primeiras regiões afetadas seriam o núcleo motor dorsal do vago (décimo nervo craniano) e/ou sistema olfatório – com posterior progressão ascendente para regiões mais vulneráveis, como a própria SNpc, até atingir áreas corticais (Braak e cols., 2003; Doty, 2007; Schnabel, 2010). O envolvimento do córtex ocorre inicialmente em áreas límbicas (como córtex transentorrinal e giro do cíngulo), avançando para áreas de associação terciária e secundária e finalmente áreas corticais primárias. Desta forma, além da degeneração neuronal, são observados acúmulos de proteínas, principalmente AS, no citoplasma dos neurônios remanescentes da SNpc formando as inclusões citoplasmáticas denominadas de CL (Dawson e Dawson, 2003; Masuda-Suzukake e cols., 2013). Este é um importante marcador histopatológico da DP, presente também em outras doenças neurodegenerativas classificadas como sinucleinopatias, como a Atrofia de Múltiplos Sistemas e a Demência de CL, e que provavelmente contribui para a degeneração e disfunção neuronal (Tofaris e cols., 2003).

Normalmente, a AS sob a forma de monômeros apresenta-se solúvel no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos, ou seja, na sua conformação normal. Porém, existem formas intermediárias entre sua estrutura inicial e final que podem interagir entre si e alterar a estrutural normal da proteína (Brundin e cols., 2010). Estas formas de cadeias longitudinais, ou também denominada filamentosa, são insolúveis, o que facilita sua agregação e deposição no citoplasma do neurônio (Cookson, 2009; Bendor e cols., 2013). Estes agregados ligam-se ao proteossoma, complexo multienzimático responsável pela degradação correta das proteínas, inibindo sua função dependente de ubiquitina, molécula que se liga a proteínas que devem ser degradadas,

favorecendo o acúmulo de AS e a consequente formação dos CL (Dawson e Dawson, 2003; Snyder e Wolozin, 2004). Cookson e cols. (2009) sugerem que a presença desses agregados seja capaz de gerar toxicidade celular incluindo o bloqueio do transporte de proteínas entre o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi, diminuição da liberação de vesículas sinápticas – consequentemente de NTs – e prejuízo na produção de energia, induzindo a apoptose celular.

As formas alteradas de AS são tóxicas para a célula, mas pouco é sabido sobre a possível forma de dispersão destas ao longo do SNC. Recentemente, tem-se discutido sobre a possibilidade de um comportamento de disseminação semelhante à proteína priônica, o que facilitaria a passagem da proteína alterada ao longo das áreas encefálicas envolvidas na DP. Brundin e cols. (2010) propuseram alguns mecanismos pelos quais as formas alteradas da proteína seriam liberadas das células a partir de processos de exocitose ou morte celular – após o rompimento da membrana celular. Uma vez no espaço extracelular, estes compostos insolúveis seriam capazes de atingir os corpos neuronais adjacentes – por endocitose ou transporte passivo, ainda não estabelecido – ficando retidos ou sendo transportados de forma anterógrada através dos axônios. Pode ocorrer também o transporte retrógrado, no qual os agregados atingiriam o axônio e seriam transportados até o corpo neuronal. Destaca-se, ainda, a possibilidade dos agregados fazerem uso de componentes do citoesqueleto celular, como moléculas motoras e nanotubos, possibilitando sua propagação de célula em célula. Esta hipótese fundamenta-se no fato de que nas doenças neurodegenerativas, como na DP, são necessários anos até o aparecimento dos sinais clínicos, período em que as

proteínas alteradas estariam formando-se, aumentando em quantidade, agregando e se disseminando (Brundin e cols., 2010; Masuda-Suzukake e cols., 2013). Uma correlação interessante que pode ser considerada a partir deste mecanismo proposto é o fato de que mesmo pacientes com DP, que possuem o início do desenvolvimento da agregação proteica no tronco encefálico, podem apresentar alterações de olfato, importante sintoma não-motor. Desta forma, não aparentaria ser necessário o envolvimento do BO no início do desenvolvimento da doença para que haja um comprometimento na capacidade olfativa do paciente. Portanto, o acúmulo de AS pode ser um fator iniciante na morte dos neurônios dopaminérgicos e, com a progressão da DP, esta neurodegeneração e consequente redução na quantidade de DA no SNC pode estar envolvida na disfunção olfatória. Até mesmo a redução de inervação dopaminérgica fortalece esta hipótese, por alterar a função dos tipos celulares encontrados no BO, como será discutido mais adiante.

Mesmo sendo importantes marcadores histopatológicos da DP, os CL não são específicos do SNC. Desde 1989 já foram descritos depósitos semelhantes no sistema nervoso entérico (Wakabayashi e cols., 1989). Normalmente, estes depósitos, compostos principalmente de AS, são observados nos neurônios dos plexos mioentéricos de Auerbach e Meissner, que possuem imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH), assim como aqueles da SNpc (Wakabayashi e cols., 1989). Portanto, estes neurônios devem compartilhar alguma característica que os torna mais suscetíveis ao acúmulo de AS. O envolvimento de outros sistemas na DP, além do motor, como o entérico e o olfatório é muito mais complexo e tem sido amplamente estudado. Hawkes e cols. (2007) corroboram a probabilidade de um patógeno

neurotrópico atingir o SNC através da via nasal e entérica. A própria anatomia da cavidade nasal, por sua vez, é conveniente para entrada de tais patógenos, que podem alcançar o lobo temporal através de transporte anterógrado (Hawkes e cols., 2007; Doty, 2008). Já a via entérica é considerada secundária à ingestão das secreções nasais presentes na saliva, que podem conter o patógeno capaz de atingir os plexos mioentéricos e, por transmissão transsináptica, alcançar os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos do nervo vago (Hawkes e cols., 2007). Por conseguinte, o patógeno poderá ascender até a SNpc através de transporte retrógrado pela medula e iniciar os processos envolvidos na morte dos neurônios dopaminérgicos, observados na DP (Hawkes e cols., 2007). Estas são algumas informações que podem sugerir uma etiologia para a DP, uma vez que até hoje seja possível apenas pontuar e compreender alguns mecanismos que estão envolvidos em todo o processo de morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc.

1.1.3. Etiologia

A etiologia da DP permanece desconhecida, mas é sabido que alguns fatores ambientais e genéticos podem ser considerados protetores ou de risco para o desenvolvimento da doença, o que leva muitos autores a relatarem a possibilidade da doença ter como causa a associação de mais de um desses fatores (Sulzer, 2007; Goldman, 2014). Existem alguns genes que foram descritos e estão relacionados a formas familiares da DP ou, ainda, que predispõe o indivíduo a tal condição. Normalmente, são genes de proteínas que desempenham papéis importantes nas funções celulares como as proteínas da mitocôndria (PINK1 e DJ-1), as envolvidas com tráfego de

moléculas entre organelas e fusão de vesículas (AS e tau), as relacionadas com vias de degradação de macromoléculas (parkina e DJ-1) ou ainda aquelas que modificam funções antioxidantes (fator de crescimento de fibroblasto-20) (Trinh e Farrer, 2013). Normalmente, a penetrância gênica é baixa, como no caso da mutação dominante LRRK2, na qual apenas 24% dos indivíduos portadores acabam por desenvolver a doença (Klein e Schlossmacher, 2006; Sulzer, 2007).

Além dos fatores genéticos, cresce cada vez mais o interesse pelos fatores ambientais na etiologia da DP. A exposição a compostos com potencial neurotóxico é exemplificada por estudos com trabalhadores de zonas rurais expostos constantemente a pesticidas (Goldman, 2014). Van der Mark e cols. (2012) observaram que o desenvolvimento da DP está relacionado com a exposição a pesticidas, com uma razão de risco de 1,6 para desenvolvimento de DP em indivíduos expostos. Embora este seja um fator de risco importante, a poluição nas cidades não passou despercebida. Alguns estudos de coorte já foram realizados para observar a relação entre a exposição a poluentes do ar provenientes de veículos e a DP. Finkelstein e Jerret (2007) sugerem que há uma relação positiva e que a exposição a emissões industriais de manganês, associada ao envelhecimento, auxilia na progressão da doença. Ainda, Calderón-Garcidueñas e cols. (2008) compararam indivíduos que morreram de forma repentina e que moravam em áreas do México com altos e baixos índices de poluição. Os autores evidenciaram aumento da quantidade de proteínas envolvidas com o estresse oxidativo (como a ciclooxygenase-2) e presença de material particulado nos neurônios do BO de indivíduos expostos a altos índices de poluição (Calderón-Garcidueñas e cols., 2008). Em função

dos diversos fatores já relatados e sua inter-relação como predisponentes da DP considera-se que esta é uma doença neurodegenerativa multifatorial.

1.2. O olfato e a sua relação com a DP

Um dos sintomas não-motores que vem sendo observado na clínica e que está relacionado a doenças neurodegenerativas, mas amplamente estudado na DP e na doença de Alzheimer, é a disfunção olfatória. Significativamente, mais de 96% dos pacientes com DP apresentam perda de olfato e, normalmente, só tornam-se conscientes deste fato quando testados (Doty, 2012; Haehner e cols., 2009; Attems e cols., 2014). Na DP a perda de olfato precede as alterações clássicas motoras e não possui mecanismos patológicos bem esclarecidos (Mundinano e cols., 2011). Uma vez que a alteração de olfato não é observada em outras formas de parkinsonismo e tremor, alguns autores sugerem a utilização deste sintoma como diagnóstico diferencial para a DP. Estudos como o de Wenning e cols. (1995) e, mais recentemente, Haehner e cols. (2011) relatam ser mais frequente a perda de olfato em pacientes com DP que naqueles com atrofia de múltiplos sistemas, paralisia supranuclear progressiva ou degeneração corticobasal. Estes estudos observaram o desempenho dos pacientes frente a testes de discriminação e identificação de odores e valores máximos de saturação frente a algumas substâncias odoríferas. Da mesma forma, Santin e cols. (2010) observaram que dentre pacientes com DP precoce e tardia, aqueles com início precoce obtiveram reduções menos importantes de desempenho nas atividades de discriminação e identificação de odores. Portanto, já existem testes validados

para avaliação da função olfatória em humanos e que permitem auxiliar no diagnóstico da DP.

Ainda não estão bem estabelecidas quais alterações levam ao aparecimento da hiposmia e se esta disfunção tem, ou não, início relacionado à degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc. Entretanto, estudos apontam claramente para alterações histopatológicas no BO (Doty, 2012; Mundinano e cols., 2011). No olfato, observamos a interação de diversos NTs que uma vez alterados podem comprometer suas inter-relações e causar uma disfunção nesta atividade, além de conexões diretas entre estruturas olfatórias primárias e a SNpc (Doty, 2008). A partir de um estudo sobre a hiposmia na DP, Mundinano e cols. (2011) observaram aumento de células dopaminérgicas no BO de pacientes com DP. A partir disto, os autores sugerem que este aumento possa ser reflexo de um mecanismo compensatório frente à degeneração inicial de outros sistemas de NTs, podendo contribuir para o déficit olfatório que é observado em indivíduos com doenças neurodegenerativas, como na DP (Mundinano e cols., 2011). Além disto, a DA exerce um efeito inibitório entre as células receptoras olfatórias e as mitrais no BO, com o número aumentado de células dopaminérgicas no BO de pacientes com a doença, este efeito também pode ser responsável pela disfunção olfatória (Lelan e cols., 2011).

1.2.1. O BO e a disfunção olfatória na DP

O BO é o elemento principal do sistema olfatório e está estruturado em camadas de células com funções e morfologias semelhantes: a do nervo

olfatório, a glomerular, a plexiforme externa, a de células mitrais, a plexiforme interna e a granular (Figura 1) (Duda, 2010). Resumidamente, existem células receptoras olfatórias presentes no epitélio olfatório que expressam receptores para odor e projetam seus prolongamentos para a camada glomerular. No glomérulo, esses prolongamentos encontram dendritos primários de células mitrais e em tufo, as quais possuem dendritos secundários que se estendem até a camada plexiforme externa, onde realizam sinapse com interneurônios, incluindo células periglomerulares (gabaérgicas e dopaminérgicas) e granulares (gabaérgicas), as quais são muito numerosas no BO. Como principal NT excitatório, o GLU das células receptoras é o primeiro a ativar receptores das células mitrais e em tufo no glomérulo. Nas células receptoras existem receptores dopaminérgicos e gabaérgicos, os quais permitem a modulação destas células pelas células periglomerulares. Os principais NTs das células periglomerulares, responsáveis pela modulação das receptoras, são o GABA e a DA. Fibras colinérgicas e serotoninérgicas são encontradas na camada glomerular – as primeiras modulam a atividade das células dopaminérgicas periglomerulares, enquanto as últimas polarizam as periglomerulares e hiperpolarizam as mitrais. As fibras noradrenérgicas, provenientes do LC também atingem o BO pelo feixe prosencefálico medial (FPM) – para uma revisão completa da anatomia do BO, vide Doty (2012). Portanto, é notável o envolvimento dos diversos NTs do SNC na atividade do sistema olfatório. Ainda mais interessante é observar a constante presença da DA nos diversos tipos celulares encontrados no BO, o que pode corroborar uma possível relação entre a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na DP e a perda de olfato nos pacientes.

Outra característica relevante do BO é a sua plasticidade, isto é, esta estrutura possui frequente reposição de suas células ao longo do tempo (Curtis e cols., 2007). Nos mamíferos adultos, existem duas áreas principais de neurogênese: o hipocampo e a zona subventricular (ZSV), próxima dos ventrículos laterais (Mochizuki, 2011). Conseqüentemente, as células-tronco neurais adultas provenientes da ZSV desempenham o papel de repor as células do BO (Curtis e cols., 2007). A necessidade de reposição de células granulares e periglomerulares é muito maior nos roedores que nos humanos e, além disso, segundo alguns estudos esta capacidade proliferativa encontra-se reduzida em indivíduos com DP (Hoglinger e cols., 2004; Mochizuki, 2011). Provavelmente, isto se deve ao fato de que a inervação e sinalização dopaminérgica na ZSV aumentam consideravelmente a capacidade proliferativa nesta região (Curtis e cols., 2007). Como as células que geram novos neurônios no BO são provenientes da ZSV, a neurodegeneração dopaminérgica que ocorre na DP, mesmo em fases iniciais, pode gerar alteração da neurogênese no BO e ter envolvimento na disfunção olfatória.

Algumas hipóteses sobre a perda de olfato na DP já foram sugeridas, entre elas está o acúmulo de agregados proteicos ao longo do sistema olfatório, a degeneração de neurônios intrínsecos do BO e o aumento no número de neurônios olfatórios dopaminérgicos observado em pacientes com doenças neurodegenerativas (Doty, 2012). Esta última possibilidade vem sendo associada a um aumento de estímulos inibitórios na região do BO e o aumento do número de células dopaminérgicas no BO de pacientes já foi observado em diversos estudos (Huisman e cols., 2004; Mundinano e cols., 2011). Mundinano e cols. (2011) observou a presença de depósitos de AS e β -amilóide nos BOs

de pacientes com DP e doença de Alzheimer, respectivamente, mas sem encontrar alteração de tamanho nos BOs de pacientes com DP.

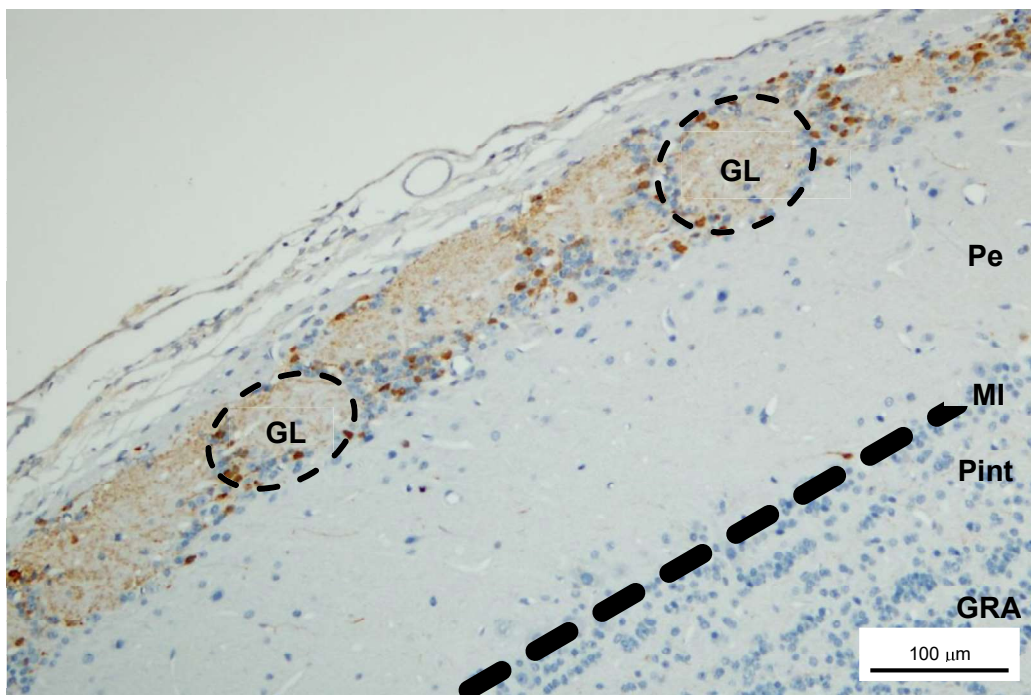


Figura 1. Fotomicrografia de seção longitudinal de BO de rato. A camada com coloração marrom é a periglomerular, onde estão localizados os glomérulos (GL, linha tracejada), com células bem marcadas ao seu redor, as periglomerulares. Logo abaixo, a camada plexiforme externa (Pe), a mitral (MI, linha pontilhada), a plexiforme interna (Pint) e a granular (GRA). Técnica de imunistoquímica contra tirosina hidroxilase e contracoloração com hematoxilina, microscopia de luz (200x).

É sabido que existem projeções do BO que atingem a substância *nigra* e que esta inervação dopaminérgica é importante para a proliferação de precursores neurais do BO provenientes da ZSV (Doty, 2008; Curtis e cols., 2007). Assim, torna-se interessante avaliar a possibilidade de alterações no BO serem secundárias ao início da degeneração dopaminérgica que ocorre na DP, estando diretamente envolvidas com a presença de sintomas não-motores, como a disfunção olfatória (Barone, 2010).

1.3. Modelos animais de DP

Como a etiologia e a fisiopatologia da DP não estão bem estabelecidas torna-se imprescindível desenvolver e aprimorar modelos experimentais que mimetizem a doença (Le e cols., 2014). Os animais não manifestam os sinais e sintomas da DP, como é observado nos seres humanos, sendo necessária a manipulação genética e/ou administração de agentes neurotóxicos que sejam capazes de induzir suas características clínicas e patológicas (Bezard e Przedborski, 2011). O modelo animal ideal para a DP deveria apresentar perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, presença de inclusões proteicas semelhantes aos CL e distúrbios motores responsivos a terapia atual, no caso, a levodopa (Uversky, 2004; Beeler e cols., 2010). Modelos animais transgênicos *knockout* e *knockin*, associados ou não a agentes neurotóxicos têm sido amplamente utilizados e outros têm sido propostos, mas não há um que satisfaça todos os critérios clínicos e/ou histológicos da DP (Orth e Tabrizi, 2003; Meredith e Kang, 2006). Em geral, os modelos utilizam diferentes espécies animais e associam manipulação genética e exposição a agentes neurotóxicos. Dentre as principais substâncias tóxicas utilizadas, as mais bem estabelecidas são a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Allbutt e Henderson, 2007; Branchi e cols., 2010), o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) (Emborg, 2004; Perry e cols., 2005; Prediger e cols., 2010), os pesticidas e herbicidas, tais como o paraquat, o maneb e a rotenona (Emborg, 2004; Uversky, 2004), e os inibidores do sistema ubiquitina-proteossoma (Mcnaught e cols., 2004). Os modelos com pesticidas e/ou herbicidas foram baseados em estudos epidemiológicos que associaram risco aumentado de DP com as atividades laborais em ambiente rural (Ren, 2009).

Embora esses modelos não sejam ideais, por induzir rapidamente a lesão celular, os mesmos têm sido de grande auxílio no esclarecimento de muitas questões referentes à fisiopatologia e ao tratamento da DP, relacionados principalmente ao déficit de DA. A crescente necessidade de estabelecer e desenvolver um modelo animal ideal de DP tem sido o principal objetivo de muitos pesquisadores que trabalham com doenças neurodegenerativas, com o intuito de promover avanços nas áreas diagnóstica e terapêutica, para melhorar a qualidade de vida dos pacientes que sofrem com a DP.

1.4. O modelo de 6-OHDA e suas limitações

Entre os primeiros modelos experimentais de DP desenvolvidos e estudados, aquele que ganhou destaque entre os pesquisadores foi o que utilizava a neurotoxina 6-OHDA. Assim, na década de 80, este era o modelo que estava mais bem validado e que era capaz de causar danos nos neurônios catecolaminérgicos em diversas espécies como ratos, camundongos, gato, cães e macacos (Bezard e Przedborski, 2011). A capacidade da 6-OHDA de mimetizar as alterações histopatológicas e comportamentais que ocorrem na DP deve-se ao fato desta neurotoxina gerar espécies reativas de oxigênio (EROS) e, conseqüentemente, causar dano mitocondrial (Blum e cols., 2001). A 6-OHDA é um análogo hidroxilado da DA, logo esta toxina tem preferência pelas inervações catecolaminérgicas, possuindo grande afinidade pelos transportadores de DA e NA (Schober, 2004). Porter e cols. (1963) foram os primeiros a relatar a redução de NA nas inervações simpáticas do coração induzida pela 6-OHDA. O efeito tóxico da 6-OHDA baseia-se na formação de

radicais livres, como quinonas, peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e hidroxila (Schober, 2004). A formação destes compostos tóxicos ocorre através da oxidação da 6-OHDA pela enzima monoaminoxidase, da auto-oxidação da molécula ou, ainda, via reação intracelular na presença de ferro (Bove e Perier, 2012). Além disso, a neurotoxina é capaz de causar inibição do complexo I e IV da cadeia respiratória da mitocôndria, embora este não seja o principal mecanismo da sua toxicidade (Deumens e cols., 2002). Com a produção de EROS e o dano mitocondrial ocorre lesão de membranas celulares e de organelas, causando a morte celular. Alterações nas vesículas de DA também são relatadas, aumentando a quantidade deste NT – que possui relevante potencial oxidativo – no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos (Blum e cols., 2001).

Alguns estudos como os de Andrew e cols. (1993) e Curtius e cols. (1974) relataram a presença de 6-OHDA no núcleo caudado e na urina de pacientes com DP tratados com levodopa, sendo proposta a presença da 6-OHDA no organismo de pacientes com DP como um metabólito endógeno hidroxilado da DA. Dentre esses mecanismos de ação da 6-OHDA descritos, mesmo que ainda não muito bem estabelecidos, todos são capazes de causar a morte dos neurônios dopaminérgicos.

Para que seja produzida a lesão neuronal, a 6-OHDA deve ser administrada diretamente no SNC, pois esta toxina não tem capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (Blum e cols., 2001). A maioria dos estudos que utiliza a 6-OHDA realiza a sua administração em áreas cerebrais como no FPM, na SNpc ou no ST (Blum e cols., 2001; Ferro e cols., 2005; Winner e cols., 2006). Quando administrada no FPM, os neurônios

dopaminérgicos da SNpc começam a degenerar em um período de 24 horas e não apresentam morfologia apoptótica (Bove e Perier, 2012). Entretanto, quando a neurotoxina é injetada no ST é capaz de produzir uma lesão retrógrada prolongada que leva de uma a três semanas para se completar (Bezard e Przedborski, 2011). Ainda, neste tipo de lesão é possível observar uma morfologia neuronal heterogênea – com presença de aspectos morfológicos de apoptose (Bove e Perier, 2012; Marti e cols., 2002). Além do local de administração, o tipo de lesão também deve ser estudado e vários fatores devem ser levados em consideração. Apesar de ser possível utilizar modelos animais tratados bilateralmente com 6-OHDA, estudos discutem que desta forma há uma maior chance de perda de animais, devido a quadros de afagia, adipsia e convulsões (Bezard e Przedborski, 2011). Desta forma, a administração unilateral é a forma mais utilizada.

No modelo animal de microinjeção intraestriatal, a administração única de 6-OHDA produz uma redução dose-dependente de DA no próprio ST e do número de neurônios dopaminérgicos na SNpc. Enquanto a administração no FPM gera uma lesão mais severa em um curto prazo de tempo, sendo este um modelo mais apropriado para o estudo da consequência da degeneração dopaminérgica e avaliação de estratégias terapêuticas para a DP (Bove e Perier, 2012).

A 6-OHDA é muito tóxica e a preparação da solução de 6-OHDA também exige cuidados, pois é uma toxina com alta capacidade oxidativas. Assim, com a utilização de uma substância antioxidante (como o ácido ascórbico, convencionalmente utilizado nos protocolos deste modelo experimental) a solução de 6-OHDA conserva seu poder neurotóxico (Ferro e

cols., 2005; Maia e cols., 2012). De forma geral, a indução de alterações semelhantes a da DP em modelos experimentais por meio de neurotoxinas causa uma lesão dopaminérgica com progressão muito mais rápida do que a observada na patologia propriamente dita. Ou seja, a fase ativa da degeneração neuronal que levaria anos ocorre em poucos dias (Przedborski e cols., 2001). Assim, estas são algumas limitações que devem ser consideradas ao trabalhar com o modelo experimental e ao comparar os resultados obtidos com o que é realmente observado na clínica de pacientes com DP.

1.4.1. Características comportamentais

O modelo experimental de 6-OHDA é caracterizado por apresentar comportamento rotacional ipsilateral – lado em que foi administrada a neurotoxina e realizada a lesão – frente a estímulo de liberadores de DA, sendo este um comportamento relacionado ao grau da lesão nigroestriatal (Ungerstedt e Arbuthnott, 1970). Silvestrin e cols. (2009) propuseram a avaliação deste comportamento rotacional sem a utilização de drogas, isto é, induzindo somente pelo contexto do teste comportamental. Isso porque, muitas vezes, a utilização de drogas pode provocar alterações moleculares e comportamentais significativas, além de requerer um longo tempo de execução do teste para cada animal (Silvestrin e cols., 2009). Os autores deste estudo observaram que o teste de motricidade sobre a grade – o contexto indutor de atividade rotacional – é capaz de detectar animais lesionados com especificidade para lesões neuronais maiores que 50%. Outros testes ainda podem ser utilizados para avaliação do modelo de DP induzido por 6-OHDA unilateral como campo aberto e teste do cilindro, nos quais a alteração da

motricidade pode ser avaliada (Olsson e cols., 1995; Vercammen e cols., 2006). No campo aberto também pode ser observada atividade rotacional, mas com menor especificidade que o teste de motricidade sobre a grade (Silvestrin e cols., 2009). Para avaliação da bradicinesia e a dificuldade de iniciar o movimento, normalmente, utiliza-se o *stepping test* (Olsson e cols., 1995). Existem também outros mais completos, como o teste do corredor descrito por Dowd e Dunnett (2005) que, ao avaliar o modelo de administração unilateral de 6-OHDA no FPM, relata a dificuldade dos animais tratados em utilizar o lado contralateral frente a estímulos visuais, olfatórios e táteis. Portanto, estudos que utilizam esta neurotoxina relatam que ratos tratados com 6-OHDA apresentam aparentes e robustas alterações motoras (Ferro e cols., 2005).

1.4.2. Histopatologia

Associada a avaliação comportamental está a avaliação histopatológica. É considerada mais fidedigna, quando executada corretamente, por indicar a extensão da lesão no modelo animal após a administração da neurotoxina e em um período de tempo estabelecido pelo pesquisador. A principal forma de avaliação da extensão da lesão dopaminérgica dá-se pela realização da técnica de imunistoquímica (IH) contra TH, a enzima limitante da rota de biossíntese da DA (Figura 2) (Berger e cols., 1991; Olsson e cols., 1995; Vercammen e cols., 2006; Silvestrin e cols., 2009). Maia e cols. (2012), por exemplo, ao administrar 6-OHDA em ratos observaram uma maior redução de imunorreatividade a TH no ST e na SNpc desses animais quando comparados aos animais controles aos 21 dias após o tratamento com a neurotoxina.

Além da lesão dopaminérgica, outra importante característica histológica da DP é a presença dos CL. Entretanto, é difícil encontrar estas estruturas em modelo animal de DP em roedores submetidos à administração de 6-OHDA e MPTP, sendo relatada a presença dos CL somente em estudos que utilizam pesticidas e herbicidas (Sherer e cols., 2003; Bove e Perier, 2011).

Estudos relatam que a AS está presente nos terminais sinápticos, onde esta proteína está associada às membranas sinápticas ou no citoplasma dos neurônios (Lotharius e Brundin, 2002). Sendo assim, uma importante função da AS pode estar envolvida com a formação das vesículas sinápticas a partir dos endossomos. Já foi relatado aumento da imunorreatividade a AS na SNpc de camundongos tratados com MPTP e paraquat (Bove e Perier, 2011).

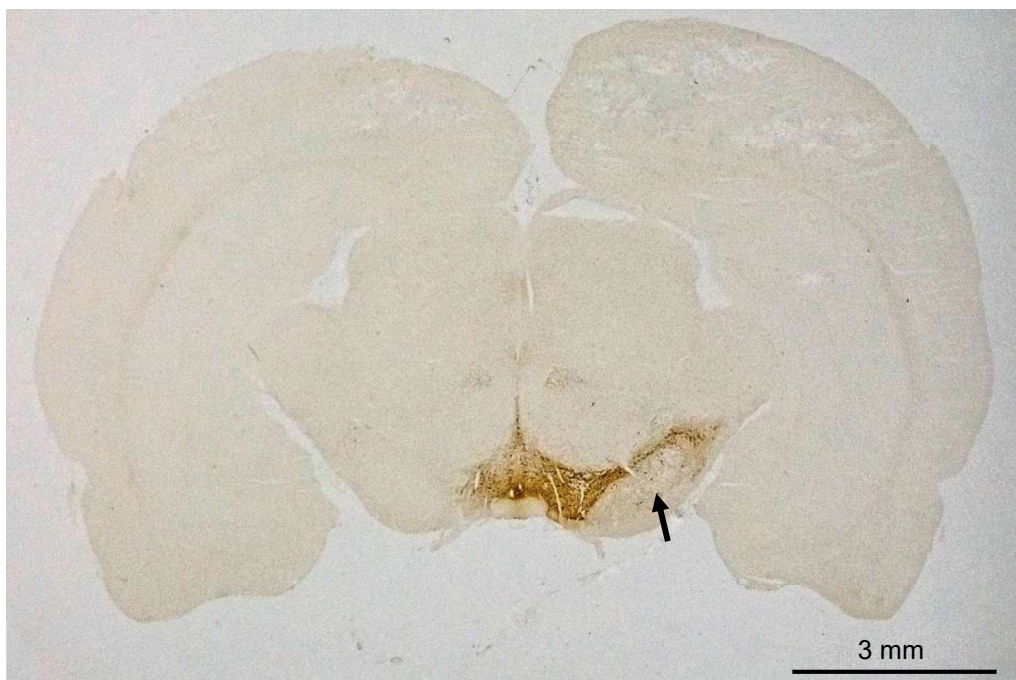


Figura 2. Lesão dopaminérgica na SNpc de rato submetido a injeção unilateral de 6-OHDA no FPM direito. Esta seção coronal do encéfalo de rato foi submetida à técnica IH contra TH. A região indicada pela seta corresponde aos neurônios dopaminérgicos remanescentes no lado contralateral a administração da neurotoxina, uma vez que do lado lesionado (ipsilateral) restaram poucas células. Técnica de IH contra TH.

1.5. Alterações no BO de modelos animais de DP

Poucos são os estudos que avaliam a disfunção olfatória nos modelos experimentais de DP. A própria avaliação deste sintoma não-motor é mais complexa de ser realizada nos modelos animais do que em humanos. Existem protocolos que utilizam diferentes odores, que são reconhecidos pelos animais, como o próprio odor do animal, leite de coco e cereais doces (Prediger e cols. 2006; Lelan e cols., 2011). Ainda, podem ser utilizados diferentes estímulos, como reconhecimento de objetos ou descoberta de objetos ou comida enterrados nas suas gaiolas (Fleming e cols., 2008; Bichler e cols., 2013).

Ao pensarmos em avaliação da função olfatória, a utilização de substâncias odoríferas que sejam atrativos para os animais é necessária. Ao realizar um teste de discriminação olfatória utilizando o odor dos próprios animais, Prediger e cols. (2006) observaram que animais tratados com MPTP via intranasal não foram capazes de discriminar o seu próprio odor após 1, 7 e 14 dias do tratamento com a neurotoxina. Por sua vez, Lelan e cols. (2011) descreveram que o leite de coco é muito atrativo para o rato. Assim, em seu trabalho utilizando ratos transgênicos como modelo de DP, os autores relatam que, em comparação com o grupo controle, os animais transgênicos não mostraram preferência pelo leite de coco, indicando uma perda da capacidade olfativa (Lelan e cols., 2011). Até o presente momento, não foram encontrados estudos e protocolos na literatura que avaliaram a função olfatória em ratos tratados com 6-OHDA.

A estrutura do BO dos roedores é semelhante à dos seres humanos, porém naqueles o olfato é mais desenvolvido. As células das camadas do BO, como as periglomerulares e granulares, também são repostas pelas células-

tronco neurais adultas provenientes da ZSV (Curtis e cols., 2007). Hoglinger e cols. (2004), estudando camundongos, concluiu que, de forma semelhante aos seres humanos, a atividade proliferativa na ZSV dos roedores possui inervação dopaminérgica e que qualquer alteração nesta via pode ser responsável pela redução de precursores neurais. Divergente desta hipótese, frente à alteração na via dopaminérgica, alguns estudos com modelos de DP induzidos por neurotoxina, já reportaram aumento destas células precursoras neurais (Mochizuki, 2011). Em um modelo de 6-OHDA administrada na via nigroestriatal de ratos, Liu e cols. (2006) observaram um aumento importante da proliferação celular na ZSV ipsilateral.

Ao avaliar o processo de neurogênese no BO de ratos submetidos à denervação estriatal, Winner e cols. (2006) relataram um aumento de novas células na camada glomerular e uma redução na camada granular do BO. Frente às alterações observadas, os autores sugerem que sem a inervação dopaminérgica na ZSV pode ter ocorrido uma compensação através da neurogênese na camada glomerular do BO dos animais tratados, ou seja, de células periglomerulares que são dopaminérgicas (Winner e cols., 2006).

Em modelo de intoxicação aguda utilizando MPTP também já foi observado aumento da neurogênese dopaminérgica no BO dos animais tratados, enquanto que o mesmo estudo não encontrou alteração na neurogênese de células não dopaminérgicas (Yamada e cols., 2004; Mochizuki, 2011). Apesar do importante envolvimento da DA, Taylor e cols. (2009) relataram alterações nos sistemas neuronais de monoaminas como 5-HT e NA em animais que tiveram sua expressão de transportadores de monoamina vesicular reduzida em 95%. Os mesmos autores relataram déficits

na discriminação olfatória de animais com total deficiência na expressão do mesmo transportador, o que pode indicar o envolvimento da alteração de outros NTs com o aparecimento de sintomas não-motores em modelo de DP (Taylor e cols., 2009).

Após todas as considerações realizadas, é possível concluir que muito já se avançou na pesquisa sobre a DP. Porém, tópicos cruciais como a etiologia e o início de sintomas pré-clínicos, como os não-motores, continuam desconhecidos. Os modelos animais representam uma excelente opção para esclarecer estas dúvidas acerca da fisiopatologia da DP e, cada vez mais, oferecer uma melhor qualidade de vida para os pacientes.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar e quantificar a lesão retrógrada na SNpc, após microinjeção de 6-OHDA no FPM de ratos, e suas possíveis consequências em estruturas olfatórias neste modelo animal.

2.2. Específicos

a) Avaliar e quantificar alterações comportamentais na motricidade e discriminação olfatória em diferentes tempos após o tratamento com 6-OHDA, comparando efeitos iniciais e tardios.

b) Avaliar e quantificar alterações histopatológicas, especialmente em células dopaminérgicas (TH positivas) no ST, SNpc e BO, em diferentes

tempos após o tratamento com 6-OHDA, também comparando efeitos iniciais e tardios.

c) correlacionar as alterações comportamentais e histopatológicas no presente modelo experimental.

Referências bibliográficas

Allbutt HN, Henderson JM. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*. 2007 Jan;159(2):195-202.

Aldakheel A, Kalia, LV, Lang AE. Pathogenesis-targeted, disease-modifying therapies in Parkinson disease. *Neurotherapeutics*. 2014 Jan;11(1):6-23.

Andrew R, Watson DG, Best SA, Midgley JM, Wenlong H, Petty RK. The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem Res*. 1993 Nov;18(11):1175-7.

Attems J, Walker L, Jellinger KA. Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*. 2014 Apr;127(4):459-75.

Barone P. Neurotransmission in Parkinson's disease: beyond dopamine. *Eur J Neurol*. 2010 Mar;17(3):364-76.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurosciências: desvendando o sistema nervoso*. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

Beeler JA, Cao ZF, Kheirbek MA, Ding Y, Koranda J, Murakami M. Dopamine-dependent motor learning: insight into levodopa's long-duration response. *Ann Neurol*. 2010 May;67(5):639-47.

Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of alpha-synuclein. *Neuron*. 2013 Sep;79(6):1044-66.

Berger K, Przedborski S, Cadet JL. Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. *Brain Res Bull.* 1991 Feb;26(2):301-7.

Bezard E, Przedborski S. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011 May;26(6):993-1002.

Bichler Z, Lim HC, Zeng L, Tan EK. Non-motor and motor features in LRRK2 transgenic mice. *PLoS One.* 2013;8(7):e70249.

Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R *et al.* Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001 Oct;65(2):135-72.

Bove J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2012 Jun;211:51-76.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Steur ENJ, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Mar-Apr;24(2):197-211.

Branchi I, D'Andrea I, Armida M, Carnevale D, Ajmone-Cat MA, Pezzola A *et al.* Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2010 Mar;208(1):137-43.

Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Apr;11(4):301-7.

Bueler H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2009 Aug;218(2):235-46.

Cookson MR. alpha-Synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener.* 2009 Feb;4:4-9.

Curtis MA, Faull RL, Eriksson PS. The effect of neurodegenerative diseases on the subventricular zone. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Sep;8(9):712-23.

Curtius HC, Wolfensberger M, Steinmann B, Redweik U, Siegfried J. Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine. Application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus. *J Chromatogr.* 1974 Nov;99(0):529-40.

Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science.* 2003 Oct;302(5646):819-22.

Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol.* 2002 Jun;175(2):303-17.

Doty RL, Stern MB, Pfeiffer C, Gollomp SM, Hurtig HI. Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1992 Feb;55(2):138-42.

Doty RL. Olfaction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007;13(3):S225-8.

Doty RL. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol.* 2008 Jan;63(1):7-15.

Doty RL. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis.* 2012 Jun;46(3):527-52.

Dowd E, Dunnett SB. Comparison of 6-hydroxydopamine-induced medial forebrain bundle and nigrostriatal terminal lesions in a lateralised nose-poking task in rats. *Behav Brain Res.* 2005 Apr;159(1):153-61.

Duda JE. Olfactory system pathology as a model of Lewy neurodegenerative disease. *J Neurol Sci.* 2010 Feb;289(1-2):49-54.

Emborg ME. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J Neurosci Methods.* 2004 Oct;139(2):121-43.

Fink KB, Gothert M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Ver.* 2007 Dec;59(4): 360-417.

Finkelstein MM, Jerrett M. A study of the relationships between Parkinson's disease and markers of traffic-derived and environmental manganese air pollution in two Canadian cities. *Environ Res.* 2007 Jul;104(3):420-32.

Fleming SM, Tetreault NA, Mulligan CK, Hutson CB, Masliah E, Chesselet MF. Olfactory deficits in mice overexpressing human wild type alpha-synuclein. *Eur J Neurosci.* 2008 Jul; 28(2):247:56.

Fornai F, di Poggio AB, Pellegrini A, Ruggieri S, Paparelli A. Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics. *Curr Med Chem.* 2007;14(22):2330-4.

Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour *Met al.* Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 2014 Jan;112:24-49.

Goldman SM. Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:141-64.

Haehner A, Hummel T, Reichmann H. Olfactory dysfunction as a diagnostic marker for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother.* 2009 Dec;9(12):1773-9.

Haehner A, Hummel T, Reichmann H. Olfactory loss in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2011 Apr; 450939.

Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007 Dec;33(6):599-614.

Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I *et al.* Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci.* 2004 Jul;7(7):726-35.

Huisman E, Uylings HB, Hoogland PV. A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2004 Jun;19(6):687-92.

Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008 Apr;79(4):368-76.

Klein C, Schlossmacher MG. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006 Mar;2(3):136-46.

Le W, Sayana P, Jankovic J. Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics? *Neurotherapeutics*. 2014 Jan;11(1):92-110.

Lelan F, Boyer C, Thinard R, Remy S, Usal C, Tesson L *et al*. Effects of Human Alpha-Synuclein A53T-A30P Mutations on SVZ and Local Olfactory Bulb Cell Proliferation in a Transgenic Rat Model of Parkinson Disease. *Parkinsons Dis*. 2011 Jun;2011:987084.

Liu BF, Gao EJ, Zeng XZ, Ji M, Cai Q, Lu Q *et al*. Proliferation of neural precursors in the subventricular zone after chemical lesions of the nigrostriatal pathway in rat brain. *Brain Res*. 2006 Aug;1106(1):30-9.

Lotharius J, Brundin P. Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2002 Oct;11(20):2395-407.

Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: The role and consequences. *Neurosci Res*. 2013 Oct;79C:1-12.

Maia S, Arlicot N, Vierron E, Bodard S, Vergote J, Guilloteau D *et al*. Longitudinal and parallel monitoring of neuroinflammation and neurodegeneration in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Synapse*. 2012 Jul;66(7):573-83.

Marti MJ, Saura J, Burke RE, Jackson-Lewis V, Jimenez A, Bonastre M. Striatal 6-hydroxydopamine induces apoptosis of nigral neurons in the adult rat. *Brain Res*. 2002 Dec;958(1):185-91.

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H *et al*. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain*. 2013 Apr;136(4):1128-38.

Mattila PM, Roytta M, Lonnberg P, Marjamaki P, Helenius H, Rinne JO. Choline acetyltransferase activity and striatal dopamine receptors in Parkinson's disease in relation to cognitive impairment. *Acta Neuropathol*. 2001 Aug;102(2):160-6.

McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2004 Jul;56(1):149-62.

Meredith GE, Kang UJ. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov Disord*. 2006 Oct;21(10):1595-606.

Miller IN, Cronin-Golomb A. Gender differences in Parkinson's disease: clinical characteristics and cognition. *Mov Disord*. 2010 Dec;25(16):2695-703.

Mochizuki H. Adult neurogenesis in Parkinson's disease. In: Seki T *et al*. *Neurogenesis in adult brain II: clinical implications*. Springer. 2011;XIV:226p.

Mundinano IC, Caballero MC, Ordonez C, Hernandez M, DiCauldo C, Marcilla I *et al*. Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol*. 2011 Jul;122(1):61-74.

Muslimovic D, Post B, Speelman JD, Schmand B. Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. *Neurology*. 2005 Oct;65(8):1239-45.

Olsson M, Nikkhah G, Bentlage C, Bjorklund A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci*. 1995 May;15(5 Pt 2):3863-75.

Orth M, Tabrizi SJ. Models of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2003 Jul;18(7):729-37.

Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002 May;14(2): 223-36.

Perry JC, Hipolide DC, Tufik S, Martins RD, Da Cunha C, Andreatini R *et al*. Intra-nigral MPTP lesion in rats: behavioral and autoradiography studies. *Exp Neurol*. 2005 Oct;195(2):322-9.

Porter CC, Totaro JA, Stone CA. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1963 Jun;140:308-16.

Prediger RD, Batista LC, Medeiros R, Pandolfo P, Florio JC, Takahashi RN. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2006 Dec;202(2):391-403.

Prediger RD, Aguiar ASJ, Rojas-Mayorquin AE, Figueiredo CP, Matheus FC, Ginestet L *et al*. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2010 Feb;17(2):114-29.

Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R *et al*. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem*. 2001 Mar;76(5):1265-74.

Rav-Acha M, Bergman H, Yarom Y. Pre- and postsynaptic serotonergic excitation of globus pallidus neurons. *J Neurophysiol*. 2008 Aug;100(2):1053-66.

Riquelme E, Abarca J, Campusano JM, Bustos G. An NR2B-Dependent Decrease in the Expression of trkB Receptors Precedes the Disappearance of Dopaminergic Cells in Substantia Nigra in a Rat Model of Presymptomatic Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*. 2012 Apr;2012:129605.

Santin R, Fonseca VF, Bleil CB, Rieder CR, Hilbig A. Olfactory function and Parkinson's disease in Southern Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 2010 Apr;68(2):252-7.

Schnabel J. Secrets of the shaking palsy. *Nature*. 2010 Aug;466(7310):S2-5.

Schober, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*. 2004 Oct;318(1):215-24.

Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol*. 2003 Jan;179(1):9-16.

Silvestrin RB, de Oliveira LF, Batassini C, Oliveira A, e Souza TM. The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*. 2009 Mar;177(2):317-21.

Snyder H, Wolozin B. Pathological proteins in Parkinson's disease: focus on the proteasome. *J Mol Neurosci*. 2004;24(3):425-42.

Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 2007 May;30(5):244-50.

Taylor TN, Caudle WM, Shepherd KR, Noorian A, Jackson CR, Iuvone PM *et al*. Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity. *J Neurosci*. 2009 Jun;29(25):8103-13.

Taylor TN, Greene JG, Miller GW. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2010 Jul;211(1):1-10.

Tofaris GK, Razaq A, Ghetti B, Lilley KS, Spillantini MG. Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *J Biol Chem*. 2003 Nov;278(45):44405-11.

Trinh J, Farrer M. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*. 2013 Aug;9(8): 445-54.

Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*. 1970 Dec;24(3):485-93.

Uversky VN. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res*. 2004 Oct;318(1):225-41.

van der Mark M, Brouwer M, Kromhout H, Nijssen P, Huss A, Vermeulen R. Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results. *Environ Health Perspect*. 2012 Mar;120(3):340-7.

Vercammen L, Van der Perren A, Vaudano E, Gijsbers R, Debyser Z, Van den Haute C *et al.* Parkin protects against neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. *Mol Ther.* 2006 Nov;14(5):716-23.

Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Lewy bodies in the enteric nervous system in Parkinson's disease. *Arch Histol Cytol.* 1989;52:191-4.

Wenning GK, Shephard B, Hawkes C, Petruckevitch A, Lees A, Quinn N. Olfactory function in atypical parkinsonian syndromes. *Acta Neurol Scand.* 1995 Apr;91(4):247-50.

Winner B, Geyer M, Couillard-Despres S, Aigner R, Bogdahn U, Aigner L *et al.* Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp Neurol.* 2006 Jan;197(1):113-21.

Yamada M, Onodera M, Mizuno Y, Mochizuki H. Neurogenesis in olfactory bulb identified by retroviral labeling in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated adult mice. *Neuroscience.* 2004;124(1):173-81.

3. Artigo científico redigido em inglês (vide ANEXO II para revista)

Luiza Paul Géa, André Borba Oliveira, Flávia Prezzi, Gabriela Waskow, Jéssica Marques Fachini, Júlia Vasconcellos Peixoto, Thailan Fraporti, Mônica Fernandes Rosa de Lima, Márcia Giovenardi, Arlete Hilbig

Evaluation of olfactory discrimination in a hemi-parkinsonian 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease

Luiza Paul Géa (corresponding author)

Laboratório de Patologia, Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil

E-mail: lu.p.gea@gmail.com

Telephone number: +555191984547

André Borba Oliveira, Flávia Prezzi, Gabriela Waskow, Júlia Vasconcellos Peixoto, Thailan Fraporti
Undergraduate course in Biomedical Science, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

Jéssica Marques Fachini,

Undergraduate course in Nursing, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

Mônica Fernandes Rosa de Lima

Departamento de Ciências Básicas da Saúde, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

Programa de Pós-graduação em Patologia, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

Márcia Giovenardi

Departamento de Ciências Básicas da Saúde, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

Arlete Hilbig

Departamento de Clínica Médica, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

Programa de Pós-graduação em Patologia, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

ABSTRACT

The Parkinson's disease is characterized by the presence of its classical motor signs, but lately the presence of non-motor symptoms has been discussed. The most prevalent non-motor symptom (occurring in more than 96% of patients) is the lack of olfaction or hyposmia. The real cause of hyposmia is not known, but most studies indicate that it may occur due to modifications in the olfactory bulb cells. Therefore, experimental models can be used to elucidate some questions concerning the disease pathophysiology and one of the most validated and widely used is the 6-hydroxidopamine hemiparkinsonian model. In this study, we observed that the microinjection of the neurotoxin in the medial forebrain bundle of rats caused a significant dopaminergic lesion in the substantia nigra pars compacta. Beside neuronal loss, we performed a discriminatory task to evaluate if rats treated with the neurotoxin exhibited olfactory impairment. We did not detect olfactory dysfunction or any significant alterations in the amount of tyrosine hydroxylase positive cells in the glomerular layer of the olfactory bulb of lesioned rats. In this study, we did not observed influence of dopaminergic denervation in the olfactory parameters investigated.

Keywords: Parkinson's disease, dopaminergic neurodegeneration, non-motor symptoms, hyposmia, olfactory bulb, 6-hydroxydopamine.

1. INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disease reported in elderly individuals (Ghavami 2014). The classical signs as resting tremor, rigidity, bradikinesia and postural instability enable its clinical diagnosis (Parkinson 2002). The motor deficit occurs due to the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) that leads to a reduction of released dopamine (DA) in the striatum (ST) – which is related to movement control (Taylor 2010). However, none of these signs is noticed until cell death in the SNpc reaches 50-60% and loss of DA in ST rises to 70-80% (Riquelme et al. 2012; Goldman 2014). Beyond cell loss, intracitolytic accumulation of misfolded insoluble α -synuclein (AS) protein is also observed and form structures named Lewy Body (LB), another hallmark of PD (Sulzer 2007; Cookson 2009). Patients also experience non-motor symptoms, which have been frequently observed in neurodegenerative diseases. Among non-motor symptoms, some as sleep disturbances, anxiety, depression, dementia, constipation and olfactory dysfunction, have been described (Neikrug et al. 2014; Takeda et al. 2014).

According to Hahener et al. (2011), the most prevalent non-motor symptom (occurring in more than 95% of patients) is the lack of olfaction or hyposmia. Although the cause of hyposmia is not known, most studies indicate that it may occur due to modifications in the olfactory bulb (OB) cells. Among described alterations are accumulation of protein aggregates along olfactory system, degeneration of OB intrinsic neurons and increase in the number of dopaminergic olfactory neurons – observed in neurodegenerative diseases patients (Huisman et al. 2004; Doty 2012; Attems et al. 2014). In this manner, experimental models can be used to elucidate some questions concerning PD pathophysiology. One of the most validated and widely used animal models is the 6-hydroxidopamine (6-OHDA) model (Blandini et al. 2008; Bezard and Przedborski 2011). The neurotoxin has great affinity to catecholamine

transporters, so its toxicity is highly selective and causes dopaminergic cell death leading to some motor disturbances (Blum et al. 2001; Simola et al. 2007). Until now, few data concerning evaluation of olfactory system alterations in 6-OHDA treated animals has been published, but olfactory impairment has already been seen and described in transgenic and intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) models (Prediger et al. 2006; Lelan et al. 2011).

The aim of this study was to evaluate the reproducibility and consequences of the dopaminergic lesion induced by 6-OHDA, a well established PD experimental model. We intended to add more information concerning olfaction impairment and dopaminergic disruption, investigating not only motor but also non-motor alterations. Among non-motor symptoms, we evaluated the olfactory discrimination ability and possible histopathological alterations in the OB of 6-OHDA treated animals.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. ANIMALS

Forty-eight adult male Wistar rats weighing 200-250g were housed in cages with a 12h light/dark cycle and free access to food and water. The animals were divided into three groups: (1) 6-OHDA lesioned rats (6-OHDA group), (2) ascorbic acid solution treated rats (sham-operated group) and (3) a group without any procedure (control group). Groups 1 and 2 were submitted to stereotaxic surgery for intracerebral microinjection of the 6-OHDA neurotoxin and ascorbic acid solutions. The extension of the lesion in the central nervous system was evaluated at 21, 28 and 57 days after surgery. All experiments were approved by UFCSPA Ethics Committee on the Use of Animals (protocol 087/12, approval 144/12).

2.2. STEREOTAXIC SURGERY

Rats were anesthetized with phentobarbital intraperitoneal (i.p.) and placed on a stereotaxic apparatus. After the skull was exposed and small holes were made, the coordinates were taken and 6-OHDA was administered. Lesions were made in the right medial forebrain bundle (MFB) at coordinates AP = -4.4 mm, LL = -1.8 mm, DV = -8.8 mm from bregma, according to Paxinos e Watson (2005). A total of 12 μg of 6-OHDA hydrobromide (Sigma-Aldrich Co.) diluted in 3 μL of ascorbic acid solution were injected in the right MFB of each animal ($4\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ in 0,1% ascorbic acid solution) with a 10 μL syringe. In order to obtain a proper diffusion of the 6-OHDA solution, the syringe was left in place for 5 minutes after injection. This is a well-described procedure used in other studies with a similar or equal objective (Silvestrin et al. 2009; Maia et al. 2012). Animals from sham-operated group were submitted to the same procedure, but it was administered 0.1% ascorbic acid solution instead. Control animals were not submitted to any surgical procedure. This surgical procedure requires full attention, since even a unilateral 6-OHDA lesion could cause loss of animals, as we observed during our experiment.

2.3. BEHAVIORAL ASSESSMENT

As reported previously, we evaluated the dopaminergic lesion in all animals at 21, 28 and 57 days after 6-OHDA microinjection. During each period, rats were submitted to behavior tasks as

indicated in the Fig. 1. In order to enable a better comprehension of results and discussion we will refer them as 21, 28d and 57d groups.

2.3.1. Rotational behavior

Animals submitted to unilateral microinjection of 6-OHDA in the MFB exhibit an asymmetric rotational behavior. This asymmetry occurs due to a disproportion in the DA activity between both ST (Deumens et al. 2002). Usually, amphetamine is used to induce the rotations, but we otherwise used the context of the test (an elevated grid) to induce rotation in treated animals. The rotational activity was observed on a 70 cm elevated grid (80x60 cm, with 3x3 cm opening) during 3 minutes, as described by Silvestrin et al. (2009). The number of rotations was counted.

2.3.2. Spontaneous locomotor activity

The evaluation of 6-OHDA administration effects on locomotor activity was observed using the open field task. The apparatus consisted in a white floor of 100x100 cm divided in 25 squares with 40 cm-high walls. Animals were placed in the center of open field apparatus and allowed to explore for 5 minutes. The number of squares crossed with both limbs (crossing) and rearing behavior were noted.

2.4. OLFACTORY FUNCTION

2.4.1. Coconut milk task

This test was described by Lelan et al. (2011). Animals were placed in a similar but smaller apparatus than the one described in the open field (60x60x40 cm), divided into four squares. In one corner a filter paper (with 70x30 mm dimensions) soaked with fresh coconut milk were placed at a height of 10 cm and in the opposite site an identical paper but soaked in distilled water instead was placed. The rat was able to explore the apparatus and odors during 5 minutes, and the time spent in both corners was recorded and divided giving an odor/H₂O ratio. Two days before test animals were habituated in the same apparatus without any filter paper.

2.5. TISSUE PREPARATION

At 21, 28 and 57 days after 6-OHDA microinjection animals were deeply anesthetized (ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered pH 7.4. Brains were removed entirely, immersed in the same fixative solution for 24 hours and then replaced by 70% ethanol. The cerebellum was discarded and a coronal cut was made in the optical chiasm to divide the brain. OBs were separated from the rest of the brain and divided in left and right. After that, each brain portion was embedded in paraffin and cut into a serial 4µm-thick sagittal sections (OB) or coronal sections (SNpc and ST). The SNpc was cut between -3.06 mm and -6.72 mm from bregma coordinates and approximately 60 sections with 50 µm interval were collected. Twenty sections with 100 µm interval were cut for ST, from bregma 2.16 mm to 0.00 mm. For OBs, approximately 60 sagittal sections with 50 µm interval were obtained, cutting almost all the structure. For the identification of all regions and homogeneity of samples, Paxinos and Watson (2005) atlas was used. Sections were obtained with microtome and used for immunohistochemistry.

2.6. IMMUNOHISTOCHEMISTRY

The primary antibody used was anti-TH (polyclonal antibody anti-rat denatured tyrosine hydroxylase, Chemicon AB152), diluted in 1:4000. Dewaxed brain sections were boiled in 10mM citrate buffer, pH 6.0, for 40 min, at 98°C, for antigen retrieval. Then washed in PBS and endogenous peroxidase activity was blocked with H₂O₂ 5% methanol. Slices were washed again and incubated in bovine serum 1% solution, for 1 h, in order to block unspecific protein binding. Sections were washed again, incubated with primary antibody solution and put in refrigerator at 4°C overnight. Next day, all sections were incubated with secondary and tertiary antibodies solutions, for 40 min each. For each brain region, we had a negative and positive control section. Immunoreaction was revealed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich Co.) for optical detection. We did not use hematoxylin counterstaining, since optical density (OD) does not require this procedure and dopaminergic cells at SNpc have high specificity for TH antibody. However, for all areas of each animal one slice was counterstained. In addition, the first and last slices were stained with hematoxylin and eosin for localization and histopathological evaluation.

2.7. IMAGE CAPTURING

All sections were captured using a digital camera (Olympus DP72, 12 bits). We captured right and left SNpc in separate images (optical microscopy, 100x) and the same procedure was performed for ST region but with a minor magnification (optical microscopy, 40x). For OBs images, we also captured right and left separately (optical microscopy, 200x). Capture and OD were performed using Image Pro Plus 6.3.0.512 software and, for cell counting, we used Image J 1.47v software.

2.8. QUANTIFICATION PROCEDURE

2.8.1. Cell counting

For each animal, we analyzed 30 from 60 sections of SNpc region cut in order to perform cell counting without considering the same cell more than one time. We considered positive neurons for TH immunostaining when we could observe its cell body totally marked and the nucleus. The number of TH positive neurons in SNpc was counted manually on ipsi- and contralateral sides and a percentage was calculated comparing both of them. Treated animals that did not show SNpc lesion were excluded from behavior and histological statistical comparisons between groups.

2.8.2. TH immunoreactivity in the OB

From the 60 section cut, we captured and analyzed 30 of each OB. For an accurate analysis, we captured three different images from the glomerular layer, where TH positive cells are found. We defined three random locations for capturing: one image from the anterior portion and other two images from ventral and dorsal portions. Fig. 2a and 2b elucidate the specificity of TH immunochemistry reaction in this layer, also is possible to identify the OB layers in a counterstained section (Fig. 2a). Then, we analyzed the OD of each one and performed the mean per animal for statistical comparison. The OD of all images was obtained using the protocol described by Leder et al. (2005) and Image J 1.47v user guide

(both protocols used the same formula). For OD calibration of black level an image was captured with a random object blocking the incident light from an optical microscope and calibration for incident level were obtained by capturing an image of incident light only (as described in the software user guide).

2.9. STATISTICAL ANALYSIS

Comparisons among groups for spontaneous locomotor activity and olfactory discrimination were performed with two-way ANOVA. The number (percentage) of TH positive cells in the SNpc and OD in OB was also carried out with two-way ANOVA comparing treatment groups or the ipsi- and contralateral sides. Two-way ANOVA was followed by Tukey post-hoc, always considering statistical differences when $p < 0.05$. The correlation between number of rotations in lesioned animals and the number of TH positive neurons in the SNpc was carried out using Pearson's correlation test.

3. RESULTS

3.1. EFFECT OF 6-OHDA MICROINJECTION ON SPONTANEOUS LOCOMOTOR ACTIVITY AND OLFACTORY FUNCTION

3.1.1. Rotational behavior

Since we observed a wide range of 90% in the amount of remaining dopaminergic cells, some of the 6-OHDA treated animals that exhibited dopaminergic lesion did not rotate in this task. In order to verify if there was any association between the number of TH positive cells and rotations, we performed Pearson's correlation and found a modest, non-significant, negative correlation ($p = 0.33$, Fig. 3).

3.1.2. Spontaneous locomotor activity

Animals treated with 6-OHDA displayed a tendency of reduction in crossing frequency when compared to 21d and 28d sham-operated and control groups ($p = 0.09$). However, animals from 6-OHDA 57d group seemed to show a recovering in locomotor activity (as seen in Fig. 4a), although two-way ANOVA did not revealed any statistical differences for treatment [$F(2,39) = 0.60$; $p = 0.56$] and time [$F(2,39) = 0.50$; $p = 0.61$] factors, neither for interaction of factors [$F(4,39) = 2.12$; $p = 0.09$]. The frequency of rearing was also non-significant for all factors (data not shown) and showed the same tendency as the crossing frequency. Interestingly, we could also observe rotational behavior of 6-OHDA lesioned animals during open field test.

3.1.3. Coconut milk task

Statistical analysis did not reveal statistical differences between groups for treatment [$F(2,6) = 3.52$; $p = 0.09$] and time [$F(1,6) = 0.07$; $p = 0.80$] factors, and neither for interaction of both [$F(2,6) = 1.41$; $p = 0.31$]. However, means of odor/H₂O ratio in all 6-OHDA groups are almost 1, indicating that 6-OHDA treated animals spent the same time exploring both corners (water and coconut milk odor). On the other hand, control and sham-operated animals seemed to prefer the coconut odor, since their means of odor/H₂O ratio are higher than 1 (Fig. 4b).

3.2. HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS

In our first observations at optical microscope, we analyzed all hematoxylin and eosin colored slices to identify major alterations. In the SNpc we could easily observe cell loss, differently from OB.

Analyzing immunostained slices, we observed a great reduction of TH immunoreactivity in SNpc of 6-OHDA treated animals (Fig. 5a). The dopaminergic degeneration in the SNpc was followed by a clear reduction of TH immunoreactivity in the ST (Fig 5b). No great differences could be observed in the TH immunoreactivity of OB glomerular layer under optical microscopy, so we analyzed the OD in this region.

3.2.1. Extension of 6-OHDA lesion in the SNpc

The TH-positive cell counting performed in the ipsilateral SNpc of all groups by time is displayed in Fig. 6a. All 6-OHDA groups of each time period exhibited a similar reduction of dopaminergic neurons in this region when compared to control and sham-operated groups ($p < 0.001$) with a mean reduction of approximately 73%. Two-way ANOVA revealed a significant effect only for treatment factor [$F(2,38) = 25.53$; $p < 0.001$] and no differences were found for time factor [$F(2,38) = 2.46$; $p = 0.10$] and interaction of them [$F(4,38) = 0.97$; $p = 0.434$].

3.2.2. OD in the glomerular layer of OB

Neither increased nor decreased of the OD was observed in the glomerular layer of OB (Fig. 6b). Also statistical analysis comparing OD in the ipsilateral OB showed no significant effects for treatment [$F(2,17) = 1.41$; $p = 0.27$] and time [$F(2,17) = 0.77$; $p = 0.48$] factors and for the interaction of both [$F(4,17) = 0.80$; $p = 0.54$] (data not shown). When comparing ipsi- and contralateral OBs also no difference was found for treatment [$F(2,46) = 1.35$; $p = 0.27$] and side factor [$F(1,46) = 0.24$; $p = 0.63$], neither for interaction of factors [$F(2,46) = 0.22$; $p = 0.80$]. Both comparisons were performed by two-way ANOVA.

4. DISCUSSION

The main outcome of our study is an important and extended lesion observed in the SNpc of the animals treated with the neurotoxin 6-OHDA injected in right FPM. The 6-OHDA unilateral injection is a golden standard among experimental models of PD leading to a marked reduction in TH immunoreactivity in the ipsilateral ST. Dopaminergic lesion could be seen at 21, 28 and 57 days after 6-OHDA microinjection in treated animals, however no differences in its extension were observed among time period groups. Thus, the dopaminergic lesion was not progressive, as expected for a 6-OHDA model (Winner et al. 2006). The results will be discussed regarding differences among treatment groups.

Since the neurotoxin causes an important dopaminergic neurodegeneration in the ipsilateral side of the unilateral model, it is common to observe significant motor disturbances and a typical rotational behavior. The rotational behavior is a remarkable characteristic of 6-OHDA unilateral model and it is usually induced under pharmacological effect, for example, with amphetamine administration (Robinson e Becker 1983; Tronci et al. 2012). In the present study, we used a validated drug-free test that is less

invasive and may have less impact in animal's behavior and biochemistry (Silvestrin et al. 2009). Since we observed different levels of lesion (with a range of approximately 90%) and no drug was used to induce rotation, 6-OHDA injected animals exhibit a minor number of rotations.

Although we observe an important loss of dopaminergic cells in the SNpc of 6-OHDA treated animals (about 75% in the injected side when compared to the intact one), our 6-OHDA model did not exhibit significant motor impairment. We believe that it may be related to compensatory mechanisms, and, since we did not performed a total and bilateral lesion, some dopaminergic fibers remained intact and could contribute for dopaminergic compensation. It has been described that unilateral lesion of substantia nigra led to a sprouting of dopaminergic fibers into parts of the ST, but it would take 4 to 7 months after lesion (Deumens et al. 2002). However, other compensatory responses might be responsible for the recovering of functions. Piffl e Hornykiewicz (2006) described an increase of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), an important intraneuronal DA metabolite, in the ST of MPTP-treated monkeys (also observed in transgenic rats by Koprach et al. 2011). The authors suggested that the increased DOPAC/DA ratios observed after partial denervation of ST indicated an enhanced of presynaptic DA turnover, which is a physiologic response to modulate the stimulation of postsynaptic receptors. In MPTP-treated monkeys, this response is related to maintenance and maybe recovering of normal motor function during the initial PD stages (Perez et al. 2008). Also, Zigmond et al. (1984) reported an upregulation of striatal TH enzyme activity in 6-OHDA rat model of PD due to the neurodegeneration in the SNpc and, consequently, DA loss.

Experimental model of PD do not reproduce exactly the same pathophysiological mechanism already observed in humans. The lesion in neurotoxin models occurs in a very rapid way and still remains in doubt their ability in reproducing the dorsoventral gradient of striatal denervation (Potashkin et al. 2010). The reproducibility of the lesion depends mainly on the type of administration and in which brain area the toxin is injected (Tieu 2011). Here we performed a unilateral microinjection since bilateral administration of 6-OHDA usually leads to adipsia, aphagia and seizures, resulting in the loss of treated animals (Bové and Perier 2011). Another important fact to consider is that in PD many neurotransmitter systems are involved, but neurotoxin models cannot mimic such complexity, and few experimental models with rodents can reproduce the LB, an important hallmark of PD. Until now these intracytoplasmatic inclusion are only described in rotenone and transgenic animal models (Decressac et al. 2012; Xiong 2012).

The most prevalent is the hyposmia, but the mechanisms of its occurrence are not well understood and must be studied. It is still not clear if smell loss occurs due to the PD pathological process or secondary to substantia nigra dopaminergic depletion. Alterations in the OB such as accumulation of protein aggregates, degeneration of intrinsic neurons and increase in the number of dopaminergic olfactory neurons have been related to this symptom (Doty 2012). The OB is the main structure of the olfactory system and it is divided into layers of cells with similar function and morphology: glomerular, external plexiforme, mitral cell, internal plexiforme e granular layers. The first synaptic transmission between odorant stimulus (periphery) and central nervous system occurs in the glomerulus, more

specifically in the glomerular layer of the OB (Duda 2010). In this layer, we can find periglomerular cells that show TH immunoreactivity. These cells act as inhibitory neurons between olfactory receptors and mitral cells, decreasing synaptic transmission, which could be responsible for an olfactory deficit (Lelan et al. 2011). It is also known that there are projections from OB that reach many brain areas such as the substantia nigra, which highlights the possibility of any alterations in the OB could be secondary to the dopaminergic neurodegeneration through retrograde or anterograde axonal transport (Doty 2008). Bohnen et al. (2007) showed a correlation between deficits in olfactory discrimination and abnormalities in dopamine transporter binding in the substantia nigra and ST, but authors could not define the dopaminergic neurodegeneration as a significant cause for hyposmia in PD patients.

Regarding evaluation of olfactory function in PD patients, smell tests are performed for odor threshold, discrimination and identification in PD patients using different protocols such as “Sniffin’ Sticks” test and University of Pennsylvania Smell Test (UPSIT) (Haehner et al. 2011). Haehner et al. (2009) identified that over 96% of PD patient exhibit olfactory dysfunction when compared to healthy patients. Interestingly, authors also found no correlation between olfactory loss and both duration of disease and the clinical severity of PD. Once olfactory dysfunction is established as a relevant non-motor symptom of PD, it is important to know how to evaluate it in an experimental model since animals, especially rodents, have smell sense much more developed than humans.

Until now, few olfactory tests were described for rats. Authors have tried rats own odor (of its own cage) or different odors (coconut milk, sweetened cereal) and stimulus (buried food pellets, objects recognition) (Prediger et al. 2006; Fleming et al. 2008; Lelan et al. 2011; Bichler et al. 2013). However, some protocols have low reproducibility, since room environment factors must be standardized for each test and subtle olfactory impairments are difficult to identify. It is known that intact rats could differentiate or prefer some specific odors, but we should consider that a rat with its olfactory sense impaired does not necessarily prefer a non-odorant stimulus or object. Therefore, a rat that exhibit olfactory dysfunction could behave and explore the odor or stimulus just like an intact rat during olfactory discrimination tasks.

An interesting possibility is to use a different and interesting odor for rats. Lelan et al. (2011) investigated olfactory impairment in an AS transgenic rat model of PD using coconut milk that is known to be a very attractive odor for the rat. At 6, 9 and 14 months from birth during the olfactory test transgenic rats spent significantly less time exploring coconut milk odor, differently from wild-type rats, indicating that transgenic animals presented olfactory impairment. However, the AS transgenic model reproduced only the AS pathology but not selective loss of DA neurons and ST denervation (Lelan et al. 2001). We used the same test, but could not find statistical differences between 6-OHDA treated animals and controls, although it seems that control and sham-operated animals spent more time exploring coconut milk odor, since the odor/H₂O mean ratio in those groups were higher than 1. It is important to point out that we performed a unilateral lesion in our model and is possible that, with one intact OB, animals do not develop the same reduction in their olfactory ability, reflecting in no statistically significant difference. Bilateral lesions with 6-OHDA would have caused high mortality rate.

Regarding the histological alterations in the OB in neurotoxin models, some studies report a decrease in the neural stem cells that get to OB from the subventricular zone (SVZ), while others have found an increase in this number (Hoglinger et al. 2004; Winner et al. 2006). It is known that any impairment in dopaminergic innervation of SVZ could be responsible for the reduction in the number of adult neural stem cells (Hoglinger et al. 2004). However, Winner et al. (2006) examined the OB neurogenesis in animals submitted to dopaminergic denervation, by two 6-OHDA microinjections in the FPM, and described an increase of newly generated neurons in the glomerular layer. This observation contrasted with a transient decrease in the granular layer of the OB, suggesting that the loss of dopaminergic input to the SVZ led to a compensatory mechanism through neurogenesis of periglomerular cells. In addition, there is recent evidence supporting that the number of TH positive cells may neither be diminished nor enhanced, Chiu et al. (2014) showed that mice treated with 6-OHDA in the substantia nigra had proportionally more TH positive periglomerular newborn cells among total newborn cells when compared to control animals. We did not use neurogenesis markers to evaluate the number of new cells in the periglomerular layer, but we did not observe statistically significant difference in the TH immunoreactivity in the OB glomerular layer between the 6-OHDA treated group and controls.

In our study, we could not observe straight relationship between olfactory dysfunction and dopaminergic cell loss in the SNpc, since we found neither olfactory discrimination impairment nor reduction in OB TH immunoreactivity in the 6-OHDA lesioned animals. It is still possible that other mechanisms or neurotransmitter dysfunction (such as noradrenaline, glutamate or GABA) are involved. Doty et al. (1988), using rats injected with 6-OHDA in the OB, found a reduction in the content of noradrenaline (NA) in the treated animal OB without influence on odor detection task, suggesting that this neurotransmitter may not be involved on modulation of olfactory sensitivity. No alteration in DA levels was found in these animals.

In conclusion, 6-OHDA is a potent neurotoxin that causes a significant lesion in the SNpc of treated animals. This experimental model still represents a very useful tool in PD pathophysiology research, regarding DA denervation. In this study, OB alterations could not be observed, differently from human data that indicate that OB from PD patients appears to exhibit an increase of TH positive cells in the glomerular layer (Huisman et al. 2004; Mundinano et al. 2011). Further investigations are needed about the relation among neurodegeneration of dopaminergic cells, other neurotransmitter systems and olfactory impairment.

REFERENCES

- Attems J, Walker L, Jellinger KA (2014) Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol* 127(4):459-75. doi: 10.1007/s00401-014-1261-7
- Bezard E, Przedborski S (2011) A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26(6):993-1002. doi: 10.1002/mds.23696
- Bichler Z, Lim HC, Zeng L, Tan EK (2013) Non-motor and motor features in LRRK2 transgenic mice. *PLoS One* 30;8(7):e70249. doi: 10.1371/journal.pone.0070249
- Bohnen NI, Gedela S, Kuwabara H, Constantine GM, Mathis CA, Studenski SA et al. (2007) Selective hyposmia and nigrostriatal dopaminergic denervation in Parkinson's disease. *J Neurol* 254(1):84-90
- Blandini F, Armentero MT, Martignoni E (2008) The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord* 14(2):S124-9. doi: 10.1016/j.parkreldis.2008.04.015
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R et al. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65(2):135-72
- Bové J, Perier C (2012) Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 1(211):51-76. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.057
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24(2):197-211
- Cookson MR (2009) Alpha-synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener* 4(4):9. doi: 10.1186/1750-1326-4-9
- Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Bjorklund A (2012) Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis* 45(3):939-53. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.013
- Deumens R, Blokland A, Prickaerts J (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 175(2):303-17
- Doty RL, Ferguson-Segall M, Lucki I, Kreider M (1988) Effects of intrabulbar injections of 6-hydroxydopamine on ethyl acetate odor detection in castrate and non-castrate male rats. *Brain Res* 15;444(1):95-103
- Doty RL (2008) The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol* 63(1):7-15. doi: 10.1002/ana.21327
- Doty RL (2012) Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis* 46(3):527-52. doi: 10.1016/j.nbd.2011.10.026

- Duda JE (2010) Olfactory system pathology as a model of Lewy neurodegenerative disease. *J Neurol Sci* 15;289(1-2):49-54. doi: 10.1016/j.jns.2009.08.042
- Fleming SM, Tetreault NA, Mulligan CK, Hutson CB, Masliah E, Chesselet MF (2008) Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Eur J Neurosci* 28(2):247-56. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06346.x
- Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B et al (2014) Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 112:24-49. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.004
- Goldman SM (2014) Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54:141-64. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-135937
- Haehner A, Hummel T, Reichmann H (2009) Olfactory dysfunction as a diagnostic marker for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother* 9(12):1773-9. doi: 10.1586/ern.09.115
- Haehner A, Hummel T, Reichmann H (2011) Olfactory loss in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2011:450939. doi: 10.4061/2011
- Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I et al. (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7(7):726-35
- Huisman E, Uylings HB, Hoogland PV (2004) A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 19(6):687-92. doi: 10.1002/mds.10713
- Koprich JB, Johnston TH, Huot P, Reyes MG, Espinosa M, Brotchie JM (2011) Progressive neurodegeneration or endogenous compensation in an animal model of Parkinson's disease produced by decreasing doses of alpha-synuclein. *PLoS One* 7;6(3):e17698. doi: 10.1371/journal.pone.0017698
- Lelan F, Boyer C, Thinard R, Remy S, Usal C, Tesson L et al. (2011) Effects of Human Alpha-Synuclein A53T-A30P Mutations on SVZ and Local Olfactory Bulb Cell Proliferation in a Transgenic Rat Model of Parkinson Disease. *Parkinsons Dis* 2011:987084. doi: 10.4061/2011/987084
- Maia S, Arlicot N, Vierron E, Bodard S, Vergote J, Guilloteau D et al. (2012) Longitudinal and parallel monitoring of neuroinflammation and neurodegeneration in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Synapse* 66(7):573-83. doi: 10.1002/syn.21543
- Mundinano IC, Caballero MC, Ordonez C, Hernandez M, DiCaudo C, Marcilla I et al. (2011) Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 122(1):61-74. doi: 10.1007/s00401-011-0830-2
- Neikrug AB, Avanzino JA, Liu L, Maglione JE, Natarajan L, Corey-Bloom J et al. (2014) Parkinson's disease and REM sleep behavior disorder result in increased non-motor symptoms. *Sleep Med* 15(8):959-66. doi: 10.1016/j.sleep.2014.04.009.
- Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14(2):223-36

- Paxinos G, Watson C (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic Press
- Perez XA, Parameswaran N, Huang LZ, O'Leary KT, Quik M (2008) Pre-synaptic dopaminergic compensation after moderate nigrostriatal damage in non-human primates. *J Neurochem* 105(5):1861-72. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05268.x
- Pifl C, Hornykiewicz O (2006) Dopamine turnover is upregulated in the caudate/putamen of asymptomatic MPTP-treated rhesus monkeys. *Neurochem Int* 49(5):519-24
- Potashkin JA, Blume SR, Runkle NK (2010) Limitations of animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 20;2011:658083. doi: 10.4061/2011/658083
- Prediger RD, Batista LC, Medeiros R, Pandolfo P, Florio JC, Takahashi RN (2006) The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 202(2):391-403
- Riquelme E, Abarca J, Campusano JM, Bustos G (2012) An NR2B-dependent decrease in the expression of trkB receptors precedes the disappearance of dopaminergic cells in substantia nigra in a rat model of presymptomatic Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 129605. doi: 10.1155/2012/129605
- Robinson TE, Becker JB (1983) The rotational behavior model: asymmetry in the effects of unilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra in rats. *Brain Res* 28;264(1):127-31
- Silvestrin RB, de Oliveira LF, Batassini C, Oliveira A, e Souza TM (2009) The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 177(2):317-21. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.10.030
- Simola N, Morelli M, Carta AR (2007) The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 11(3-4):151-67
- Sulzer D (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 30(5):244-50
- Takeda A, Baba T, Kikuchi A, Hasegawa T, Sugeno N, Konno M et al. (2014) Olfactory dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2014;4(2):181-7. doi: 10.3233/JPD-130277
- Taylor TN, Greene JG, Miller GW (2010) Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 211(1):1-10. doi: 10.1016/j.bbr.2010.03.004
- Tieu K (2011) A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1(1):a009316. doi: 10.1101/cshperspect.a009316
- Tronci E, Shin E, Björklund A, Carta M (2012) Amphetamine-induced rotation and L-DOPA-induced dyskinesia in the rat 6-OHDA model: a correlation study. *Neurosci Res* 73(2):168-72. doi: 10.1016/j.neures.2012.03.004

Winner B, Geyer M, Couillard-Despres S, Aigner R, Bogdahn U, Aigner L et al. (2006) Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp Neurol* 197(1):113-21

Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Da Cunha C, Deonizio JM, Netto CA et al. (2005) *Brain Res Brain Res Protoc* 16(1-3):58-64

Xiong N, Long X, Xiong J, Jia M, Chen C, Huang J et al. (2012) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit Rev Toxicol* 42(7):613-32. doi: 10.3109/10408444.2012.680431

Zigmond MJ, Acheson AL, Stachowiak MK, Stricker EM (1984) Neurochemical compensation after nigrostriatal bundle injury in an animal model of preclinical parkinsonism. *Arch Neurol* 41(8):856-61

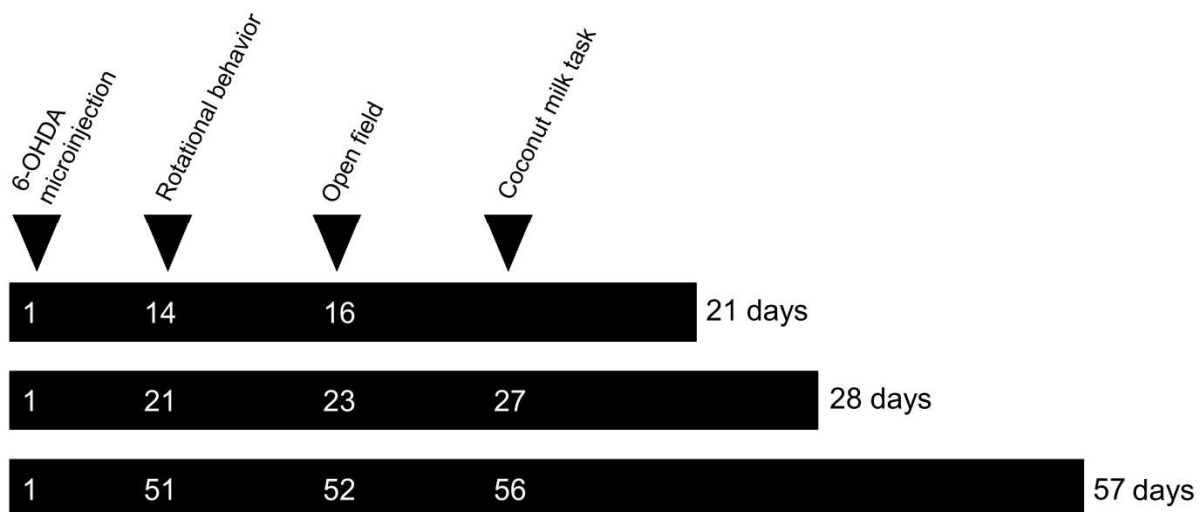


Fig. 1 Diagram showing the behavioral assessment schedule. During each period of days (21, 28 and 57) tests were distributed and in the end of the experiment all animals were submitted to transcardiac perfusion. Animals from the first period of time (21 days) were not submitted to coconut milk task.

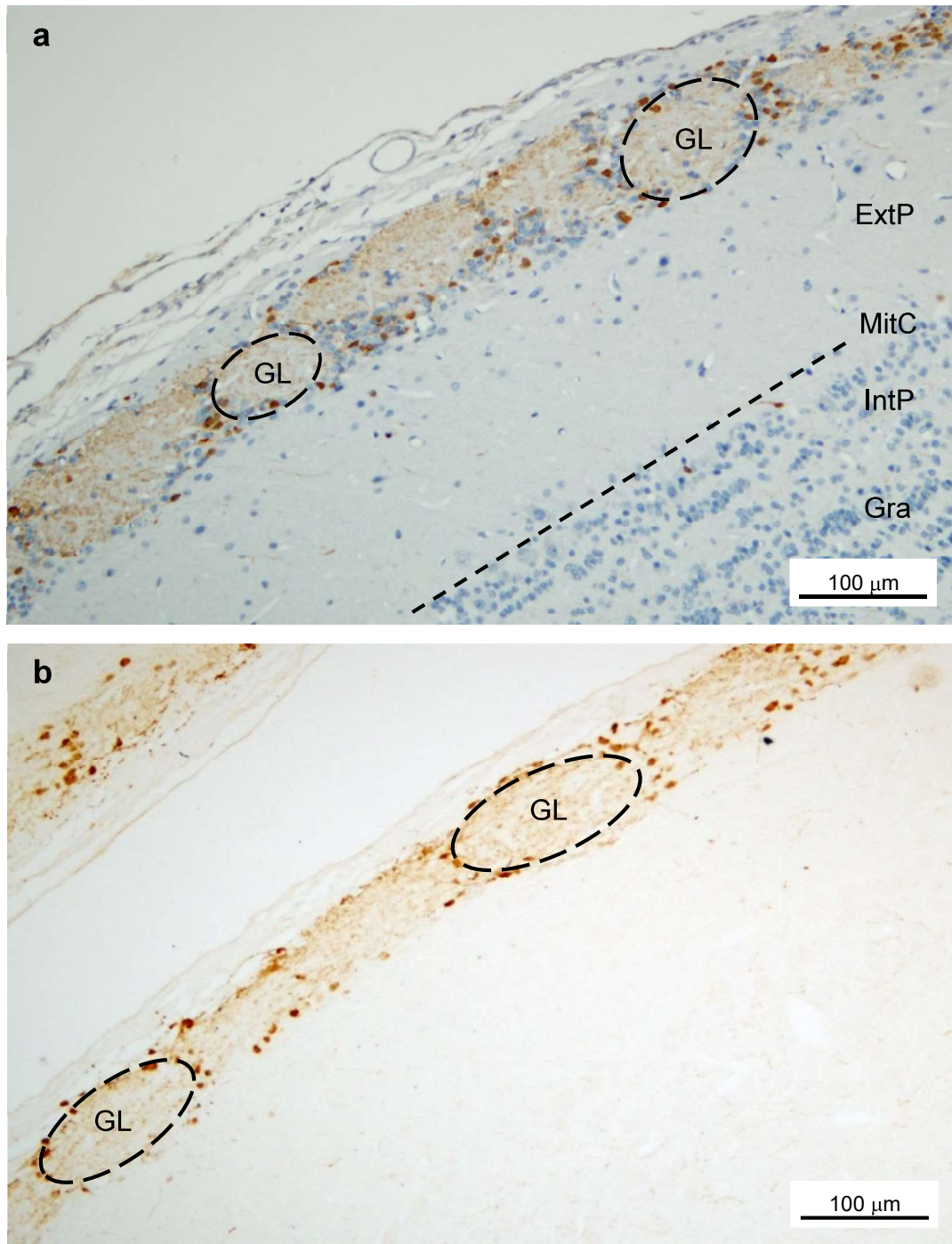


Fig. 2 TH immunoreactivity in the glomerular layer of the OB. (a) represents a counterstained slice with more defined cell layers of the OB. In the glomerular layer it is possible to observe the glomerulus (dashed circles, GL) and above this layer there is the external plexiform (ExtP), mitral cell (dashed line, MitC), internal plexiform (IntP) and granular (Gra) layers. (b) shows the specificity of the TH immunoreactivity in the glomerulus and periglomerular cells. Immunoreactivity for TH, optical microscopy, 200x.

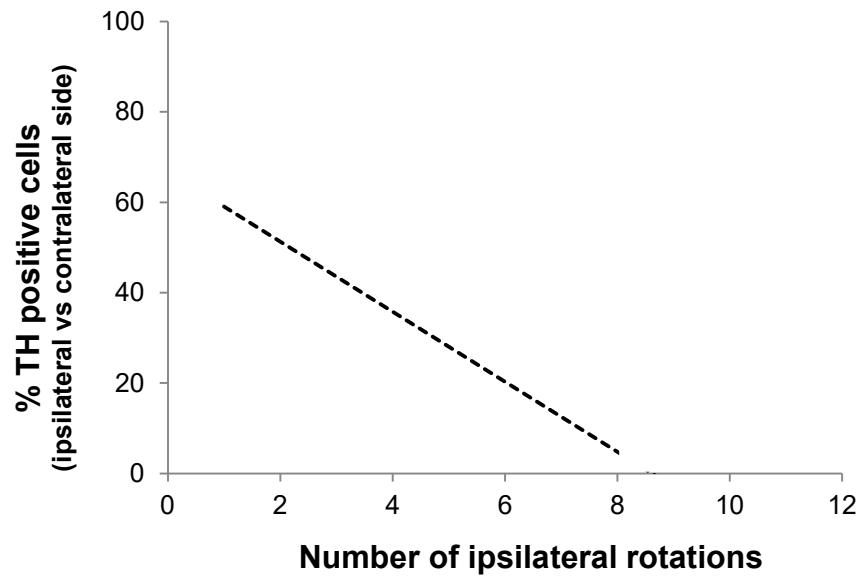


Fig. 3 Negative correlation between the percentage of remaining dopaminergic neurons (TH positive cells) in the SNpc of lesioned animals and the number of ipsilateral rotations, a hallmark of the hemiparkinsonian 6-OHDA model. No significant correlation found when Pearson's correlation was performed ($r = -0.66$ and $p = 0.33$).

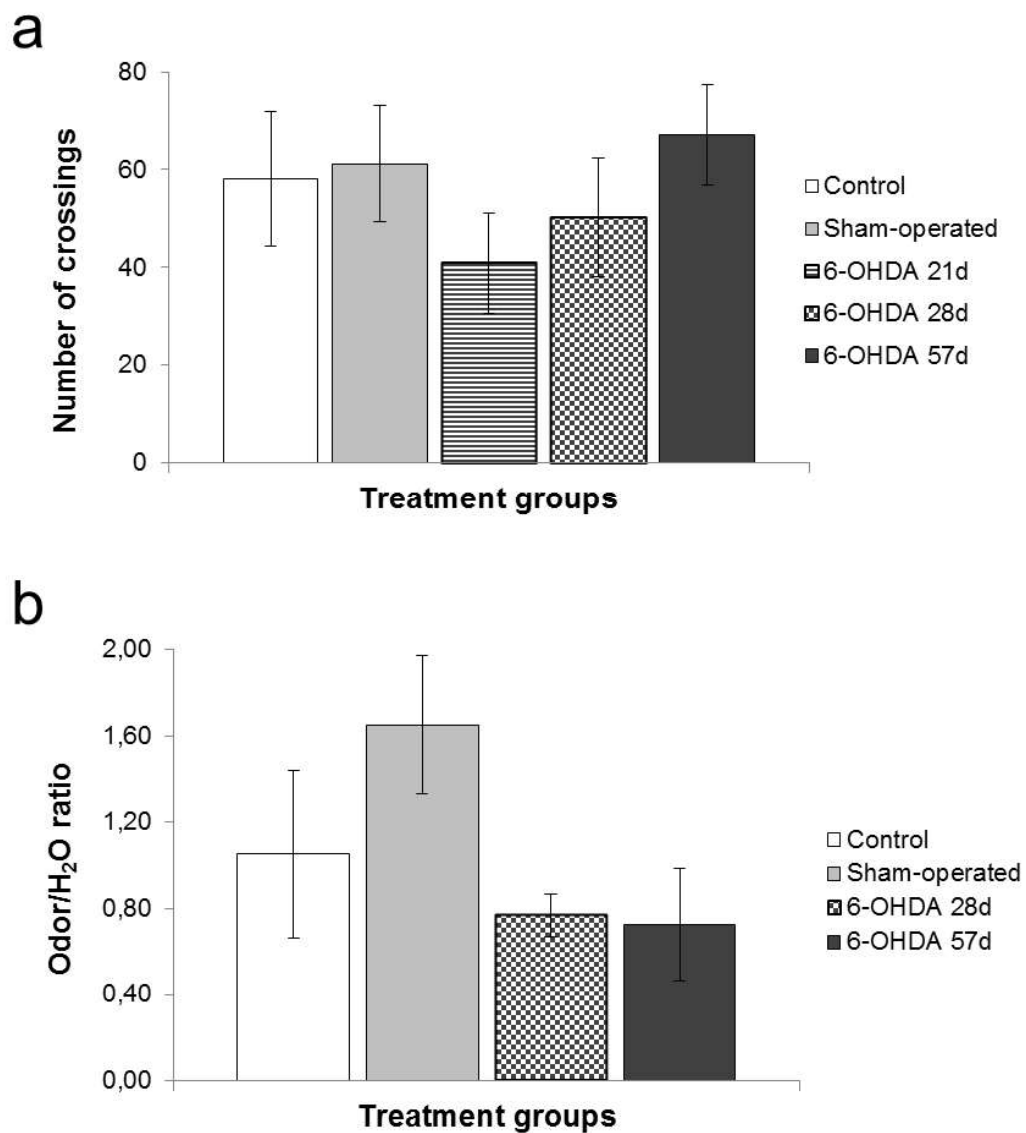


Fig. 4 Effect of 6-OHDA microinjection in spontaneous locomotor activity (n=5-6 animals per group) and olfactory discrimination ability (n=3-4 animals in each group) of rats. Data is shown as mean \pm S.E.M of total number of crossing (a) and ratio (odor or distilled water) between time spent each corner of the apparatus (b), respectively. No statistical differences observed for both tasks.

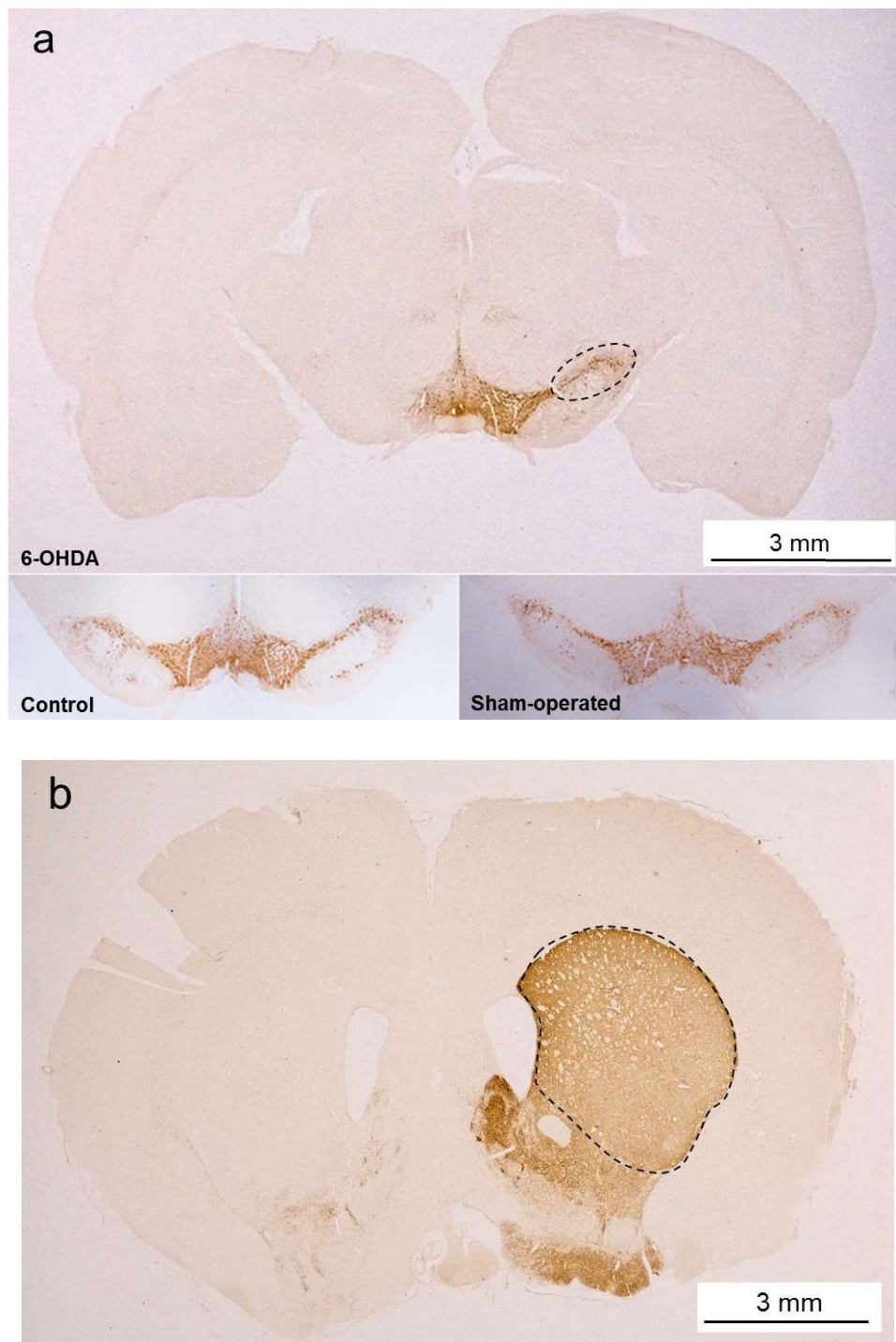


Fig. 5 TH immunoreactivity of the remaining dopaminergic neurons in the SNpc (dashed circled area in A) and fibers in the ST (dashed circled area in B) of 6-OHDA lesioned animals. Also intact SNpc ipsi- and contralateral in control and sham-operated groups (below a). Brain sections obtained from all treatment groups at 21 days after stereotaxic surgery (immunochemistry for TH).

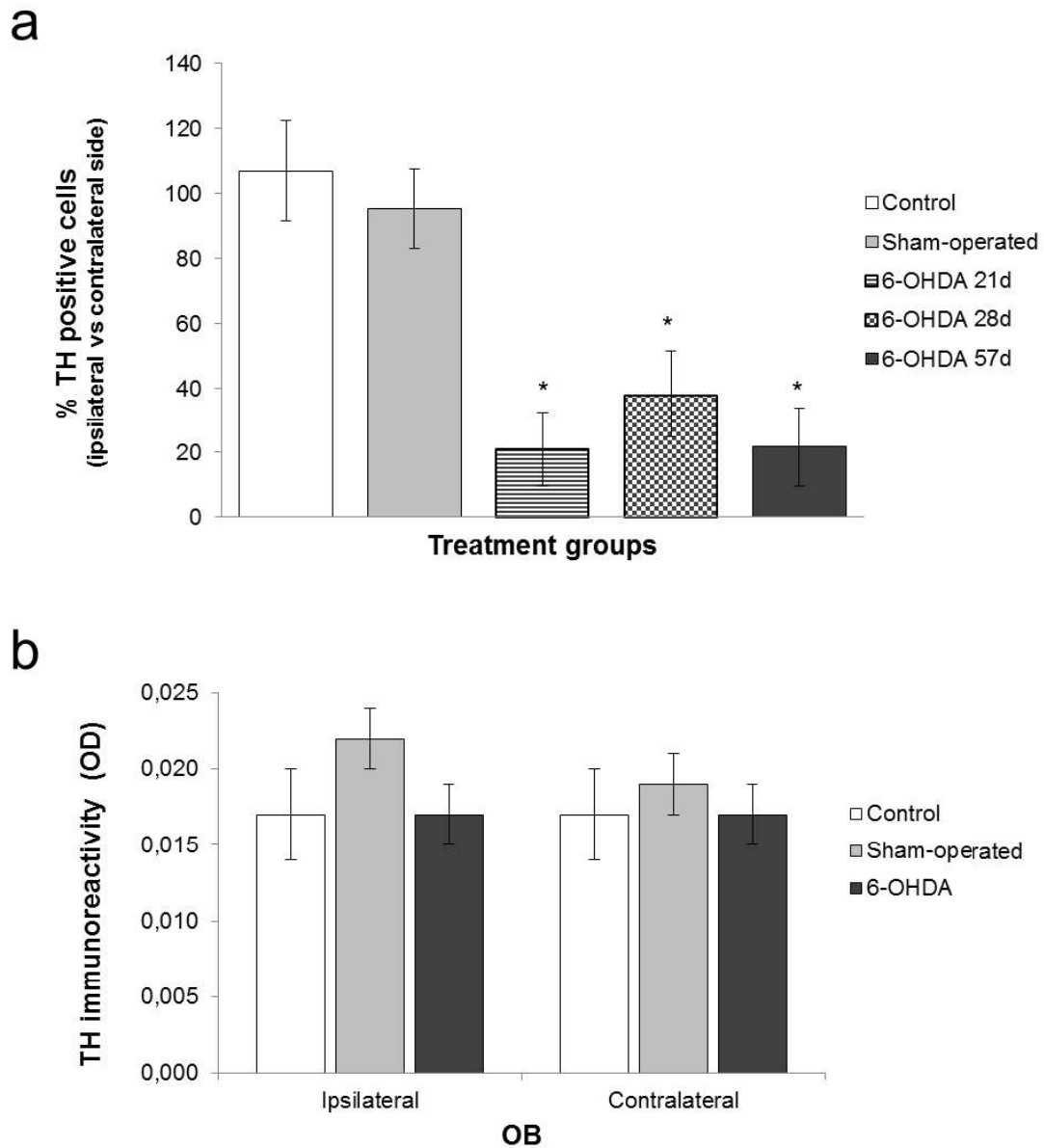


Fig. 6 Percentage of TH positive cells in all groups when SNpc ipsilateral is compared to contralateral (a). Data expressed by mean of percentage of TH positive cells \pm S.E.M. (* $p < 0.001$ when each 6-OHDA group is compared to control and sham-operated groups, n of approximately 8 per group). OD in the OB in the ipsi- and contralateral sides after 6-OHDA microinjection (b). No statistical differences were found in the OD of the glomerular layer in the OBs, data expressed by mean \pm S.E.M (n of approximately 9 per group).

4. Considerações finais


O presente estudo possibilitou a implementação de um modelo experimental para futuros estudos na área das doenças neurodegenerativas, mais especificamente da DP. Assim, o próximo passo será aprimorar as formas de avaliação do modelo, tanto do ponto de vista comportamental, quanto do histopatológico. Cabe ressaltar a necessidade de estabelecer protocolos mais eficazes e de alta reprodutibilidade acerca da discriminação olfatória dos modelos experimentais.

Quanto às perspectivas, novos trabalhos poderão ser realizados utilizando este modelo para avaliar o envolvimento secundário de outros neurotransmissores após lesão dopaminérgica. Estes dados são importantes para o melhor entendimento dos sintomas não-motores, incluindo a hiposmia. Como ainda não se sabe qual a real etiologia da DP, novos estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na vulnerabilidade e morte dos neurônios dopaminérgicos e sobre as proteínas alteradas devem ser realizados até que esta questão esteja esclarecida.

Até o presente momento, o tratamento para a DP também não se encontra definido; porém, a levodopa é o padrão-ouro para a reposição de dopamina. Neste contexto, o modelo animal é de grande valia e pode ser incluído para que se possa melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

5. Anexos

ANEXO I - Parecer de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UFCSPA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE	
CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO	
1) PROTOCOLO Nº: 087/12	Parecer 144/12
2) DATA DO PARECER: 11/07/12	
3) TÍTULO DO PROJETO:	
Injeção intraestriatal de 6OHDA em ratos a fim de avaliar e estabelecer um modelo experimental da Doença de Parkinson	
4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:	
Profª. Drª. Arlete Hilbig	
5) RESUMO DO PROJETO:	
O projeto visa estabelecer um modelo experimental da doença de Parkinson em ratos por administração de 6OHDA intraestriatal e unilateral. Serão utilizados 66 ratos Wistar machos, os quais, após o procedimento cirúrgico serão avaliados quanto ao comportamento (motricidade sobre a grade, campo aberto e discriminação olfatória). Em 14, 21 e 56 dias após a indução da lesão, os animais serão sacrificados para posterior realização de imunoistoquímica.	
6) OBJETIVOS DO PROJETO:	
Estabelecer modelo experimental de DP em ratos "seguido" da administração da neurotoxina 6OHDA intraestriatal e unilateral.	
7) FINALIDADE DO PROJETO:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:	
Título	<input type="checkbox"/> Adequado <input checked="" type="checkbox"/> Comentários
Introdução	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada <input type="checkbox"/> Comentários
Objetivos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados <input type="checkbox"/> Comentários
R. 9 Semário Libi, 245 • Porto Alegre, RS • CEP 91269-170 • Fone: 0xx 51 (30) 9000 • Fax: 0xx 51 (30) 9510 • www.ufcs.br	



Relevância e Justificativa Adequados Comentários

Materiais e Métodos Adequados Comentários

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B C D E

Justifique:

Procedimentos que podem causar dor ou estresse, necessitando a administração de anestésico e analgésico.

Espécie: **Número Amostral:**

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:



UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Laboratório):

UFCSPA.

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade Ratos Wistar
	Wistar	M	66

12) RECOMENDAÇÃO:

Aprovado


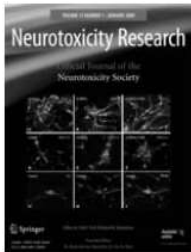
Com Pendência

Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

Projeto vinculado ao PPG Patologia da UFCSPA.

ANEXO II - Normas para submissão na revista: Neurotoxicity Research

7/4/2014	Neurotoxicity Research
	www.springer.com
Ciências Biomédicas - Neuroscience Neurotoxicity Research	
	<h3>Neurotoxicity Research</h3>
Neurodegeneration, Neuroregeneration, Neurotrophic Action, and Neuroprotection	
Editor-in-Chief: R. M. Kostrzewa	
ISSN: 1029-8428 (print version)	
ISSN: 1476-3524 (electronic version)	
Journal no. 12640	
<hr/> Instructions for Authors	
<h3>Instructions for Authors</h3>	
MANUSCRIPT SUBMISSION	
Manuscript Submission	
<p>Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.</p>	
Permissions	
<p>Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.</p>	
Online Submission	
<p>Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.</p>	
<p>Submission also implies that the work's publication has been approved by the principle investigator(s) for the grant(s) supporting the project.</p>	
TITLE PAGE	
Title Page	
The title page should include:	
http://www.springer.com/biomed/neuroscience/journal/12640?print_view=true&detailsPage=pl_tci_1711011	1/10

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ☒ Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- ☒ Use italics for emphasis.
- ☒ Use the automatic page numbering function to number the pages.
- ☒ Do not use field functions.
- ☒ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- ☒ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- ☒ Use the equation editor or MathType for equations.
- ☒ Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

- ⊕ Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- ⊕ Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- ⊕ Genus and species names should be in italics.
- ⊕ Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- ⊕ Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.:
 Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities
 Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)
 Bold for vectors, tensors, and matrices.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

⊕ Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325-329

⊕ Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

⊕ Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

⊕ Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern*

7/4/2014

Neurotoxicity Research

genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

☛ Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

☛ Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

TABLES

- ☛ All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- ☛ Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ☛ For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- ☛ Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- ☛ Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

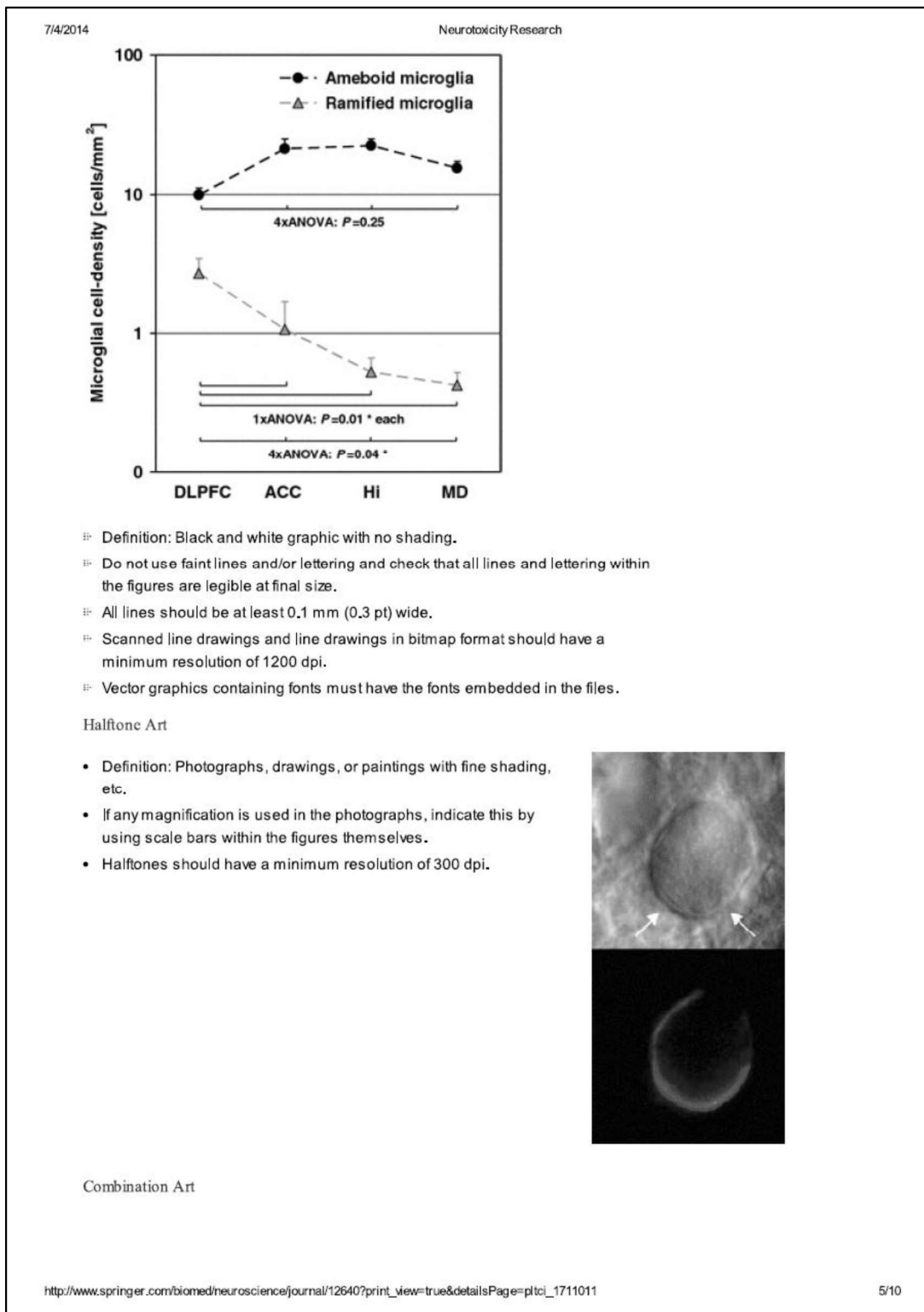
ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

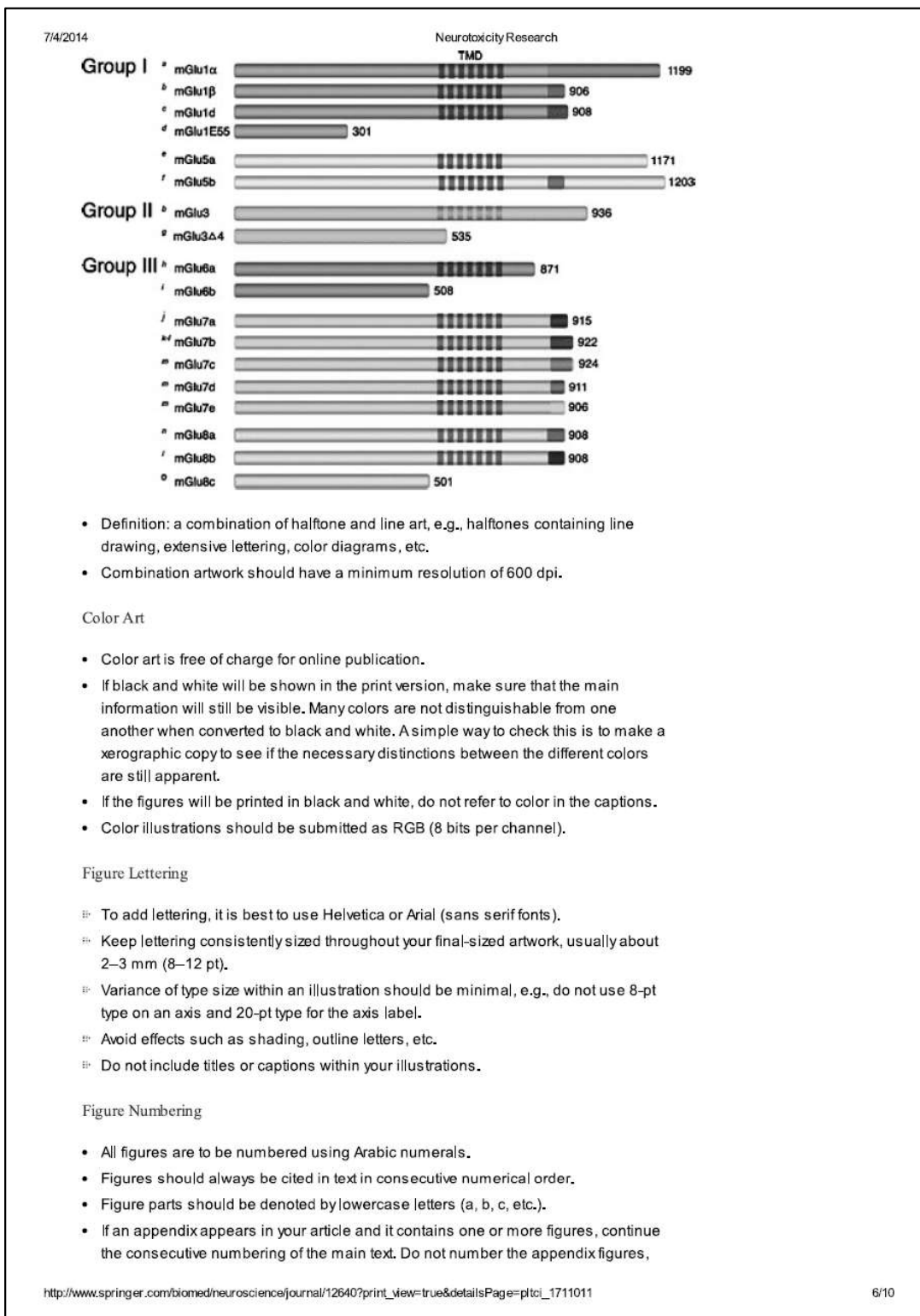
For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- ☛ Supply all figures electronically.
- ☛ Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- ☛ For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- ☛ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- ☛ Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art





"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- ▷ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ▷ Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ▷ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ▷ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ▷ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other

7/4/2014

Neurotoxicity Research

problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

7/4/2014

Neurotoxicity Research

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

When applicable, studies must have been performed in accordance with the ethical standards in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH).

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open

Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.