

MARIANA HERNANDES FORTES

EFEITOS GERADOS PELA DIMINUIÇÃO DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS
NIGRAIS E PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL NO DESEMPENHO
OLFATÓRIO EM RATOS.

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de mestre em Fisiologia, curso
de Pós-graduação em Fisiologia, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo M. S. Lima
Co-orientadora: Prof.^a Dra. Anete Curte Ferraz

CURITIBA 2014



Ata da defesa de dissertação de mestrado de MARIANA HERNANDES FORTES

Aos três dias do mês de abril do ano de dois mil e quatorze, foi realizada no Anfiteatro número 10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **Mariana Hernandez Fortes**, intitulada “**EFEITOS SOBRE O DESEMPENHO OLFATÓRIO GERADOS PELA ASSOCIAÇÃO ENTRE LESÃO DA VIA NIGROESTRIATAL E PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL**”. A abertura teve início às 14h00min pelo Presidente da Banca Examinadora e Orientador da candidata, Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima. O Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra à aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, o Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima passou à palavra a primeira examinadora, Professora Doutora Maria Aparecida Barbato Vital do Departamento de Farmacologia da UFPR. Na sequência, passou a palavra à segunda examinadora, Professora Doutora Luana Fischer do Departamento de Fisiologia da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, o Presidente, Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “aprovada”, habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 5º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Marcelo de Meira Santos Lima, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 03 de abril de dois mil e quatorze.




Professora Doutora Maria Aparecida Barbato Vital

UFPR- Membro Titular



Professora Doutora Luana Fischer

UFPR - Membro Titular



Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora



P A R E C E R

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **MARIANA HERNANDES FORTES** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à aprovação da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 03 de abril de dois mil e quatorze.

Professora Doutora Maria Aparecida Barbato Vital
UFPR- Membro Titular

Professora Doutora Luana Fischer
UFPR - Membro Titular

Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Dedico esse trabalho à minha família, ao meu amado marido Lucas por me apoiar sempre tanto afetivamente quanto profissionalmente, e aos meus colegas de laboratório e orientador o Prof. Marcelo que me guiou pelos caminhos da ciência brilhantemente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo M. S. Lima, pelo acompanhamento incansável, por me receber em seu grupo de pesquisa, oferecendo a oportunidade e os ensinamentos científicos dos quais nunca esquecerei.

À todos os membros do laboratório de neurofisiologia pela colaboração, em especial meus colegas Adriano Targa Dias Santos, Laís Soares Rodrigues e Ana Carolina Duarte Nosedá que tanto me ajudaram nas atividades cotidianas.

Aos professores do Departamento de Fisiologia, em especial Dra. Anete Curte Ferraz minha co-orientadora. Também aos professores das disciplinas. Ao Dr. Fernando Mazzilli Louzada e à Dra. Rosana N. de Moraes os seus ensinamentos sobre didática marcarão toda a minha vida acadêmica. Ao Dr. Anderson J. M. Andrade pela disciplina de estatística administrada com brilhantismo e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia pela boa vontade durante toda a realização dessa tese.

Agradeço a CAPES por proporcionar suporte financeiro, sem o qual esse trabalho se tornaria inviável.

E por fim porém em igual importância, a todos aqueles que indiretamente me ajudaram nessa caminhada, à minha família e amigos. À minha querida amiga Flávia Rolim de Moura e tantos outros que me acompanham e torcem por mim.

RESUMO

Sabe-se que o início da doença de Parkinson (DP) não ocorre com a perda da projeção dopaminérgica no estriado pela substância nigra, como é classicamente definida. Outras estruturas são comprometidas previamente, apresentando um padrão evolutivo específico, permitindo a divisão em estágios. Neste contexto diversas alterações que antecedem os sintomas motores, são apontados como possíveis indicadores desta doença, que incluem disfunções olfatórias e distúrbios comportamentais do sono REM. O estudo destas variáveis possibilita a antecipação do diagnóstico e o surgimento de novas estratégias terapêuticas. Os distúrbios olfatórias podem ser considerados um dos seus fatores de risco, sendo encontradas em fases iniciais da doença. As alterações do sono, principalmente sono REM, são também apontados como sinais prodrômicos para DP. Tendo grande importância devido sua especificidade elevada. As bases fisiológicas para estas disfunções na doença de Parkinson ainda não foram totalmente esclarecidas, este estudo tem como objetivo investigar os efeitos isolados ou sinérgicos produzidos pela privação do Sono Paradoxal e da lesão da via nigroestriatal, produzida pela infusão da neurotoxina Rotenona em ratos Wistar, sobre o desempenho olfatório. A administração da neurotoxina na substância negra se deu por cirurgia estereotáxica, os sham receberam apenas veículo Dimetilsulfóxido (DMSO). Os testes comportamentais foram aplicados antes, após a privação de sono paradoxal (PSP) e após o período rebote. Os resultados mostram que a lesão da via nigroestriatal (perda neuronal de 30%) foi capaz de gerar prejuízos ao desempenho olfatório, sem alterar o comportamento motor no período avaliado. A PSP, nos dois diferentes tempos, foi capaz de produzir efeitos deletérios no desempenho olfatório dos ratos, porém em menor magnitude quando comparado ao efeito da diminuição de neurônios dopaminérgicos na substância negra. O sono rebote foi capaz de reverter o prejuízo no teste de discriminação com odor familiar. Houve aumento da motricidade apenas após PSP de 48 h para o grupo sham indicando hipersensibilidade de receptores dopaminérgicos.

Palavras-chave: doença de Parkinson; discriminação olfatória; sono REM; sinais prodrômicos.

ABSTRACT

It is known that the onset of Parkinson's disease (PD) occurs before the loss of dopaminergic projections to the striatum, as classically defined. Other structures are compromised previously, with a specific evolutionary pattern, allowing the division into stages. In this context several changes that precede motor symptoms are regarded as possible prodromal indicators of this disease, including olfactory dysfunction and REM sleep behavioral disorder. The study of these variables enables the anticipation of new diagnostic and development of new therapeutic strategies. The olfactory disorders can be considered one of its risk factors and are found in early stages of the disease. The changes in sleep, especially REM sleep, are also reported to prodromal signs for PD as well. Having great importance due its high specificity. The physiological basis for these disorders in Parkinson's disease have not been fully clarified, this study aims to investigate the isolated or synergistic effects produced by paradoxical sleep deprivation and lesion of the nigrostriatal pathway, produced by infusion of the neurotoxin Rotenone in rats on a olfactory behavior. The administration of the intranigral neurotoxin was made by stereotaxic surgery, sham received only dimethylsulfoxide vehicle (DMSO). Behavioral tests were applied before, after paradoxical sleep deprivation and after the rebound period. The results show that the damage to the nigrostriatal pathway (with neuronal loss of 30 %) was able to generate damage to the olfactory performance without altering motor behavior during the evaluated period. The PSP, in its two different times, was able to produce negative effects in the rat olfactory performance, but at a lower magnitude when compared to the effect of the decrease of dopaminergic neurons in the substantia nigra. The rebound sleep was able to reverse the impairment. There was increased motility PSP only after 48 h for the sham group indicating hypersensitivity of dopaminergic receptors.

Keywords: Parkinson's disease, olfactory discrimination; REM sleep; prodromal signs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	ESQUEMA MOSTRANDO O PADRÃO EVOLUTIVO DA DP IDIOPÁTICA.....	16
FIGURA 2-	NEUROTRANSMISSORES E NEUROMODULADORES NO BULBO OLFATÓRIO.....	22
FIGURA 3-	PARÂMETROS OLFATÓRIOS, (■) DETECÇÃO, (●) DISCRIMINAÇÃO E (▲) IDENTIFICAÇÃO.....	30
FIGURA 4-	PORCENTAGEM DE ACERTOS PARA CADA ODOR NO TESTE OLFATÓRIO EM PACIENTES COM RBD (CINZA) E CONTROLES (BRANCO).....	31
FIGURA 5-	MECANISMOS DE AÇÃO DA ROTENONA.....	34
FIGURA 6-	EFEITOS A INFUSÃO DE ROTENONA EM RATOS.....	35
FIGURA 7-	ESQUEMA COM A RELAÇÃO ENTRE SONO REM, FUNÇÃO OLFATÓRIA E DP.....	36
FIGURA 8-	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENHO EXPERIMENTAL DE EXPERIMENTO 2.....	41
FIGURA 9-	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENHO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3.....	42
FIGURA 10-	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	43
FIGURA 11-	PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL PELO MÉTODO DA PLATAFORMA ÚNICA.....	44
FIGURA 12-	TESTE DE DETECÇÃO DE ODORES.....	45
FIGURA 13-	TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA.....	47
FIGURA 14-	TESTE DO CAMPO ABERTO.....	49
FIGURA 15-	RESULTADOS DO TESTE DE DETECÇÃO DE ODORES....	52
FIGURA 16-	RESULTADOS DO TESTE DO CAMPO ABERTO.....	54

FIGURA 17-	TEMPO DE PERMANÊNCIA (S) AVALIADA PELO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA UTILIZADO ODOR FAMILIAR E NÃO FAMILIAR E ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO (NÃO FAMILIAR/FAMILIAR).....	55
FIGURA 18-	DENSIDADE NEURONAL PARA NEURÔNIO TH IMUNORREATIVOS NA SNPC.....	57
FIGURA 19-	DISTÂNCIA PERCORRIDA AVALIADA PELO TESTE DE CAMPO ABERTO.....	60
FIGURA 20-	ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO (NÃO FAMILIAR/FAMILIAR) AVALIADO PELO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA UTILIZADO ODOR FAMILIAR E NÃO FAMILIAR NOS TEMPOS 24H E 48H.....	64
FIGURA 21-	ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO (NÃO FAMILIAR/FAMILIAR) AVALIADO PELO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA UTILIZADO ODOR FAMILIAR E NÃO FAMILIAR, COMPARAÇÃO ENTRE OS DOS TEMPOS DE PSP.....	65
FIGURA 22-	ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO (LIMÃO/ÁGUA) AVALIADO PELO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA MODIFICADO UTILIZADO ODOR LIMÃO E ÁGUA NOS TEMPOS 24H E 48H.....	69
FIGURA 23-	ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO (LIMÃO/ÁGUA) AVALIADO PELO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA UTILIZADO ODOR LIMÃO E ÁGUA, COMPARAÇÃO ENTRE OS DOS TEMPOS DE PSP.....	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	MARCADORES PRÉ-CLÍNICOS E NÍVEL DE EVIDÊNCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE.....	17
TABELA 2-	SELEÇÃO DE ARTIGOS QUE RELACIONAM A OLFAÇÃO COM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS (PRINCIPALMENTE DP) E OUTROS SINAIS PRÉ-CLÍNICOS.....	22
TABELA 3-	SELEÇÃO DE ARTIGOS QUE RELACIONAM AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DO SONO REM COM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS (PRINCIPALMENTE DP) E OUTROS SINAIS PRÉ-CLÍNICOS.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	-	Serotonina
6-OHDA	-	6-hidroxidopamina
ACH	-	Acetilcolina
ANOVA	-	Análise de Variância
AP	-	Antero-posterior
CARN	-	Carnosina
CCK	-	Colecistoquinina
DA	-	Dopamina
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DOPAC	-	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DP	-	Doença de Parkinson
DV	-	Dorso-ventral
EEG	-	Eletroencefalograma
EMG	-	Medida por eletromiografia
ENK	-	Encefalina
EOG	-	Eletrooculografia
GLU	-	Glutamato
HVA	-	Ácido homovanílico
LHRH	-	Hormônio liberador do hormônio luteinizante
ML	-	Médio-lateral
MPTP	-	1-metil-4-fenil- 1,2,3,6-tetrahidropiridina
NE	-	Noradrenalina
OMP	-	Proteína de marcador olfatório
PG CELL	-	Célula periglomerular
PSP	-	Privação de sono paradoxal
RBD	-	Distúrbio comportamental do sono REM

REB	-	Rebote
REM	-	Sono de movimentos oculares rápidos
SNPC	-	Substância negra pars compacta
SOM	-	Somastotatina
SP	-	Substância p
TAUR	-	Taurina
TH	-	Tirosina hidroxilase
TH-IR	-	Tirosina hidroxilase imunorreativos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	FASE PRODRÔMICA DA DOENÇA DE PARKINSON.....	18
1.2	DISTÚRBIOS OLFATÓRIOS NA DOENÇA DE PARKINSON.....	20
1.3	O SONO E A DOENÇA DE PARKINSON.....	26
1.4	DISTÚRBO COMPORTAMENTAL DO SONO REM (RBD).....	28
1.5	MECANISMOS NEURONAIS DE REGULAÇÃO DE SONO.....	30
1.6	IMPACTOS DO SONO SOBRE AS ALTERAÇÕES OLFATÓRIAS – PRIVAÇÃO DE SONO REM/PARADOXAL.....	32
1.7	ROTENONA COMO MODELO ANIMAL PARA DOENÇA DE PARKINSON.....	34
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4	METODOLOGIA	41
4.1	ANIMAIS.....	41
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	42
4.2.1	Experimento 1.....	42
4.2.2	Experimento 2.....	42
4.2.3	Experimento 3.....	43
4.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	45
4.4	PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL.....	46
4.5	TESTE DE DETECÇÃO DE ODORES.....	47
4.6	TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA.....	48
4.7	TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA MODIFICADO.....	49
4.8	TESTE DO CAMPO ABERTO.....	50

4.9	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE NO MESENCÁFALO VENTRAL.....	51
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5	RESULTADOS.....	54
5.1	EXPERIMENTO 1.....	54
5.2	EXPERIMENTO 2.....	55
5.2.1	Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase no mesencéfalo ventral.....	58
5.3	EXPERIMENTO 3.....	60
5.3.1	Avaliação dos parâmetros motores – teste do campo aberto.....	60
5.3.2	Avaliação do desempenho olfatório - teste de discriminação olfatória.....	62
6	DISCUSSÃO.....	74
7	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
	APÊNDICE.....	89

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva que tem como característica fisiopatológica clássica a redução de neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc). Macroscopicamente essa alteração caracteriza-se pela despigmentação na porção ventrolateral desta estrutura (LANG e LOZANO 1998; ICKENSTEIN et al. 1999; LANE e DUNNETT 2008; PONSEN et al. 2010). Esses neurônios enviam aferências para o estriado dorsal (caudado/putâmen), assim os níveis estriatais de dopamina (DA), bem como de seus principais metabólitos como o ácido homovanílico (HVA) e o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) estão diminuídos (LANE e DUNNETT 2008; LANG e LOZANO 1998). Outra característica fisiopatológica importante diferencia de outras doenças neurodegenerativas da DP é a presença de inclusões intracitoplasmáticas neuronais de caráter eosinofílico, constituídas por várias estruturas de natureza protéica (por exemplo, α -sinucleína e ubiquitina), denominadas corpúsculos de Lewy e neuritos de Lewy (BRAAK et al. 2003a).

Estudos fisiopatológicos sugerem que essas alterações progridem até que os sintomas clássicos sejam evidenciados. Essa evolução da lesão segue um padrão topográfico previsível com deposições protéicas, ocorrendo em diferentes núcleos partindo do tronco encefálico e indo em direção ao prosencéfalo (BRAAK et al. 2003a; BRAAK et al. 2004). Nesse contexto, as primeiras lesões se

desenvolvem quase que simultaneamente em dois locais, i.e., no núcleo motor dorsal do nervo vago e no bulbo olfatório, juntamente com porções relacionadas do núcleo olfatório (BRAAK et al. 2002; BRAAK et al. 2003a). Nestas primeiras fases, a lesão compromete também áreas do tronco encefálico como o núcleo pedúnculo-pontino, envolvido majoritariamente no controle do ciclo vigília-sono, em particular na regulação do sono de movimentos oculares rápidos (REM¹) (BRAAK et al. 2002; BRAAK et al. 2003a; BRAAK et al. 2003b; BRAAK et al. 2004; MENA-SEGOVIA et al., 2004).

Os achados clínicos clássicos, que levam ao diagnóstico, são caracterizados pelas alterações motoras incapacitantes para o paciente, sendo eles: bradicinesia, rigidez muscular, acinesia, tremor em repouso e anormalidades posturais e de marcha (FAHN 2003). Assim a evolução da DP pode ser dividida numa fase mais avançada e sintomática (também chamada de motora ou clínica), e numa fase inicial e conhecida por pré-sintomática (prodrômica, pré-motora ou pré-clínica) (BRAAK et al. 2004).

O termo pré-sintomático ou pré-motor tem sido usado para definir alguns sinais e sintomas clínicos não motores, bem como anormalidades fisiológicas que podem estar previamente presentes às alterações motoras clássicas. Embora essas características não sejam universais, observam-se suas manifestações em

¹ O termo sono REM deriva do termo inglês *rapid eye movements sleep* que consagradamente é utilizado na literatura para designar essa fase do sono, e será igualmente utilizado ao longo desse trabalho. Salientamos que também pode o sono REM ser chamado de sono paradoxal, devido à similaridade de seu padrão eletrofisiológico com a vigília. Em geral, prefere-se utilizar o termo sono REM para designar essa fase em humanos e sono paradoxal para o mesmo fim, porém quando caracterizada em animais de experimentação.

diferentes graus na maioria destes pacientes, especialmente antes da confirmação do diagnóstico, o que confere grande valor preditivo a esses achados, tornando-os importantes marcadores pré-motores, portanto indicando a fase inicial da doença. Esses achados podem ser hiposmia, distúrbio comportamental do sono REM (RBD)², constipação, depressão, entre outros (BERG e POEWE 2012; POSTUMA et al. 2012; SIDEROWF e LANG 2012, LIMA et al. 2012; LIMA 2013). Uma melhor compreensão destes elementos pode ser útil para o desenvolvimento de recursos que possibilitem tanto o diagnóstico precoce, quanto o desenvolvimento de tratamentos que modifiquem o curso desta doença (SIDEROWF e LANG 2012). No momento, não há um consenso sobre quais características compõem essa fase inicial. Apesar destas alterações serem encontradas em outras doenças neurodegenerativas, na DP elas se apresentam de forma mais severa (POSTUMA et al. 2012).

Neste estudo iremos tratar de forma integrada dois destes achados pré-motores: as alterações da olfação e os distúrbios do sono, ambos com forte presença na DP. Salienta-se ainda que a avaliação da função olfatória é considerada um teste sensível, mas não específico para o diagnóstico da DP (POSTUMA et al. 2012; SIDEROWF et al. 2012), portanto, abrindo uma nova janela de oportunidades para estudos que visam a elucidação dessas funções neurofisiológicas, principalmente dentro de um contexto de neurodegeneração.

² A sigla RBD vem do termo em inglês "REM behavior disorder" optou-se utilizá-lo neste estudo pois é a sigla consagrada e vastamente utilizada na literatura.

1.1 FASE PRODRÔMICA DA DOENÇA DE PARKINSON

Desde que foi proposto o novo modelo fisiopatológico para evolução da DP por Braak e colaboradores (2003a), o entendimento desta patologia tomou novos rumos (BRAAK et al. 2003a; SIDEROWF e LANG 2012). Sabe-se que seu início não ocorre com a redução das projeções dopaminérgicas no estriado pela SNpc, como previamente estabelecido.

A figura 1 mostra esse padrão ascendente de evolução das lesões e os seis estágios preconizados da DP. No estágio 1 as lesões atingem porções inferiores do tronco encefálico, como o núcleo motor dorsal do nervo vago e núcleo olfatório. No estágio 2 os danos chegam na região superior do tronco encefálico, como o locus coeruleus. No estágio 3, o mesencéfalo (área tegmental ventral e SNpc) bem como porções basais do procérebro (amígdala e núcleo magnocelular) passam a

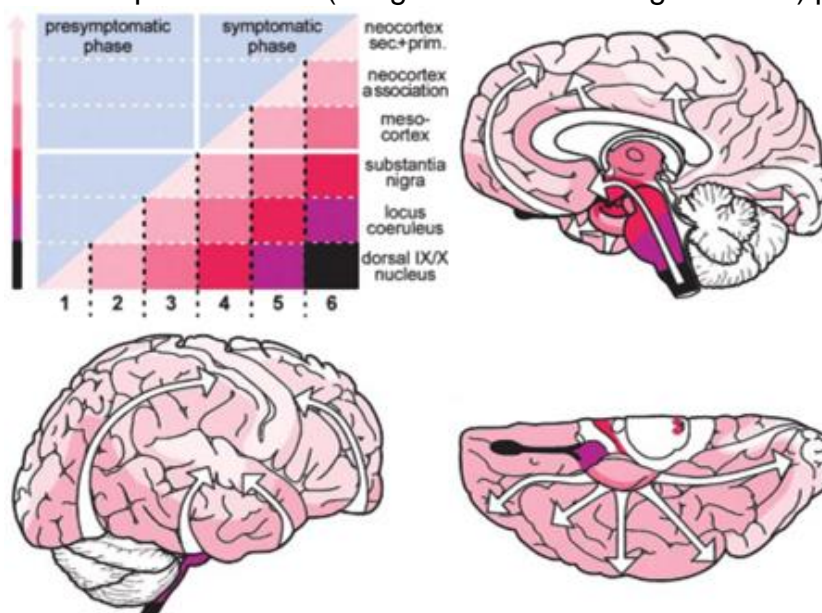


FIGURA 1- ESQUEMA MOSTRANDO O PADRÃO EVOLUTIVO DA DP IDIOPÁTICA. FONTE: Retirado de Braak et al. (2003A)

ser atingidos. A partir do estágio 4 a degeneração alcança o córtex cerebral e progride até o sexto estágio com aumento do comprometimento cortical (BRAAK et al 2004; BRAAK et al. 2003b).

Atualmente o diagnóstico ocorre a partir do surgimento de sintomas motores decorrente do acometimento de mais de 60-70% de neurônios dopaminérgicos da SNpc (BRAAK et al. 2004; FAHN 2003; IRANZO 2013). Estudos de neuroimagem confirmam que a perda neuronal nessa região se inicia de 4-6 anos antes do aparecimento dos sintomas (PONSEN et al. 2010).

Neste contexto diversas alterações ou marcadores fisiopatológicos, que antecedem os sintomas motores, são apontados como possíveis indicadores desta doença neurodegenerativa e caracterizam a fase prodrômica desta doença. Estes achados incluem disfunções olfatórias, RBD, alterações autonômicas, depressão, entre outros (BERG e POEWE 2012; OLANOW e OBESO 2012; SIDEROWF e LANG 2012), tabela 1. Em particular, os distúrbios de sono e olfatórios parecem ser eminentemente pré-motores, permitindo a antecipação do diagnóstico e o surgimento de novas estratégias terapêuticas (PONSEN et al. 2004; PONSEN et al. 2010).

TABELA 1- MARCADORES PRÉ-CLÍNICOS E NÍVEL DE EVIDÊNCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE.

Marcador	Nível de evidência	Sensibilidade	Especificidade
Olfacção	Possui diversos estudos prospectivos (HAEHNER et al. 2007; PONSEN et al. 2010; ROSS et al. 2008).	61% quando associados a RBD(FANTINI et al. 2006); 82% quando associados a DP(DOUBLE et al. 2003).	83% quando associados a RBD(FANTINI et al. 2006); 82% quando associados a DP (DOUBLE et al. 2003).

Distúrbio Comportamental do Sono REM	Possui tanto retrospectivos, prospectivos.	estudos quanto	50% dos pacientes com PD tem RBD (POSTUMA et al. 2012).	Mais de 65% de risco de desenvolver DP em 10 anos (POSTUMA et al. 2012).
--------------------------------------	--	----------------	---	--

Fonte: modificado de Postuma et al. (2012).

1.2 DISTÚRBIOS OLFATÓRIOS NA DOENÇA DE PARKINSON

Os distúrbios olfatórios na DP foram descritos pela primeira vez por Ansari e colaboradores em 1975 (MESHOLAM et al. 1998; PONSEN et al. 2004), e podem ser considerados um dos seus sintomas prodrômicos (HAEHNER et al. 2007; PONSEN et al. 2010; ROSS et al. 2008). As alterações abrangem todos os parâmetros da olfação, como a detecção, discriminação e a identificação de odores (PONSEN et al. 2004; SAIFEE et al. 2010; TISSINGH et al. 2001). A hiposmia e/ou anosmia podem ser considerados sintomas prodrômicos (pré-clínicos) da DP (PONSEN et al. 2004), sendo encontradas majoritariamente em fases iniciais. Diversos estudos prospectivos constataram que as alterações olfatórias podem preceder o aparecimento da DP, estão descritos na tabela 2 (SIDEROWF et al. 2012; ROSS et al. 2008; HAEHNER et al. 2007). Outros estudos avaliaram familiares de pacientes com DP e reportam a ocorrência de déficits olfatórios, mesmo nos familiares não sintomáticos, indicando influência hereditária desta condição (PONSEN et al. 2010).

As vantagens do emprego da avaliação olfatória para o diagnóstico precoce da DP são o custo baixo, a fácil interpretação e execução dos testes o que possibilita aplicação na prática clínica, mantendo alta sensibilidade (SILVEIRA-

MORIYAMA et al. 2008; FANTINI et al. 2006), porém pouca especificidade (PONSEN et al. 2010). Haja vista que os prejuízos olfatórios não são achados exclusivos, podendo ser encontrados em outros distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer (HAWKES 2006; MESHOLAM et al. 1998); demência com corpos de Lewy (KATZENSCHLAGER e LEES 2004); coréia de Huntington (HAWKES 2006; MESHOLAM et al. 1998), esclerose lateral amiotrófica (MESHOLAM et al. 1998) e síndromes parkinsonianas (HAWKES 2006). Sua apresentação é diferenciada em cada uma delas (MESHOLAM et al. 1998). Na doença de Alzheimer, por exemplo, a severidade desta disfunção está relacionada com a progressão da doença, o que não acontece na DP que possui progressão constante (MESHOLAM et al. 1998). Na atrofia de múltiplos sistemas o distúrbio é moderado comparando-se à DP e ainda, indistinguível de síndromes cerebelares de outras etiologias, incluindo a ataxia espinocerebelar (KATZENSCHLAGER e LEES 2004). Já as características deste comprometimento na demência com corpos de Lewy é muito semelhante às da DP (KATZENSCHLAGER e LEES 2004).

A prevalência das alterações olfatórias na DP é de 70-100% (KATZENSCHLAGER e LEES 2004; POSTUMA e MONTPLAISIR 2010; SILVEIRA-MORIYAMA et al. 2008) e o seu desenvolvimento não parece estar relacionado com tipo de tratamento selecionado (KATZENSCHLAGER e LEES 2004; SUZUKI et al. 2011; TISSINGH et al. 2001) nem com o estado on ou off em pacientes tratados com levodopa (KATZENSCHLAGER e LEES 2004; SAIFEE et al. 2010). Há evidências de que o reconhecimento de alguns odores esteja mais prejudicado do que outros, sugerindo que o comprometimento poderia gerar uma

hiposmia seletiva, mas ainda há divergência nestes achados (DOUBLE et al. 2003). Fantini (2006) e colaboradores encontraram maior especificidade para canela (90%), tiner (98%) e gasolina (96%) com diagnóstico de RBD (outro distúrbio pré-clínico importante). Outro estudo também encontrou alto valor preditivo para incapacidade em identificar o odor de gasolina, e 30% dos pacientes não detectaram o odor de tiner, bem como de outros seis odores (banana, cebola, rosa, canela, abacaxi e fumaça) (DOUBLE et al. 2003).

As bases fisiológicas para esta disfunção olfatória encontrada na DP ainda não foram adequadamente esclarecidas. Vários estudos mostram o papel do sistema dopaminérgico na olfação, principalmente relacionada à presença de neurônios DA no bulbo olfatório e o seu papel como modulador da atividade glomerular, entre as aferências sensoriais e as células mitrais/tufosas (HUISMAN et al. 2004; MUNDIÑANO et al. 2011). Pavlis et al (2006) ressaltam que essa modulação no bulbo é localizada e apresenta caráter endógeno. A DA é liberada por interneurônios relacionados com as células mitrais, que recebem os sinais dos receptores olfatórios e formam o glomérulo (HAWKES e DOTY 2009; MUNDIÑANO et al. 2011). Esses interneurônios liberam tanto DA quanto GABA, que modularia a neurotransmissão glutamatérgica do glomérulo de forma inibitória (HUISMAN et al. 2004; MUNDIÑANO et al. 2011). Mundiñano et al. (2011) encontrou aumento de neurônios TH-ir na região glomerular na DP, que pode elucidar o mecanismo local de inibição dopaminérgica da olfação nestes pacientes. Esse aumento de neurônios localizado correlaciona com um aumento do prejuízo olfatório, pois estudos têm demonstrado, em modelos animais, que a dopamina tem efeito inibitório sobre a os

receptores dopaminérgicos (da família D2) localizados nas células mitrais no glomérulo olfatório, estas estruturas e os neurotransmissores que atuam no bulbo olfatório podem ser vistos na figura 2 (HUISMAN et al. 2004; KATZENSCHLAGER e LEES 2004; MUNDIÑANO et al 2011). Ainda não está claro se esse efeito é compensatório em resposta a uma perda de neurônios nigrais frente à lesão na DP (KATZENSCHLAGER e LEES 2004). Ainda foi encontrada perda neuronal e presença de corpúsculos de Lewy no núcleo olfatório anterior e na amígdala nos estágios iniciais da doença (KATZENSCHLAGER e LEES 2004).

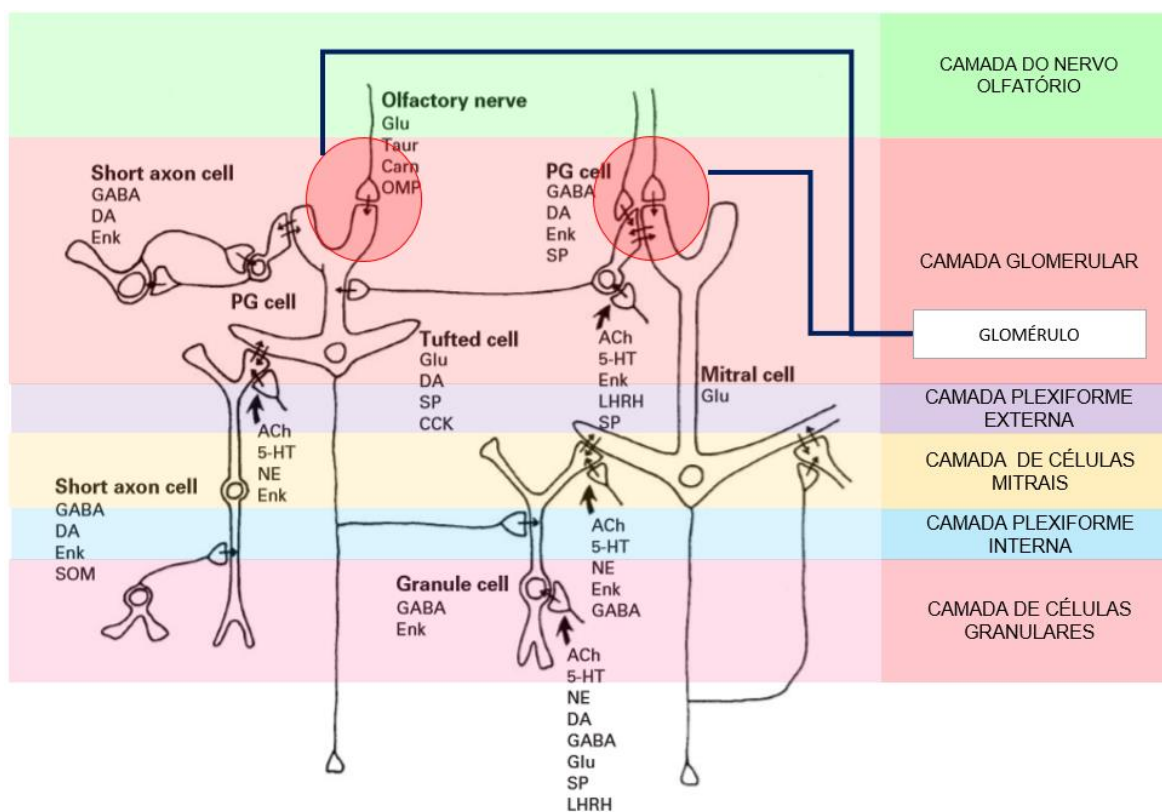


FIGURA 2- NEUROTRANSMISSORES E NEUROMODULADORES NO BULBO OLFATÓRIO.
 FONTE: Adaptado de Hawkes e Doty (2009).

TABELA 2- SELEÇÃO DE ARTIGOS QUE RELACIONAM A OLFAÇÃO COM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS (PRINCIPALMENTE DP) E OUTROS SINAIS PRÉ-CLÍNICOS.

Referência	Foco do estudo	Tipo de estudo	Amostra	Principal Achado	País da pesquisa
(BABA et al. 2012)	Avaliação da capacidade olfatória, motora e neuropsicológica e neuroimagem na doença de Parkinson.	Coorte	44 pacientes com DP.	Regiões do cérebro relacionadas com a função olfatória estão associadas com o declínio cognitivo e que hiposmia grave é uma característica clínica desta alteração que prevê o desenvolvimento posterior de demência da doença de Parkinson.	Japão
(BANNIER et al. 2012)	Detectar alucinações olfatórias através de questionário e avaliar desempenho olfatório.	Coorte	87 DP; 40 controles	Prevalência de alucinações olfatórias em 10% dos pacientes com DP. E diminuição na identificação e detecção de odores.	França

(BUSSE et al. 2012)	Combinar a sensibilidade e especificidade diagnóstica dos sinismotor, hiposmia e substância negra (SN) hiperecogenicidade no ultra-som transcraniano na DP.	Coorte	632 pessoas com parkinsonismo (453 DP)	A sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos no diagnóstico de DP para hiposmia 75%, 70% e 88%. A avaliação combinada de assimetria motora, hiposmia e SN hiperecogenicidade melhora a especificidade do diagnóstico e permite o diagnóstico precoce da DP.	Alemanha
(SIDEROWF et al. 2012)	Testar a associação entre disfunção olfatória e outras características prodromáticas de DP.	Coorte multicêntrico	4.999 pessoas sem o diagnóstico de DP, maiores de 50 anos (parentes de primeiro grau de paciente com DP e sem história familiar)	Hiposmia está associada a outros sinais não-motores da DP em indivíduos não diagnosticados., como RBD, depressão, e outras.	Estados unidos
(SUZUKI et al. 2011)	Diferenciar a paralisia supranuclear progressiva e atrofia de múltiplos sistemas da DP idiopática com a avaliação olfatória, analisando a sensibilidade e especificidade de um teste olfatório para a população japonesa.	Estudo transversal	94 DP; 7 portadores de paralisia supranuclear progressiva; 15 atrofia de múltiplos sistemas; e 29 controles.	O desempenho olfatório foi menor na DP que nas outras patologias e controles, sendo potencialmente útil não só para a detecção de déficit olfatório na DP, mas também para a diferenciação de DP com outras doenças neurodegenerativas.	Japão
(PONSEN et al. 2010)	Analisar a capacidade preditiva da combinação entre teste olfatório e exame de imagem específico para prever DP em 5 anos.	Coorte	40 pessoas com hiposmia e 38 com normosmia, selecionados a partir de 361 parentes de primeiro grau de pacientes com DP	Hiposmia idiopática em parentes de primeiro grau de pacientes com DP está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de PD clínica de 12,5% em 5 anos.	Holanda
(SAIFEE et al. 2010)	Avaliar o desempenho olfatório nos estados <i>on</i> e <i>off</i> da DP em pacientes tratados com Levodopa.	Coorte	16 DP tratados com Levodopa	Não há diferença no desempenho olfatórios entre os dois estados.	Reino Unido
(ROSS et al. 2008)	Encontrar o poder preditivo da disfunção olfatória no desenvolvimento posterior de DP em uma população de base.	Coorte	2.267 homens.	Déficit na identificação de odores pode preceder DP em até 4 anos, sendo uma importante ferramenta preditiva.	Asia
(SILVEIRA-MORIYAMA et al. 2008)	Avaliar o poder preditivo de testes olfatórios no desenvolvimento da DP para a população brasileira.	Estudo transversal	106 DP; 108 controles.	Pacientes com DP apresentaram prejuízo olfatório, com possível predição do desenvolvimento da DP, através de curva de preditiva para DP.	Brasil
(HAEHNER et al. 2007)	Acompanhar pacientes com hiposmia e identificar qual a incidência de DP neste grupo após 4 anos.	Coorte	30 pessoas com alteração olfatória.	7% desenvolveu DP idiopática, assim a olfação tem valor prognóstico para DP.	Alemanha
(FANTINI et al. 2006)	Avaliação olfatória de portadores de RBD	Coorte	54 pacientes com RBD e sem DP e 54 controles	Pessoas com RBD apresentaram dificuldade de identificação de odores (principalmente canela, tiner e gasolina).	Canadá e Itália

(STIASNY-KOLSTER et al. 2005a)	Investigar a hipótese de que dois achados, entre disfunção olfatória, RBD e exame de imagem, combinados são suficientes para indicar futura α -sinucleinopatia.	Estudo transversal	30 pacientes com subclínico ou clínico RBD. 30 controles.	O grupo RBD teve pior desempenho olfatório em todos os parâmetros. Um paciente teve o diagnóstico de DP, 4 apresentaram sinais de parkinsonismo, e todos com hiposmia ou anosmia.	Alemanha
(DOUBLE et al. 2003)	Determinar o padrão e tipos de odores alterados na DP	Estudo observacional transversal.	49 DP e 52 controles	82% dos pacientes com DP tiveram alteração olfatória e desempenho pior quando comparado com o controle. Os odores melhor discriminados pelo grupo DP foram: gasolina, banana, abacaxi fuma e canela.	Austrália
(TISSINGH et al. 2001)	Avaliação olfatória da detecção, discriminação e identificação de odores.	Estudo transversal	41 pacientes com DP - 24 não tratados, 17 com Levodopa 18 controles	Todos os parâmetros testados na DP estão prejudicados. Os indivíduos tratados apresentaram melhor discriminação, porém detecção e identificação iguais aos tratados com Levodopa.	Holanda

1.3 O SONO E A DOENÇA DE PARKINSON

O sono é um estado comportamental e eletrofisiológico complexo, sincronizado que apresenta mudanças na atividade encefálica que tem impacto sobre todo o corpo (PORKA-HEISKANEN et al. 2013). É caracterizado por imobilidade, postura típica e redução do limiar sensorial, o que leva à diminuição da capacidade de interação com o ambiente externo (MALLICK et al. 2012; PORKKA-HEISKANEN et al. 2013).

Através de estudos eletrofisiológicos do ciclo vigília-sono, são evidenciadas suas diferentes fases, com características peculiares a cada uma delas. A vigília é caracterizada por baixa amplitude e ondas com alta frequência (PORKKA-HEISKANEN et al. 2013). O sono pode ser dividido em duas fases principais: sono

REM e sono não-REM ou de ondas lentas (MCCARLEY 2007; MONTI e MONTI 2007). No eletroencefalograma (EEG) o sono não-REM é caracterizado por ondas de maior amplitude e menor frequência, já no sono REM o perfil do traçado se assemelha ao encontrado na vigília (LIMA et al. 2008). Sendo necessário a mensuração de outros parâmetros para a diferenciação entre o estado de vigília e sono REM. Estes estados podem ser separadas com base no tônus muscular (medida por eletromiografia - EMG) e nos movimentos oculares (detectados usando a eletrooculografia - EOG) (MALLICK et al. 2012; MCCARLEY 2007). O tônus muscular está abolido ou bastante diminuído durante o sono REM e totalmente presente na vigília (PORKKA-HEISKANEN et al. 2013; LIMA et al. 2008; MCCARLEY 2007).

As alterações de sono veem sendo relatadas em diversas doenças neurodegenerativas, relacionadas às α -sinucleinopatias (POSTUMA et al. 2009; POSTUMA et al. 2012). Na DP estas alterações incluem insônia e principalmente movimentos anormais durante o sono (movimentos periódicos dos membros e RBD (LIMA 2013).

Com relação ao poder preditor, o RBD é o marcador clínico pré-motor de maior destaque, pois correlaciona com um aumento no risco de neurodegeneração dopaminérgica, assim essa alteração é de longe o mais forte preditor clínico de doença neurodegenerativa disponível (POSTUMA et al. 2012).

1.4 DISTÚRPIO COMPORTAMENTAL DO SONO REM (RBD)

Essa parassonia é caracterizada por perda da atonia normalmente encontrada durante o sono REM (OLSON et al. 2000; POSTUMA e MONTPLAISIR 2010; SCHENCK et al. 1996) e tem sido apontada como um sinal precursor de doenças neurodegenerativas relacionadas às α -sinucleínas (POSTUMA e MONTPLAISIR 2010), como a doença de Parkinson, demência de corpos de Lewy e atrofia de múltiplos sistemas (DAUVILLIERS et al. 2013). Há relatos da presença de RBD ou sono REM sem atonia tanto nos pacientes tratados quanto não tratados com a DP, sendo que este achado precede o seu diagnóstico em 3 a 13 anos (GAGNON et al. 2002; POSTUMA et al. 2012), típico de um sinal prodrômico assim como a disfunção olfatória.

Os critérios diagnósticos clássicos para RBD foram definidos pela Classificação Internacional de Distúrbios do Sono e incluem movimento dos membros ou do corpo associados a sonhos (usualmente violentos), e pelo menos um dos seguintes: comportamento potencialmente perigoso do sono; sonhos que parecem ser “atuados”; ou comportamentos que perturbam a continuidade do sono (COMELLA et al; 1998; POSTUMA et al 2012a).

Observa-se que aproximadamente 50% dos pacientes que manifestam RBD a pelo menos uma década, irão eventualmente desenvolver uma ou mais dessas doenças (POSTUMA e MONTPLAISIR 2011), sendo que destes, 65% irão desenvolver DP (POSTUMA et al. 2012). Em outras palavras, a especificidade

deste achado para o diagnóstico precoce da DP é elevada. Ainda, a latência entre a ocorrência do RBD e a fase sintomática motora é estimada em até 12-14 anos (POSTUMA et al. 2012). Esse longo intervalo associado ao risco aumentado de desenvolvimento de uma doença neurológica compõe uma importante oportunidade de observação dos estágios pré-clínicos da neurodegeneração que resultará no Parkinsonismo.

A tabela 3 mostra uma seleção de artigos que relacionam RBD com as doenças neurodegenerativas. Alguns estudos acompanharam portadores de RBD encontraram o desenvolvimento futuro de DP (BOEVE et al. 1998; IRANZO et al. 2006; SCHENCK et al; 1996), outros estudos avaliaram a frequência de RBD em pacientes do DP (COMELLA et al; 1998; GAGNON et al. 2002).

TABELA 3- SELEÇÃO DE ARTIGOS QUE RELACIONAM AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DO SONO REM COM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS (PRINCIPALMENTE DP) E OUTROS SINAIS PRÉ-CLÍNICOS.

Referência	Foco do estudo	Tipo de estudo	Amostra	Principal Achado	País da pesquisa
(IRANZO et al. 2006)	Determinar a frequência e a natureza dos distúrbios neurológicos em desenvolvimento em pacientes diagnosticados comidiopática RBD.	Estudo retrospectivo	44 pacientes com RBD	RBD muitas vezes precede doenças neurodegenerativas.	Espanha
(GAGNON et al. 2002)	Determinar a frequência de distúrbio comportamental do sono REM (RBD) entre os pacientes com DP.	Estudo Transversal	33 pacientes com DP e 16 controles.	Os pacientes com DP apresentaram maior prevalência de RBD, quando comparado com os controles.	Canadá
(OLSON et al. 2000)	Determinar as variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e etiológicas de pacientes com RBD.	Estudo Transversal	93 pacientes com RBD	Doenças associadas ocorreram em 53 pacientes, dentre eles: 47% DP, 26% atrofia de múltiplos sistemas; 13% demência sem parkinsonismo.	Estados Unidos

(COMELLA et al. 1998)	Determinar a ocorrência de RBD em pacientes com DP.	Estudo transversal	61 pacientes com diagnóstico de DP e 61 cônjuges.	15% apresentou critérios clínicos para RBD.	Estados Unidos
(SCHENCK et al. 1996)	Acompanhar pacientes com diagnóstico de RBD.	Coorte	29 pacientes com RBD	38% dos pacientes desenvolveram DP posterior ao diagnóstico de RBD, com atraso de 10-29 anos do surgimento do RBD.	Estados Unidos

1.5 MECANISMOS NEURONAIS DE REGULAÇÃO DE SONO

Estudos em mamíferos demonstram que os diferentes componentes do padrão comportamental do sono REM são controlados por diferentes mecanismos em diferentes regiões anatômicas do encéfalo (MCCARLEY 2007). A maioria dos eventos fisiológicos do sono REM têm neurônios efetores localizados na formação reticular, responsável pelo perfil dessincronizado apresentado no EEG (MCCARLEY 2007). Esta região está relacionada com os movimentos oculares rápidos e atonia muscular. Lesões em regiões da formação reticular que projetam para o locus coeruleus e tegmento pedúnculo-pontino geram supressão da atonia durante esta fase do sono (MCCARLEY 2007).

Diversos neurotransmissores foram pelo menos parcialmente caracterizados dentro da circuitaria de regulação do sono (LIMA et al. 2007a; LIMA et al. 2008a; LIMA et al. 2008b; LIMA et al. 2009). Classicamente a geração e regulação do sono REM é creditada à mecanismos colinérgicos que atuam aumentando a excitabilidade dos neurônios pontinos (REM-on) e ainda inibindo os neurônios gabaérgicos (conhecidos como inibidores desta região) (MCCARLEY 2007). Em

contrapartida a finalização desta fase (*REM-off*) está relacionada com neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, e possivelmente com neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus (MCCARLEY 2007). Os neurônios dopaminérgicos, presentes na SNpc e área tegmental ventral (MONTI e MONTI 2007), são os mais controversos desta circuitaria. A dopamina é comumente associada com a promoção da atividade locomotora, integração sensoriomotora e motivação (MONTI e MONTI 2007). Em relação ao seu papel neurofisiológico sobre o sono, é tradicionalmente associada com a vigília (MONTI et al; 1982; MONTI e MONTI 2007).

Entretanto, uma série de trabalhos clínicos e em modelos animais tem apresentado a DA como sendo um neurotransmissor de caráter dual. Portanto, relacionado também com a regulação dos processos de sono, em particular do sono REM, ou paradoxal em animais (LIMA et al. 2007a; LIMA et al. 2007b; LIMA et al. 2008a; LIMA et al. 2008b; LIMA et al. 2009; SANTOS et al. 2008; BARRAUD et al. 2009; DE COCK et al. 2007; DZIRASA et al 2006; VERHAVE et al. 2011). A partir destes estudos, têm-se sugerido que o sistema dopaminérgico nigroestriatal apresenta um papel chave para a regulação do sono REM/paradoxal, principalmente num contexto de neurodegeneração como no caso da DP (LIMA et al. 2007a; LIMA 2013).

1.6 IMPACTOS DO SONO SOBRE AS ALTERAÇÕES OLFATÓRIAS – PRIVAÇÃO DE SONO REM/PARADOXAL

A presença de dois ou mais sinais pré-clínicos da DP está relacionada com uma maior probabilidade de acurácia no diagnóstico precoce (BUSSE et al. 2012; PONSEN et al 2010). Um importante estudo de coorte multicêntrico com aproximadamente 5.000 voluntários, mostrou que a hiposmia está associada a outros sinais não-motores da DP em indivíduos não diagnosticados, como RBD, depressão, e outras (SIDEROWF et al. 2012). Outros estudos mostram que pacientes

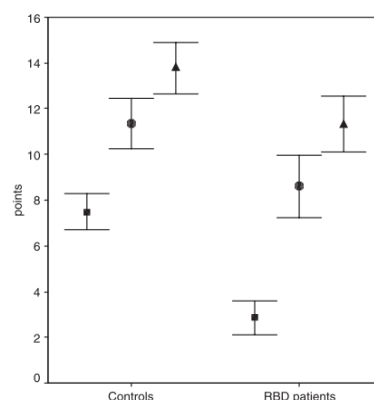


FIGURA 3- PARÂMETROS OLFATÓRIOS, (■) DETECÇÃO, (●) DISCRIMINAÇÃO E (▲) IDENTIFICAÇÃO. Em 30 pacientes com RBD e controles. (■ - $p=0,001$; ● - $p=0,003$; e ▲ - $p=0,001$). FONTE: retirado de Stiasny-Kolster et al. (2005).

já diagnosticados com RBD apresentam importante comprometimento olfatório (FANTINI et al. 2006; STIASNY-KOLSTER et al. 2005). Na figura 3, está ilustrado um importante achado do estudo de Stiasny-Kolster e colaboradores (2006), no qual os três parâmetros apresentados indicam prejuízos olfatórios em pacientes portadores de RBD quando comparados a voluntários do grupo controle.

Corroborando esses achados a figura 4 mostra que o prejuízo olfatório fica mais evidente com odores fortes, como canela, tiner e gasolina (FANTINI et al. 2006).

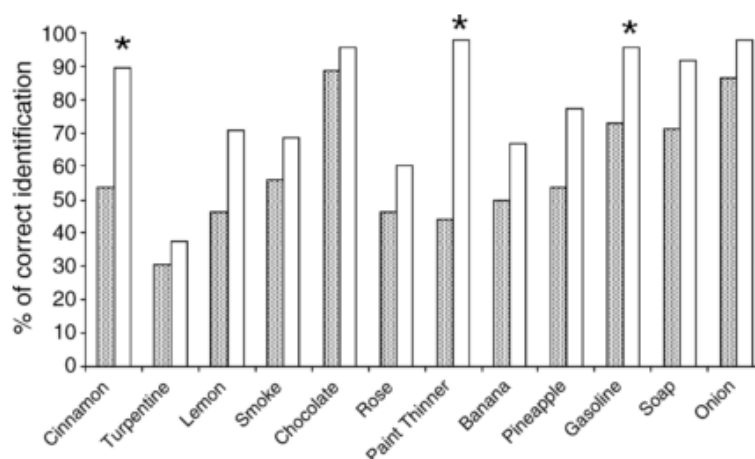


FIGURA 4- PORCENTAGEM DE ACERTOS PARA CADA ODOR NO TESTE OLFATÓRIO EM PACIENTES COM RBD (CINZA) E CONTROLES (BRANCO). FONTE: Retirado de Fantini et al. (2006).

Evidências sugerem que a própria alteração no sono REM pode gerar, como consequência, mudanças na função olfatória. Estudos que avaliam o fluxo sanguíneo encefálico e seu metabolismo evidenciaram uma diminuição da atividade neuronal em regiões associadas à olfação após a privação de sono total em humanos (KILGORE e MCBRIDE 2006). Além dessa evidência a favor da existência de uma relação direta entre a circuitaria envolvida na regulação da olfação e do sono, observa-se que a privação de sono total (por um período de 45 h) em pessoas normais está relacionada à diminuição da acuidade olfatória (KILGORE et al. 2010). O mesmo estudo de Stiasny-Kolster, citado acima, mostrou que a degeneração nigroestriatal subjacente da DP pode também ser encontrada

em portadores de RBD idiopática e que os mesmos apresentam comprometimento da função olfatório. Assim, esses pacientes encontram-se na fase 2 pré-clínica de α -sinucleinopatia proposta por Braak (2003a).

Desta forma, a proposição do presente trabalho leva em conta a inter-relação apresentada por estas variáveis prodrômicas e suas circuitarias regulatórias, que possivelmente compartilham funções, num contexto neurodegenerativo como na DP. Nesse sentido, a neurotransmissão dopaminérgica parece assumir um papel chave em ambas as condições.

1.7 ROTENONA COMO MODELO ANIMAL PARA DOENÇA DE PARKINSON

A DP não ocorre de forma espontânea em animais, sendo necessário mimetizar as condições fisiopatológicas e clínicas das fases iniciais da DP em animais. Existem várias neurotoxinas utilizadas para esse propósito, em particular o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (LIMA et al. 2006) e a rotenona (CHOU et al. 2010). Esta última neurotoxina está associada a uma importante condição de exposição ambiental, sendo utilizada amplamente como pesticida. Nesse sentido, vários casos de parkinsonismos decorrentes dessa exposição já foram relatados na literatura, o que confere uma importante validade preditiva ao modelo animal (BETARBET et al. 2000; DHILLON et al. 2008).

A toxicidade da rotenona é relativamente seletiva para os neurônios daSNpc, mesmo após a administração sistêmica (CHOU et al. 2010). Ela atua gerando prejuízos no complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (BETARBET et al. 2000; CHOU et al. 2010; KARUPPAGOUNDER et al. 2013), alterações na transcrição gênica que levam à formação de agregados de proteínas (achados clássicos em várias doenças neurodegenerativas) (CABEZA-ARVELAIZ e SCHIESTL 2012), como mostra a figura 5. A alteração mitocondrial compromete a respiração celular, promovendo alterações do potencial de membrana mitocondrial e geração exacerbada de radicais livres proveniente do metabolismo da dopamina. Por isso estes neurônios apresentam maior vulnerabilidade (CHOU et al. 2010). A morte neuronal ocorre principalmente por apoptose (BETARBET et al. 2006). Mas também através de outras formas de morte celular programada, como autofagia programada (KARUPPAGOUNDER et al. 2013).

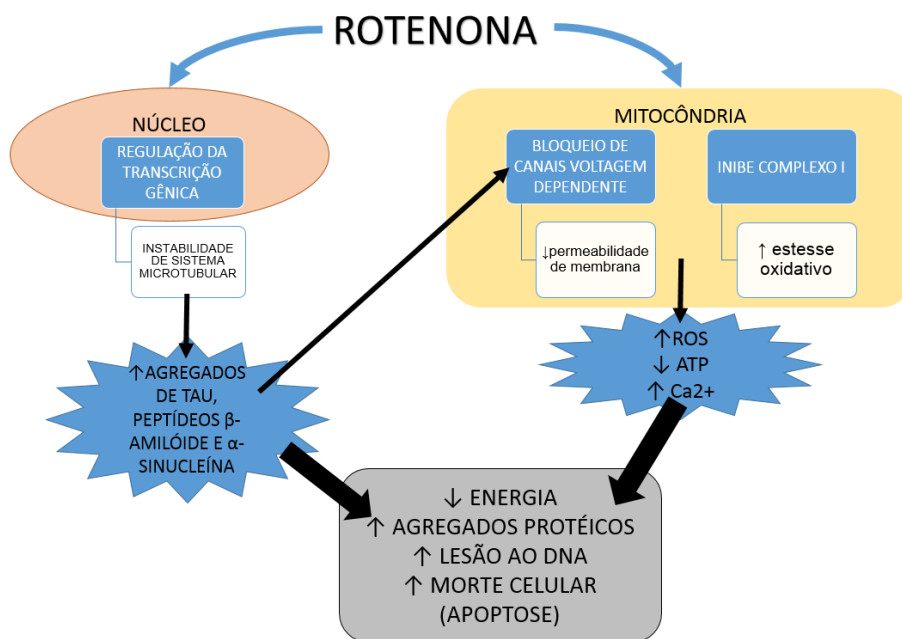


FIGURA 5- MECANISMOS DE AÇÃO DA ROTENONA. FONTE: MODIFICADO DE CABEZA-ARVELAIZ & SCHIESTL (2012)

Esse modelo de lesão induzido por rotenona é considerado como o mais similar à doença humana devido à sua capacidade de formar os corpúsculos de Lewy (BETARBET et al. 2000). A figura 6 mostra que a presença de α -sinucleína está aumentada no mesencéfalo ventral após a infusão de rotenona sistêmica (BETARBET et al. 2006). A infusão crônica de rotenona em ratos resulta em degeneração dopaminérgica nigroestriatal, sinais de estresse oxidativo em diferentes núcleos encefálicos, e disfunção motora e prejuízos cognitivos, bem como comportamentos tipo-depressivos (MOREIRA et al., 2012; SANTIAGO et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2013).

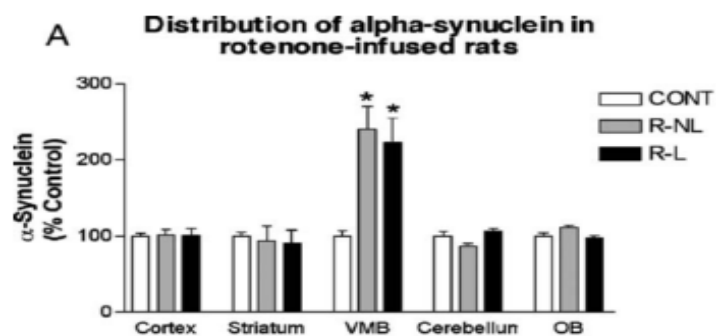


FIGURA 6- EFEITOS A INFUSÃO DE ROTENONA EM RATOS. (A) Níveis de α -sinucleína aumentados no mesencéfalo ventral em ratos do grupo rotenona: tanto os que apresentaram lesão na imunohistoquímica (r-l); quanto o que não apresentaram (r-nl) comparados com os controles. (* - $p < 0,05$). Fonte: Retirado de Bertarbet et al. (2006).

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente encontra-se na literatura indícios de que esses sinais pré-clínicos estão correlacionados (FANTINI et al. 2006; KILLGORE e MCBRIDE 2006; STIASNY-KOLSTER et al. 2005b), e ainda esses sinais isoladamente estão relacionados com a DP (DOUBLE et al. 2003; PONSEN et al. 2010; POSTUMA et al. 2012). Porém não há estudos que inter-relacionem esses dois achados pré-clínicos com a DP em modelos animais, figura 7.

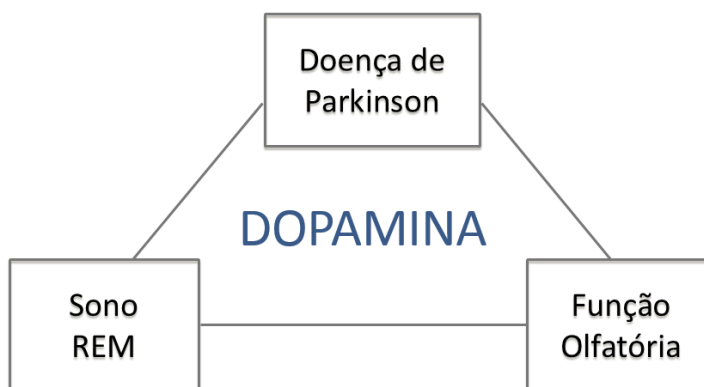


FIGURA 7- ESQUEMA COM A RELAÇÃO ENTRE SONO REM, FUNÇÃO OLFATÓRIA E DP.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a possível ocorrência de prejuízos olfatórios produzidos pela privação de sono paradoxal e/ou lesão da via nigroestriatal, produzida pela infusão de rotenona em ratos Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos sobre o comportamento motor induzidos pela lesão da via nigroestriatal e pela privação de sono paradoxal (realizada em dois períodos diferentes - 24 h e 48 h);
- Analisar os efeitos promovidos pela lesão da via nigroestriatal induzida pela administração de rotenona intranigral sobre o desempenho olfatório;
- Determinar os efeitos sobre o desempenho olfatório de dois períodos diferentes de privação de sono paradoxal (24 h e 48 h) e sono rebote (24 h);
- Determinar os efeitos da lesão da via nigroestriatal e pela privação de sono paradoxal (24h e 48h) sobre o desempenho olfatório;

- Quantificar através de imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH) os neurônios dopaminérgicos residentes na SNpc após a realização da administração de rotenona intranigral.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando entre 280-330g. Os animais foram mantidos em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), em um ciclo de claro-escuro de 12 h (7:00-19:00 h). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todo o experimento. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (aprovação número 651). Sendo que os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes deste mesmo setor, que sustentam a aplicação de modernos princípios éticos em relação ao uso de animais de experimentação.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Experimento 1

Devido à escassez de estudos que testem a capacidade olfatória em ratos e a necessidade de utilizar odores não sociais para esclarecer de forma mais ampla todo esse processo (SOFFIÉ et al. 1988; PREDIGER et al. 2006; PREDIGER et al. 2005b; FLEMING et al. 2008) foi realizado um experimento para avaliar a preferência dos ratos a diferentes odores não sociais. Os odores foram selecionados aleatoriamente e utilizados na forma de essências, sendo eles: menta, almíscar, baunilha e limão (fornecedor: Essências Curitiba, Brasil). Para esse experimento utilizou-se um aparato desenvolvido particularmente para essa avaliação (figura 12) como descrito adiante no item 4.5.

4.2.2 Experimento 2

Esse experimento teve como objetivo determinar qual a janela temporal necessária para os animais recuperarem a função motora, bem como detectar a ocorrência de alterações olfatórias e diminuição de neurônios dopaminérgicos pela

infusão intranigral de rotenona. Para isso, foi utilizado o delineamento experimental proposto na figura 8 sendo finalizado no dia 21, sem que a PSP fosse realizada.

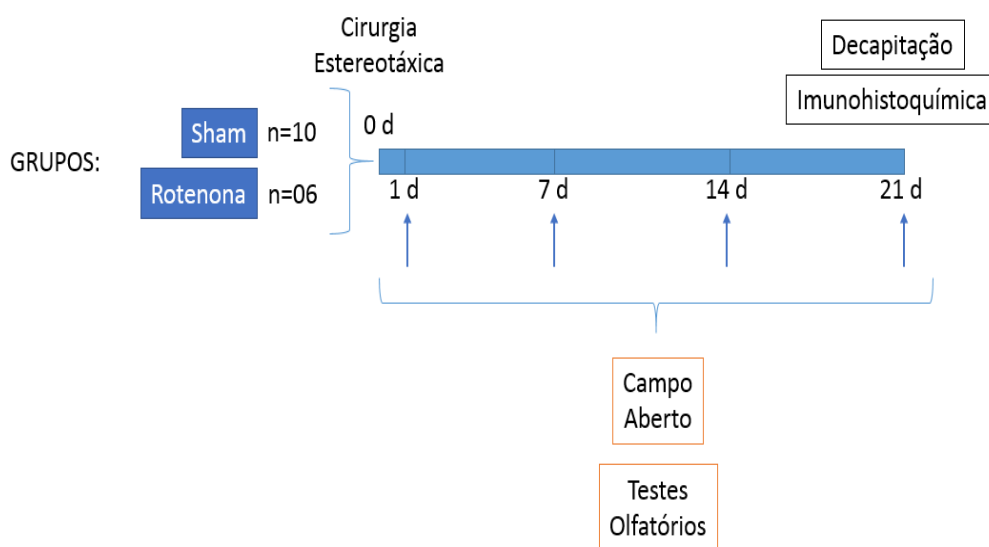


FIGURA 8- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENHO EXPERIMENTAL DE EXPERIMENTO 2. (Sham n=10 e Rotenona n=6).

4.2.3 Experimento 3

Os animais foram distribuídos nos grupos de acordo com o desenho experimental apresentado na figura 9. O teste do campo aberto foi realizado para a determinação do perfil motor. O teste de discriminação olfatória com odor familiar e não familiar, e ainda teste de discriminação olfatória modificado com odor limão e água foram realizados após o período de recuperação da função motora conforme Moreira et al., 2012. Os testes foram realizados antes e logo após os diferentes

tempos de PSP e de sono rebote (REB), permitindo assim o estabelecimento de uma relação entre essas condições de sono e os eventuais prejuízos olfatórios subsequentes. Maiores detalhes estão apresentados na figura 9.

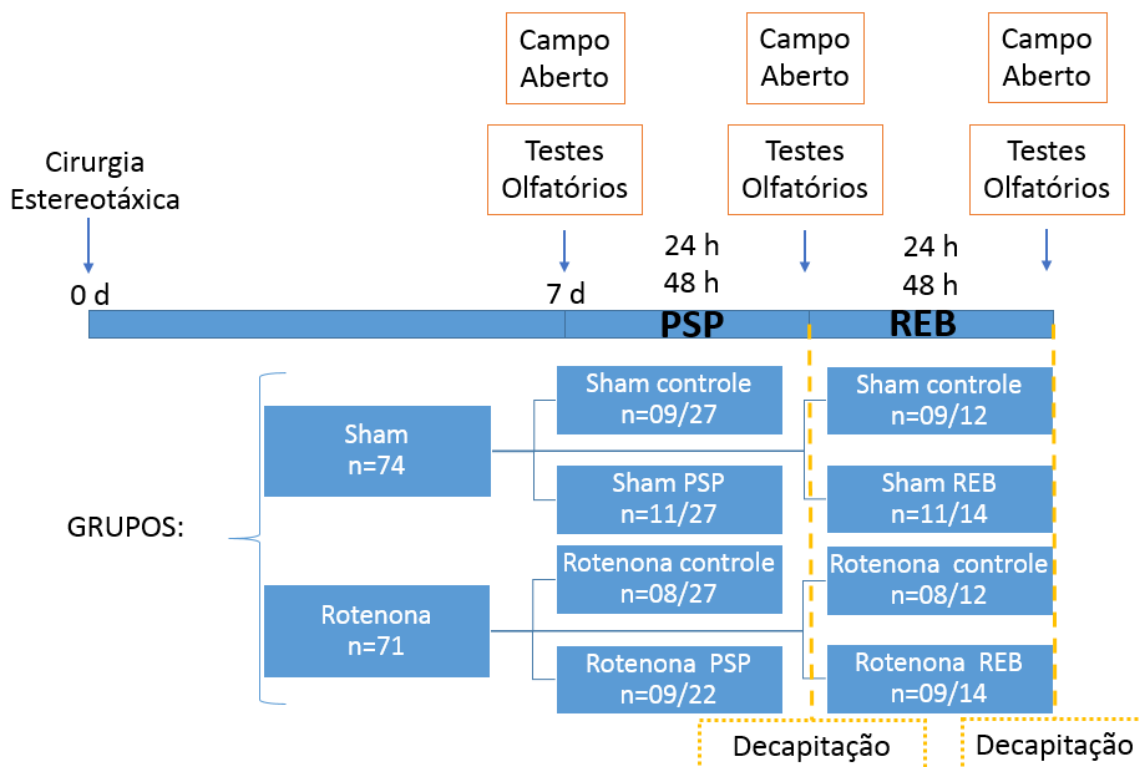


FIGURA 9- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENHO EXPERIMENTAL DO EXPERIMENTO 3. Para o momento basal sham n=74 e rotenona n=71. Para o momento PSP de 24 h sham controle n=9, rotenona controle n=8, sham PSP n=11 e rotenona PSP n=9. Para o momento PSP de 48 h sham controle n=27, rotenona controle n=22, sham PSP n=27 e rotenona PSP n=27. Para o momento rebote de 24 h sham controle n=9, rotenona controle n=8, sham REB n=11 e rotenona REB n=9. Para o momento rebote de 48 h sham controle n=12, rotenona controle n=14, sham REB n=12 e rotenona REB n=14.

4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram inicialmente sedados com diazepam (10 mg/kg) e após a sedação inicial foram então anestesiados com quetamina (90 mg/kg). As seguintes coordenadas foram utilizadas tendo como referência o Bregma: (AP) = - 5,0 mm, (ML) = \pm 2,1 mm e (DV) = - 8,0 mm (PAXINOS e WATSON 2005). Foi realizada a infusão bilateral de 1 μ L neurotoxina rotenona (12 μ g/ μ L) com auxílio de uma bomba eletrônica de infusão (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brasil) a uma taxa de infusão de 0,33 μ L/min, durante 3 minutos. Animais do grupo sham foram injetados apenas com o veículo dimetilsulfóxido (DMSO) em iguais condições (MOREIRA et al., 2012), figura 10.

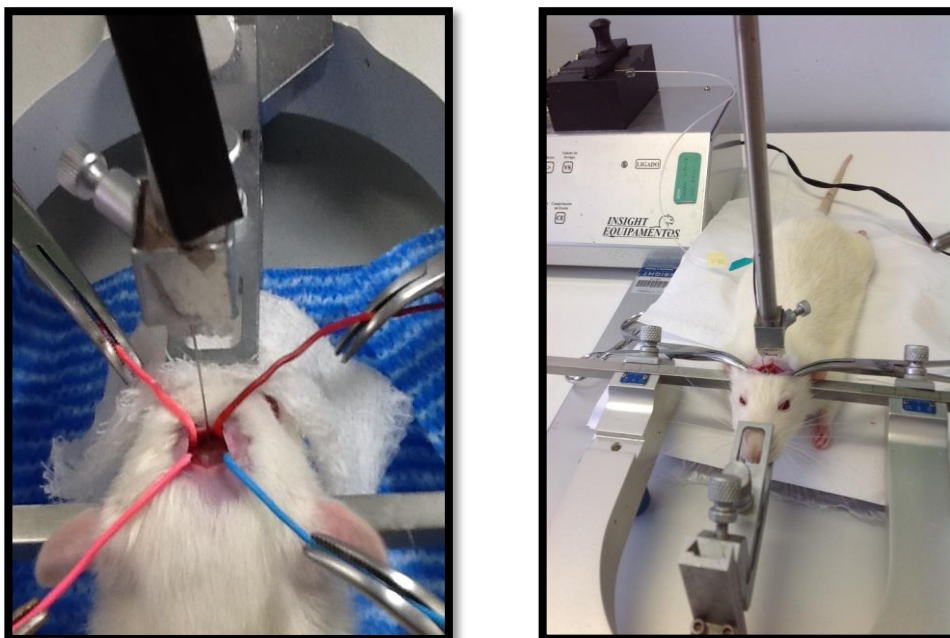


FIGURA 10- CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.

4.4 PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL

Foi realizada através do Método da Plataforma Única, no qual cada animal é colocado em um tanque (23 x 23 x 35 cm) contendo uma plataforma cilíndrica, 6,5 cm de diâmetro e rodeada de água cerca de 1 cm abaixo da superfície da plataforma, figura 11. No início de cada episódio do sono paradoxal, o animal sofre uma redução de tônus muscular e cai na água, sendo despertado. Com esse método observa-se que o sono paradoxal é completamente abolido durante todo o período desejado sendo o sono de ondas lentas é menos afetado (MACHADO et al. 2005; Lima et al. 2008). Os ratos dos grupos controle foram mantidos em um tanque (23 x 23 x 35 cm) com serragem e uma plataforma para mimetizar as condições do grupo experimental.

Alguns animais, selecionados randomicamente, puderam realizar um período de recuperação da PSP, esse período chama-se rebote. O tempo de rebote



FIGURA 11- PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL PELO MÉTODO DA PLATAFORMA ÚNICA.

foi o mesmo tempo de PSP, ou seja, se o grupo realizou PSP de 24 h fez rebote de 24 h.

4.5 TESTE DE DETECÇÃO DE ODORES

Este teste foi elaborado pelo Laboratório de Neurofisiologia da Universidade Federal do Paraná para este estudo. Consiste em um labirinto radial, contendo cinco compartimentos distintos, sendo que em cada sessão de teste 100 μ L do odor (menta, almíscar, baunilha ou limão) foi impregnado em papel de filtro e inserido em tubo falcon contendo furos que foi apresentado, individualmente em cada compartimento mudando a posição dos odores aleatoriamente a cada sessão, no intuito de impedir a ocorrência de um viés de aprendizado espacial ou contextual (figura 12). O teste foi realizado em seis sessões de três minutos, nas quais o rato

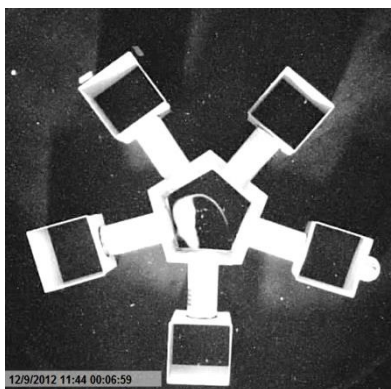


FIGURA 12- TESTE DE DETECÇÃO DE ODORES.

tinha a oportunidade de explorar livremente todos os compartimentos. Espera-se uma permanência aumentada, bem como um maior número de entradas, por parte

dos animais, no compartimento com odor não social de escolha. As variáveis quantificadas neste teste foram: latência para entrada no compartimento com odor; frequência de entradas no compartimento com odor e tempo de permanência no compartimento com odor.

4.6 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA

Esse teste foi previamente descrito por Soffié e Lamberty 1988 e, posteriormente, modificado por Prediger e colaboradores (SOFFIÉ et al. 1988; PREDIGER et al. 2005a; PREDIGER et al. 2005b). O experimento consiste em colocar o rato na caixa de discriminação olfatória e registrar, durante um período de 5 minutos, o tempo que o animal gastará investigando cada um dos compartimentos, como mostrado na figura 13. A discriminação olfatória foi avaliada pela preferência do rato em ficar no compartimento impregnado com o seu cheiro (compartimento familiar) em relação ao compartimento inodoro (forrado com cepilho limpo, portanto, não-familiar), visto que nesta situação, tem sido demonstrado que ratos machos adultos preferem permanecer em ambientes impregnados com seu próprio cheiro (CARR et al. 1976; PREDIGER et al. 2005a; PREDIGER et al. 2005b). Assim as variáveis analisadas foram o tempo de permanência em cada compartimento e o índice de discriminação olfatória. Esse índice foi determinado a partir da razão entre o tempo de permanência no

compartimento não-familiar pelo tempo de permanência no compartimento familiar. Esse limiar determina a região na qual o índice representa mesma porcentagem de tempo em cada compartimento, ou seja, indiscriminação entre os odores.



FIGURA 13- TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA. Esta arena foi utilizada tanto para a discriminação entre familiar e não familiar quanto para limão e água.

4.7 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA MODIFICADO

Consiste na mesma metodologia empregada no teste original (figura 13), porém utilizando como paradigma a preferência do animal por um odor não social em detrimento a um odor neutro (água). O presente estudo determinou haver uma preferência significativamente maior dos animais (teste descrito no item 4.5) pelo odor de limão (figura 15), sendo este utilizado como odor não social. Dessa forma, utilizou-se 100 μ L do odor de limão aplicados em papel de filtro que foi inserido em

tubo falcon contendo furos. Repetiu-se o mesmo procedimento utilizando água aplicada em papel de filtro também inserido em tubo falcon com furos. Cada tubo foi colocado numa extremidade da caixa de discriminação olfatória (figura 13) que continha apenas cepilho limpo. Da mesma forma como no teste original, foi possível obter um índice de discriminação olfatória a partir da razão entre o tempo de permanência no compartimento com água pelo tempo de permanência no compartimento com odor limão.

4.8 TESTE DO CAMPO ABERTO

O Campo Aberto é um aparelho que consiste em uma arena de metal ou madeira, de aspecto circular com 1 metro de diâmetro e 50 cm de altura (REKSIDLER et al. 2008), figura 14. O teste se inicia com a colocação dos animais sobre o círculo central, sendo que seus comportamentos motores foram avaliados por um período pré-determinado de 5 minutos. O parâmetro quantificado foi a distância percorrida. Todas as análises foram registradas e realizadas por meio de câmera digital acoplada ao sistema Smart Junior (Panlab, - Harvard Apparatus Espanha).

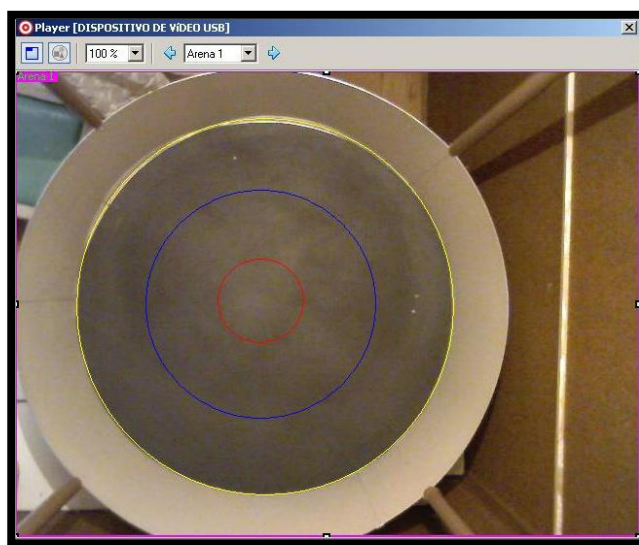


FIGURA 14- TESTE DO CAMPO ABERTO.

4.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE NO MESENCÉFALO VENTRAL

A metodologia utilizada seguiu a padronização feita em nosso laboratório como descrito anteriormente (REKSIDLER et al. 2008). Os animais foram anestesiados com quetamina imediatamente após o último teste comportamental, e em seguida perfundidos com infusão intracardíaca de salina primeiramente, seguida de solução de fixação de 4% de paraformaldeído (0,1M – pH 7,4). Os encéfalos foram removidos e imergidos durante 1 semana na mesma solução de fixação à 4°C. na sequência, os encéfalos foram imergidos em solução de 30% de sacarose por 48 h, antes da realização dos cortes. Foram feitas 3 séries de cortes de 40 µm com o criostato no plano frontal e coletados do diencéfalo caudal para o

mesencéfalo caudal. As secções foram incubadas com anticorpo primário anti-TH (coelho), diluído em PBS contendo 0,3% Triton X-100 (1:500; cabra; Chemicon, CA, USA) por 12 h (overnight) à 4°C. A incubação com anticorpo secundário (1:200; cabra; Vector Laboratories, USA) foi realizada por 2 h em temperatura ambiente. Após várias lavagens com PBS, o complexo de anticorpos foi localizado usando o kit ABC (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories, USA) seguido de reação com 3-3'-diaminabenzida com níquel. As lâminas foram então desidratadas em concentrações ascendentes de etanol, diafanizadas em xilol e cobertas por lamínulas. Para a estimativa de perda neuronal da SNpc pela infusão de rotenona, usando métodos estereológicos, foram identificados os neurônios dopaminérgicos nesta região dos grupos sham, que preservaram a citoarquitetura normal. E foram comparadas as observações das mesmas regiões no grupo rotenona. Todas as determinações quantitativas foram conduzidas através de análises realizadas com o auxílio do software Image J (National Institutes of Health, USA). As imagens da área de interesse foram obtidas utilizando microscópio motorizado Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), equipado com um escaner de digitalização automatizada VSlide (Metasystems Altussheim, Alemanha), do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todas as determinações quantitativas foram conduzidas através de análises realizadas com o auxílio do software Image J (National Institutes of Health, USA), sendo medida através das densidades de neurônios TH imunorreativos (TH-ir) na SNpc entre os grupos sham e rotenona.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O resultados do experimento 1 foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido pelo post-hoc de Newman-Keuls. Os dados obtidos pelos testes do campo aberto, discriminação olfatória e discriminação olfatória modificado, coletados nos experimentos 2 e 3 foram analisados através da ANOVA de duas vias, seguido por teste *post hoc* de Bonferroni. Os fatores utilizados foram: grupo e tempo. Para os dados de imunohistoquímica e dos índices de discriminação olfatórios foram utilizados o teste *t* de Student e *post hoc* de Mann-Whitney. Foi considerado o nível de significância de $P \leq 0,05$ para que se rejeitasse a hipótese de nulidade. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1

O parâmetro de frequência de entradas do teste de detecção de odores revelou que os animais manifestaram uma preferência aumentada para o odor limão, em comparação aos odores menta ($P < 0,05$), almíscar ($P < 0,01$), baunilha ($P < 0,01$) e sem odor ($P < 0,01$), como indicado [$F(54)=4,84$; $P < 0,01$] na figura 15A. De forma análoga, o tempo de permanência indicou um aumento significativo desse parâmetro para o odor limão, quando comparado à todos os demais odores ($P < 0,01$), [$F(54)=6,88$; $P < 0,001$] (figura 15B).

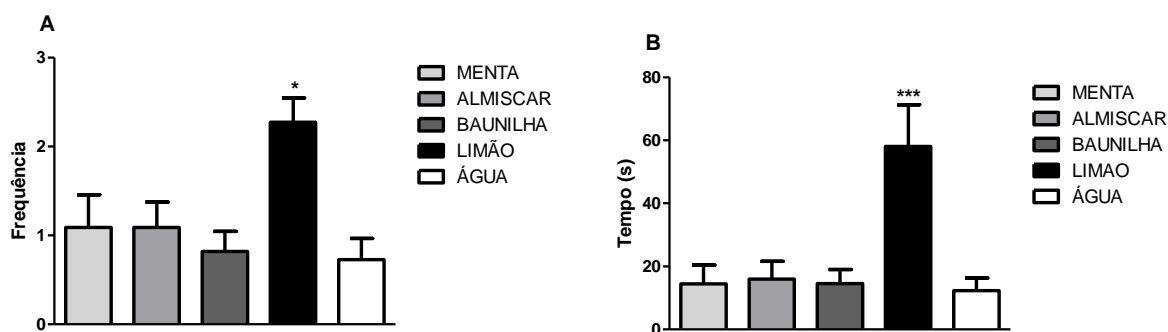


FIGURA 15- RESULTADOS DO TESTE DE DETECÇÃO DE ODORES. Utilizado para determinação da preferência por odores não sociais. (A) Frequência (B) Tempo de permanência. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. ANOVA de uma via seguida de post hoc de Newman-Keuls ($n = 11$).

5.2 EXPERIMENTO 2

Os resultados dos testes do campo aberto, indicaram que o grupo rotenona apresentou um prejuízo motor significativo no primeiro dia, após a infusão dessa neurotoxina, comparado aos outros dias ($P < 0,05$), como indicado pelo fator tempo [$F(3,42)=4,41$; $P < 0,01$], porém não pelo fator grupo [$F(1,42)=0,93$; $P=0,35$], com interação [$F(3,42)=3,42$; $P < 0,05$], sugerindo uma resposta compensatória já visível no dia 7 após a infusão da rotenona (figura 16). Em paralelo, o teste de discriminação olfatória revelou que animais que receberam rotenona apresentaram prejuízo olfatório em todos os períodos avaliados ($P < 0,05$ para todos os tempos) mostrado pelo índice de discriminação, indicado pelo fator grupo [$F(1,36)=12,86$; $P < 0,01$], fator tempo [$F(3,36)=0,85$; $P=0,48$], fator interação [$F(3,36)=0,22$; $P=0,88$] sendo incapazes de diferenciar entre os dois compartimentos, figura 17. Para o tempo de permanência houve diferença para fator tempo [$F(3,42)=4,41$; $P < 0,01$] e interação [$F(3,42)=3,68$; $P < 0,05$], porém não para fator grupo [$F(1,42)=0,93$; $P=0,35$].

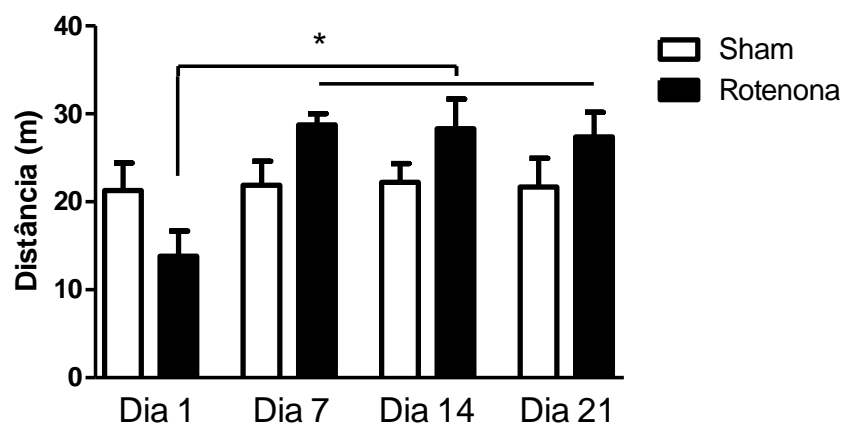


FIGURA 16- RESULTADOS DO CAMPO ABERTO. Variável medida distância em metros. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. *P<0,05. ANOVA de duas vias seguida de post hoc de Bonferroni (Sham n=10; rotenona n=6).

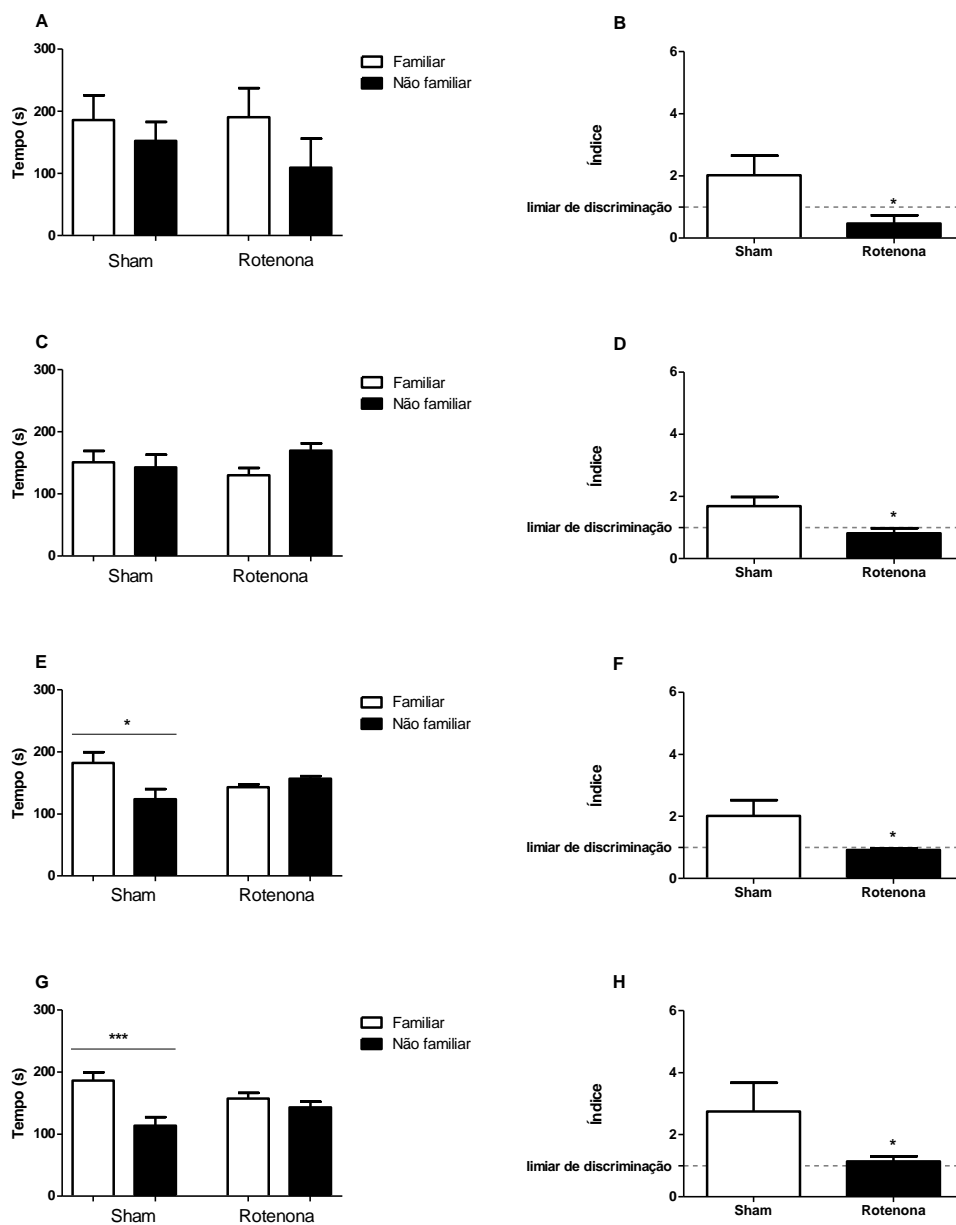


FIGURA 17- TEMPO DE PERMANÊNCIA (S) AVALIADA PELO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA UTILIZADO ODOR FAMILIAR E NÃO FAMILIAR E ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO (NÃO FAMILIAR/FAMILIAR). (A) Comparação do tempo de permanência entre os grupos Sham e Rotenona no dia 1; (B) Comparação do índice de discriminação entre os grupos Sham e Rotenona no dia 1; (C) Comparação do tempo de permanência entre os grupos Sham e Rotenona no dia 7; (D) Comparação do índice de discriminação entre os grupos Sham e Rotenona no dia 7; (E) Comparação do tempo de permanência entre os grupos Sham e Rotenona no dia 14; (F) Comparação do índice de discriminação entre os grupos Sham e Rotenona no dia 14; (G)

Comparação do tempo de permanência entre os grupos Sham e Rotenona no dia 21; (H) Comparação do índice de discriminação entre os grupos Sham e Rotenona no dia 21. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0,05$. ANOVA de duas vias seguida de post hoc de Bonferroni (Sham $n=10$; Rotenona $n=6$).

5.2.1 Imuno-histoquímica para Tirosina Hidroxilase no Mesencéfalo Ventral

A comparação entre as densidades de neurônios TH imunorreativos (TH-ir) na SNpc entre os grupos sham e rotenona foi demonstrada através de estudo imuno-histoquímico, apresentado na figura 26. Houve uma diminuição significativa de aproximadamente 30% da população de neurônios TH-ir na SNpc do grupo tratado com rotenona intranigral em comparação ao grupo sham ($P < 0,0001$).

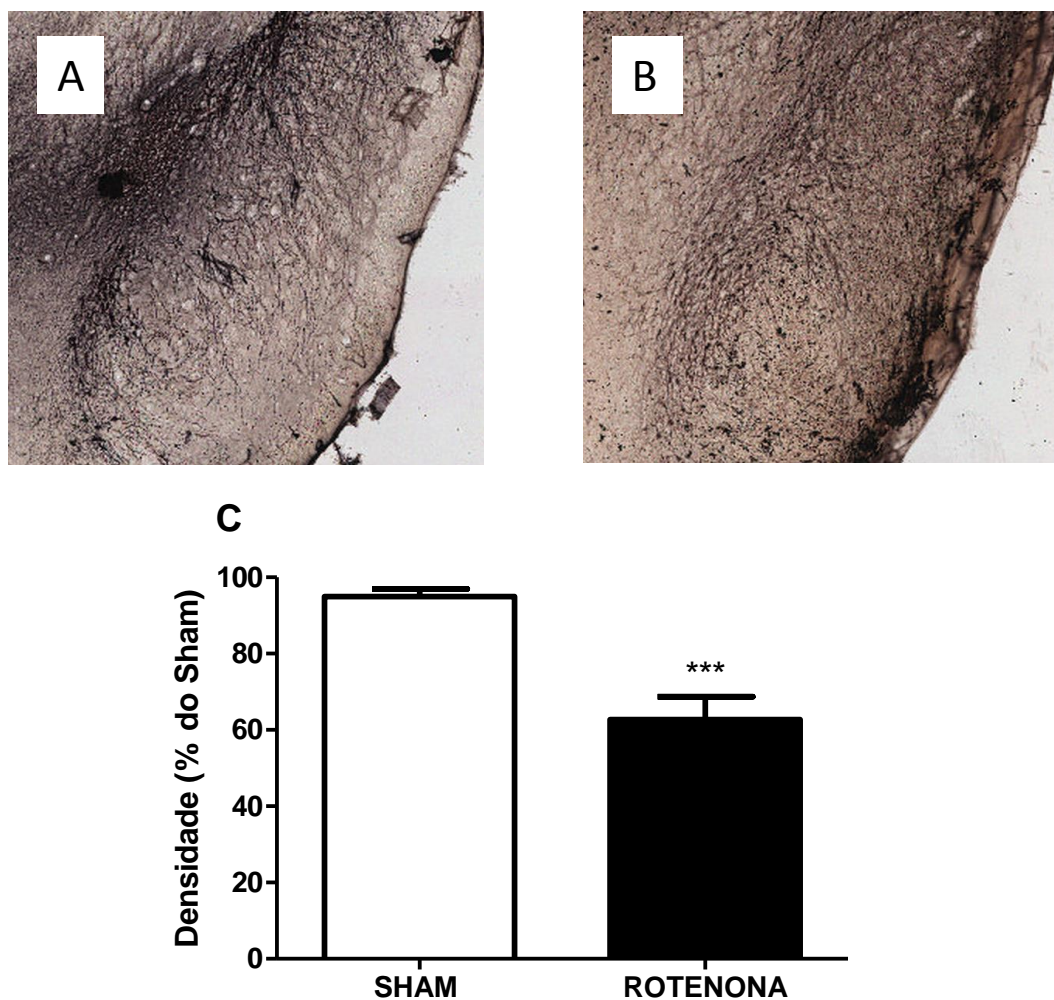


FIGURA 18- DENSIDADE NEURONAL PARA NEURÔNIO TH IMUNORREATIVOS NA SNPC. (A) Fotomicrografia representativa dos cortes com neurônios TH-imunorreativos do grupo Sham; (B) Fotomicrografia representativa dos cortes com neurônios TH-imunorreativos do grupo Rotenona; (C) Quantificação estimada por densidade dos neurônios TH-imunorreativos na SNpc dos grupos. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. *** $P < 0,001$. Teste t de Student e post hoc de Mann Whitney.

5.3 EXPERIMENTO 3

5.3.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MOTORES – TESTE DO CAMPO ABERTO

Para avaliar a ocorrência de possíveis alterações no comportamento motor foi realizado o teste do campo aberto, sendo os resultados apresentados na figura 19. Considerando os grupos que foram submetidos à PSP por 24 h (figura 19A), nenhum grupo apresentou diferença estatisticamente significativa para a comparação entre os períodos testados: basal e pós-privação, como revelado pelo fator grupo [$F(3,33)=1,86$; $P=0,16$] e interação [$F(3,33)=1,59$; $P=0,21$], porém com diferença significativa no fator tempo [$F(1,33)=4,37$; $P<0,05$]. Entretanto, a análise dos grupos submetidos a 48 h de PSP (figura 19B), revelou haver um aumento significativo da distância percorrida pelo grupo sham PSP em comparação aos grupos controle (sham e rotenona) e basal (sham e rotenona), $p<0,05$ para os dois grupos controle e $p<0,01$ para os dois grupos basais, como indicado pelo fator tempo [$F(1,100) = 21,51$; $P<0,0001$] e interação [$F(3,100)=7,36$; $P<0,001$], porém não para o fator grupo [$F(3,100) = 2,35$; $P=0,08$]. A figura 19C mostra a comparação entre os períodos de 24 h e 48 h de PSP em relação a esse resultado, observou-se que o grupo sham PSP 48 h apresentou um aumento significativo da distância percorrida, quando comparado com o grupo sham PSP 24 h ($P<0,0001$), como indicado pelo fator tempo tempo [$F(3,99)=13,33$; $P<0,0001$] e interação

[F(3,99)=6,34; P<0,001], porém não pelo fator grupo [F(3,99)=0,20; P=0,90]. Esse resultado associado ao tempo de privação também se refletiu na maior locomoção apresentada pelo grupo rotenona PSP 48 h quando comparado ao grupo sham PSP 24 h (P<0,05) e rotenona PSP 24 h (P<0,05) (figura 19C).

Os resultados do campo aberto na condição de sono rebote indicaram que nem a PSP de 24 h assim como a de 48 h não foram capazes de promover alterações motoras significativas, como demonstrado pelos fatores tempo, grupo e interação, [F(1,33)=1,16; P=0,29], [F(3,33)=0,47; P=0,71] e [F(3,33)=0,95; P=0,43] respectivamente, para PSP de 24 h (figura 19D). E fatores tempo e interação, [F(1,50)=0,00; P=0,96], [F(3,50)=2,02; P=0,12] respectivamente, com significância para fator grupo [F(3,50)=2,99; P<0,05], para PSP de 48 h (figura 19E). A comparação estatística desses resultados (PSP de 24h e 48 h) no período de rebote mostrou ter havido uma restauração motora, quase completa, frente a modulação causada pela PSP. A figura 19F compara os dois tempos de rebote (24 h e 48 h), mostra que não há diferença na distância percorrida entre os grupos, ANOVA de 2 vias com post hoc de Bonferroni não evidenciou efeito significativo para nenhum dos fatores tempo [F(1,36)=0,16; P=0,69], grupo [F(3,36)=1,07; P=0,38] ou interação [F(3,36)=0,37; P=0,77].

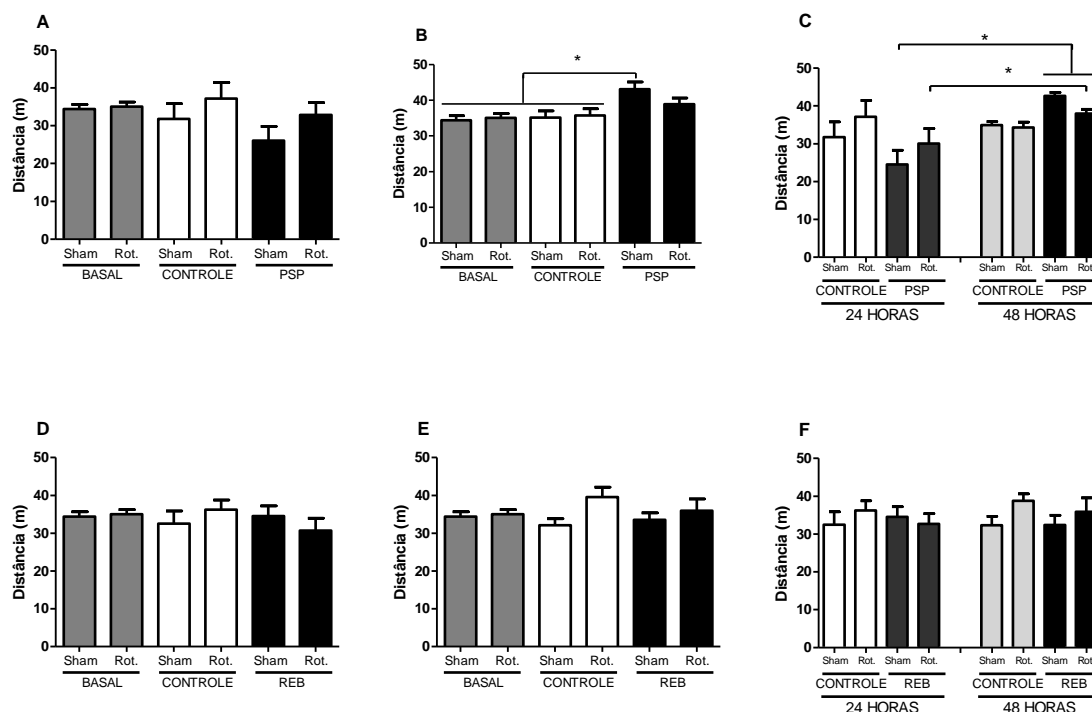


FIGURA 19- DISTÂNCIA PERCORRIDA AVALIADA PELO TESTE DE CAMPO ABERTO. (A) Comparação entre os momentos basal e pós-privação de 24 horas; (B) Comparação entre os momentos basal e pós-privação de 48 horas; (C) Comparação do momento pós-privação de 24 horas e 48 horas; (D) Comparação entre os momentos basal e pós-rebote de 24 horas; (E) Comparação entre os momentos basal e pós-rebote de 48 horas; (F) Comparação do momento pós-rebote de 24 horas e 48 horas; (G) Comparação entre momento pós-privação e momento rebote de 24 horas; (H) Comparação entre momento pós-privação e momento rebote de 48 horas. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0,05$. ANOVA de duas vias seguida de post hoc de Bonferroni. Para o momento basal sham $n=74$ e rotenona $n=71$. Para o momento PSP de 24 h sham controle $n=9$, rotenona controle $n=8$, sham PSP $n=11$ e rotenona PSP $n=9$. Para o momento PSP de 48 h sham controle $n=27$, rotenona controle $n=22$, sham PSP $n=27$ e rotenona PSP $n=27$. Para o momento rebote de 24 h sham controle $n=9$, rotenona controle $n=8$, sham REB $n=11$ e rotenona REB $n=9$. Para o momento rebote de 48 h sham controle $n=12$, rotenona controle $n=14$, sham REB $n=12$ e rotenona REB $n=14$.

5.3.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO OLFATÓRIO - TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA

5.3.2.1 Teste de Discriminação Olfatória – Odor familiar

Os resultados do teste de discriminação olfatória comparando o tempo de permanência entre o compartimento familiar e o não familiar estão apresentados nas figuras 20 e 21. A comparação entre o momento basal e PSP 24 h evidenciou que todos os grupos sham permaneceram por mais tempo no compartimento não familiar ($P < 0,0001$). Diferente dos grupos rotenona que não demonstraram preferência por algum dos odores, portanto, indicando prejuízo na discriminação olfatória. O grupo sham controle apresentou uma preferência aumentada pelo odor não familiar comparado ao grupo rotenona basal ($P < 0,0001$), rotenona controle ($P < 0,0001$) e rotenona PSP 24 h ($P < 0,0001$). Ainda, o grupo sham PSP 24 h teve uma preferência maior que o grupo rotenona PSP 24 h ($P < 0,0001$) e grupo rotenona controle ($P < 0,05$). Para essas comparações observou-se que os fatores que apresentaram significância estatística foram grupo [$F(3,26)=12,69$; $P < 0,0001$] e interação [$F(3,26)=3,26$; $P < 0,05$], enquanto que o fator tempo não [$F(1,26)=3,84$; $P=0,06$]. Observa-se considerando o índice de discriminação (figura 20A), que o grupo sham controle apresentou aumento na preferência pelo compartimento não familiar em comparação com o grupo rotenona basal (247% maior, $P < 0,0001$), maior preferência de 263% em relação ao grupo rotenona controle ($P < 0,0001$) e

299% para o grupo rotenona PSP 24 h ($P < 0,001$). Além disso, o grupo sham PSP 24 h apresentou uma redução de 111% na capacidade de discriminação olfatória em comparação ao grupo sham controle ($P < 0,001$), como indicado pelo fator tempo [$F(1,26)=12,63$; $P < 0,01$], grupo [$F(3,26)=10,49$; $P < 0,0001$] e interação [$F(3,26)=4,22$; $P < 0,05$]. Já o grupo rotenona PSP 24 h também apresentou uma redução maciça de 166% na capacidade de discriminação olfatória quando comparado ao grupo sham PSP 24 h.

A comparação entre os períodos basal e pós-PSP 48 h evidência que todos os grupos permaneceram por mais tempo no compartimento não familiar ($P < 0,0001$). O grupo rotenona basal apresentou menor preferência que os grupos sham basal e sham controle ($P < 0,05$ para as duas comparações), com significância estatística para o fator grupo [$F(3,90)=3,87$; $P < 0,05$] e tempo [$F(1,90)=4,68$; $P < 0,05$], mas não para interação [$F(3,90)=1,78$; $P = 0,16$]. A comparação do índice de discriminação no momento basal e pós-PSP 48 h mostrou as mesmas diferenças a cima citadas entre os grupos, o fator tempo apresentou significância estatística [$F(1,90)=18,06$; $P < 0,0001$] mas não o fator grupo [$F(3,90)=1,67$; $P = 0,18$] e o fator interação [$F(3,90)=0,99$; $P = 0,4$] (figura 20B).

A comparação do tempo de permanência nos compartimentos familiar e não familiar entre momento basal e pós-rebote de 24 h, mostrou que todos os grupos apresentaram preferência pelo compartimento não familiar ($P < 0,0001$). Ainda, o grupo rotenona basal apresentou menor discriminação quando comparado ao grupo sham basal ($P < 0,05$). Mas não mostrou significância para os fatores tempo,

grupo e interação, [F(1,33)=0,53; P=0,47], [F(3,33)=1,64; P=0,20] e [F(3,33)=1,08; P=0,37] respectivamente. Para a variável índice de discriminação na comparação entre os mesmos momentos revelou-se que houve menor diferenciação entre os compartimentos para o grupo rotenona basal (69%) em comparação com Sham basal (188%) (P<0,05), como mostrado na figura 20A. O fator tempo apresentou significância [F(1,33)=4,33; P<0,05], mas não o fator grupo [F(3,33)=1,81; P=0,16] nem o fator interação [F(3,33)=0,81; P=0,5].

Para o tempo de permanência entre os compartimentos no momento basal e pós-rebote de 48 h todos os grupos diferenciaram entre os compartimentos (P<0,0001), nenhum dos fatores apresentou significância, grupo [F(3,35)=2,34; P=0,09], tempo [F(1,35)=0,02; P=0,90] e interação [F(3,35)=0,9; P=0,19]. O índice de discriminação entre o momento basal e pós-rebote de 48 h mostrou que sham basal diferenciou mais (124%) os compartimentos que rotenona basal (p<0,0001) e rotenona controle, 135% (P<0,05), também apresentou significância estatística apenas para o fator grupo [F(3,35)=2,81; P=0,06], com tempo [F(1,35)=2,97; P=0,09] e interação [F(3,35)=0,19; P=0,9] (figura 20B).

Também foi realizada a comparação entre o momento pós-PSP e pós-rebote de 24 h (figura 20A) utilizando o índice de discriminação. O grupo sham controle PSP (326%) apresentou maior porcentagem de discriminação que o grupo sham controle rebote (120%), P<0,01, os grupos sham rebote (109%) e rotenona rebote (83%), P<0,01 para ambos os grupos; e ainda rotenona controle rebote (124%), P<0,05. Na comparação entre os mesmos momentos o fator grupo apresentou

significância [$F(3,26)=6,04$; $P<0,001$] e interação [$F(3,26)=3,18$; $P\leq 0,05$], mas não o fator tempo [$F(1,26)=2,06$; $P=0,16$]. Na figura 20B as mesmas comparações foram realizadas para os grupos que passaram pela PSP 48h e respectivo rebote, e não demonstraram significância entre todos fatores grupo [$F(3,35)=0,81$; $P=0,5$], tempo [$F(1,435)=0,45$; $P=0,51$] e interação [$F(3,35)=0,98$; $P=0,42$].

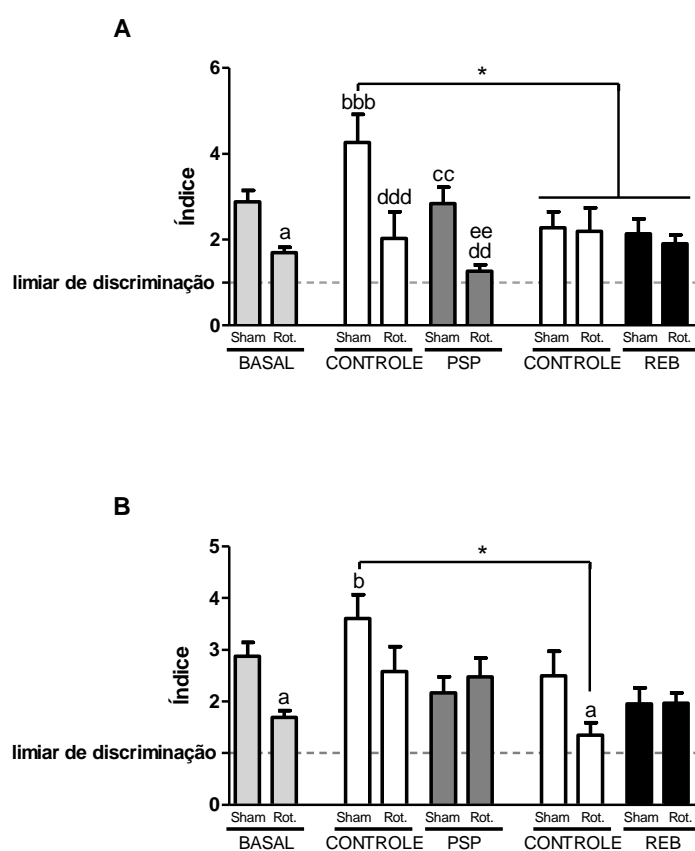


FIGURA 20- ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO (NÃO FAMILIAR/FAMILIAR) AVALIADO PELO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA UTILIZADO ODOR FAMILIAR E NÃO FAMILIAR NOS TEMPOS 24H E 48H. (A) Comparação do índice de discriminação entre os momentos basal, pós-privação e pós-rebote de 24 horas; (B) Comparação do índice de discriminação entre os momentos basal, pós-privação e pós-rebote de 48 horas. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. Comparação com sham basal, ^a $P<0,05$; Comparação com rotenona basal, ^b $P<0,05$; ^{bbb} $P<0,0001$; Comparação com o controle do próprio grupo, ^{cc} $P<0,001$; Comparação com o controle do outro grupo, ^{dd} $P<0,001$ e ^{ddd} $P<0,0001$; Comparação com o outro grupo PSP, ^{ee} $P<0,001$; Comparação indicada pelo traçado, ^{*} $P<0,05$. ANOVA de duas vias seguida de *post hoc* de Bonferroni. Para o momento basal sham $n=67$

e rotenona n=61. Para o momento PSP de 24 h sham controle n=8, rotenona controle n=6, sham PSP n=10 e rotenona PSP n=7. Para o momento rebote de 24 h sham controle n=9, rotenona controle n=8, sham rebote n=11 e rotenona rebote n=9. Para o momento PSP de 48 h sham controle n=24, rotenona controle n=19, sham PSP n=25 e rotenona PSP n=26. Para o momento rebote de 48 h sham controle n=9, rotenona controle n=8, sham rebote n=10 e rotenona rebote n=12.

E finalizando esse experimento, foi realizada a comparação dos índices de discriminação entre os grupos PSP 24 h e PSP 48 h (figura 21A). Observou-se diferenças estatísticas para o fator grupo [$F(3,26)=10,17$; $P<0,0001$], porém não para o fator tempo [$F(1,26)=2,02$; $P=0,17$] ou interação [$F(3,26)=1,98$; $P=0,14$], observou-se, portanto, maior discriminação entre os compartimentos para o grupo sham controle PSP 48 h em comparação com o grupo rotenona PSP 24 h ($P<0,05$). Quando realizou-se a mesma comparação entre os grupos que passaram pelo rebote por 24 horas ou 48 horas (figura 21B), não houve diferença significativa nos dois fatores grupo [$F(3,32)=0,49$; $P=0,69$], tempo [$F(1,32)=0,1$; $P=0,75$] ou interação [$F(3,32)=0,57$; $P=0,64$].

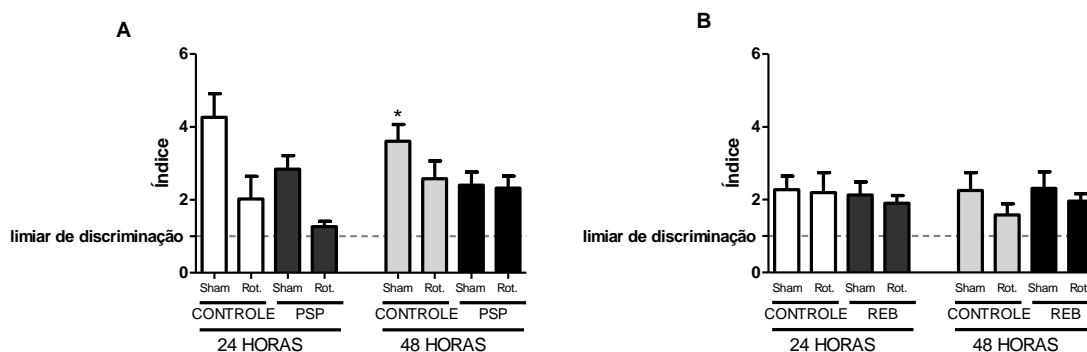


FIGURA 21- ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO (NÃO FAMILIAR/FAMILIAR) AVALIADO PELO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA UTILIZADO ODOR FAMILIAR E NÃO FAMILIAR, COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS TEMPOS DE PSP E REBOTE. (A) Comparação do índice de discriminação entre os momentos pós-privação de 24 horas e 48 horas; (B) Comparação do índice de discriminação entre os momentos pós-rebote de 24 horas e 48 horas. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. Comparação com rotenona PSP 24 h, * $P<0,05$. ANOVA de duas vias seguida

de *post hoc* de Bonferroni. Para o momento PSP de 24 h sham controle n=8, rotenona controle n=6, sham PSP n=10 e rotenona PSP n=7. Para o momento PSP de 48 h sham controle n=24, rotenona controle n=19, sham PSP n=25 e rotenona PSP n=26. Para o momento rebote de 24 h sham controle n=9, rotenona controle n=8, sham rebote n=11 e rotenona rebote n=9. Para o momento rebote de 48 h sham controle n=9, rotenona controle n=8, sham rebote n=10 e rotenona rebote n=12.

5.3.2.2 Teste de Discriminação Olfatória Modificado – Odor limão

Os resultados do teste de discriminação olfatória modificado, quando o odor limão foi colocado em um compartimento e água foi colocado no outro estão resumidos nas figuras 22 e 23.

Comparando-se o momento basal e pós-PSP 24 h, encontrou-se preferência por um dos compartimentos nos grupos do período basal e controles do período privação ($P < 0,0001$) para sham e rotenona basal e sham controle; $P < 0,05$ para grupo rotenona controle). Os grupos sham PSP 24 h e rotenona PSP 24 h não foram capazes de discriminar o odor limão, e apresentaram pior desempenho que os grupos sham basal ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente) e sham controle ($P < 0,0001$ para os dois grupos). O grupo sham controle também apresentou maior preferência pelo compartimento com odor limão comparando-se com rotenona controle ($P < 0,001$). Ainda o grupo rotenona basal preferiu o compartimento inodoro, apresentando padrão de preferência diferente com os grupos sham basal, sham controle e rotenona controle ($P < 0,0001$, $P < 0,0001$ e $P < 0,05$, respectivamente). Os três fatores foram modulados significativamente, grupo [$F(3,27)=7,48$; $P < 0,001$], tempo [$F(1,27)=4,66$; $P < 0,05$] e interação [$F(3,27)=5,07$; $P < 0,001$]. Para o índice de discriminação, figura 22A, o grupo sham controle (86%) foi capaz de diferenciar

melhor o odor limão que os grupos rotenona basal ($P < 0,001$), rotenona controle ($P < 0,05$), sham PSP ($P < 0,0001$) e rotenona PSP ($P < 0,0001$), com magnitudes de 12% e 27%, respectivamente para os dois primeiros grupos comparados. Os grupos PSP não apresentaram desvio do índice com relação ao limiar de discriminação. O grupo sham basal apresentou maior discriminação, com magnitude de 87%, em comparação com os grupos rotenona basal ($P < 0,0001$) e os dois grupos PSP, sham e rotenona ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente). Para essa análise houve diferença em relação ao fator grupo [$F(3,27)=6,28$; $P < 0,05$], tempo [$F(1,27)=6,51$; $P < 0,05$] e interação [$F(3,27)=3,99$; $P < 0,05$].

Comparando-se o tempo de permanência entre os compartimentos nos momentos basal e pós-PSP 48 h, apenas os grupos basais diferenciaram entre os compartimentos. Porém o grupo sham basal preferiu permanecer por mais tempo no compartimento com odor limão ($P < 0,0001$), enquanto que o grupo rotenona basal preferiu o compartimento inodor ($P < 0,0001$). O grupo sham basal apresentou melhor discriminação olfatória que os grupos rotenona basal ($P < 0,0001$), sham controle ($P < 0,05$), rotenona controle ($P < 0,001$) e sham PSP ($P < 0,05$). Houve diferenças nos três fatores grupo [$F(3,101)=6,40$; $P < 0,0001$], tempo [$F(1,101)=5,35$; $P < 0,05$] e interação [$F(3,101)=5,06$; $P < 0,001$]. O índice de discriminação confirmou esses dados, figura 22B. O grupo sham basal discriminou melhor os compartimentos, 75% melhor que o grupo rotenona basal ($P < 0,0001$), 73% melhor que o grupo sham controle ($P < 0,001$), 86% melhor que o grupo rotenona controle ($P < 0,001$) e 66% melhor que o grupo sham privado ($P < 0,001$). Ainda, apresentou diferença entre os grupos rotenona PSP e rotenona basal ($P < 0,001$) e sham

controle ($P < 0,05$). Os fatores grupo e interação não apresentaram diferenças [$F(3,101)=1,35$; $P=0,26$] e [$F(3,101)=1,95$; $P=0,13$], respectivamente, mas teve para o fator tempo [$F(1,101)=8,09$; $P < 0,001$].

Comparando-se o tempo de permanência nos compartimentos entre os momentos basal e pós-rebote 24h. No momento rebote não houve discriminação entre os compartimentos, apenas os grupos basais discriminaram ($P < 0,0001$). E houve diferença entre o grupo sham basal e os grupos rotenona basal ($P < 0,0001$), sham rebote ($P < 0,0001$) e rotenona rebote ($P < 0,005$). Houve diferenças entre os fatores grupo [$F(3,31)=2,83$; $P < 0,001$], tempo [$F(1,31)=8,30$; $P < 0,001$] e interação [$F(3,31)=5,7$; $P \leq 0,05$]. Similarmente, o índice de discriminação reforçou este achado, mostrando que apenas o grupos sham basal discriminou no mínimo 70% melhor entre os compartimentos que todos os outros grupos, os resultados obtidos para os fatores grupo [$F(3,31)=1,18$; $P=0,33$], tempo [$F(1,31)=1,73$; $P=0,20$] e interação [$F(3,31)=0,67$; $P=0,58$], figura 22A.

Para o tempo de permanência nos compartimentos nos momentos basal e pós-rebote 48 h não há significância estatística para a discriminação no momento pós-rebote, tendo assim apenas diferenças no momento basal. Assim o grupo sham basal teve melhor discriminação que os grupos rotenona basal ($P < 0,0001$), rotenona controle ($P < 0,05$) e rotenona rebote ($P < 0,05$). Por esse motivo houve diferença para os fatores tempo [$F(1,43)=4,91$; $P < 0,05$] e grupo [$F(3,43)=3,74$; $P < 0,05$], mas não para a interação [$F(3,43)=1,6$; $P=0,2$]. Na figura 22B está ilustrada a comparação utilizando o índice de discriminação, que também mostrou

apenas maior magnitude de discriminação para o grupo sham basal quando comparado com os outros grupos. Não foi observado diferenças entre os fatores grupo [F(3,43)=0,74; P=0,42], tempo [F(1,43)=1,55; P=0,23] e interação [F(3,43)=0,56; P=0,65].

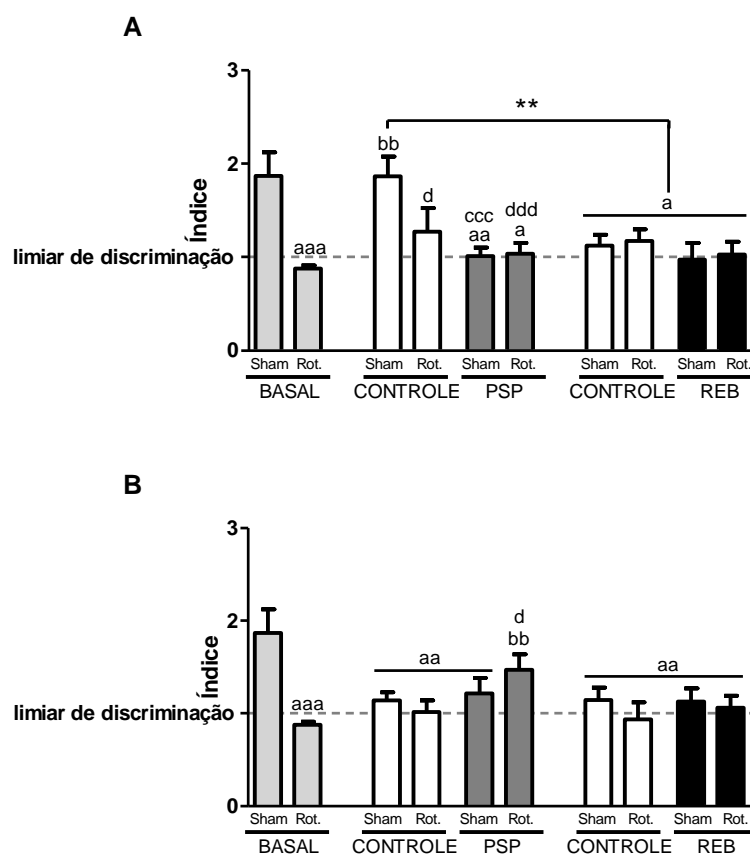


FIGURA 22- ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO (LIMÃO/ÁGUA) AVALIADO PELO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA MODIFICADO UTILIZADO ODOR LIMÃO E ÁGUA NOS TEMPOS 24H E 48H. (A) Comparação do índice de discriminação entre os momentos basal, pós-privação e pós-rebote de 24 horas; (B) Comparação do índice de discriminação entre os momentos basal, pós-privação e pós-rebote de 48 horas. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. Comparação com sham basal, ^aP<0,05; ^{aa}P<0,001; ^{aaa}P<0,0001; Comparação com rotenona basal, ^{bb}P<0,001; Comparação com controle do próprio grupo, ^{ccc}P<0,0001; Comparação o controle de outro grupo, ^dP<0,05 e ^{ddd}P<0,0001; Comparação indicada pelo traçado, ^{**}P<0,001. ANOVA de duas vias seguida de *post hoc* de Bonferroni. Para o momento basal sham n=67 e rotenona n=61. Para o momento PSP de 24 h sham controle n=8, rotenona controle n=6, sham PSP n=10 e rotenona PSP n=7. Para o momento rebote de 24 h sham controle n=9, rotenona controle n=8, sham rebote n=11

e rotenona rebote n=9. Para o momento PSP de 48 h sham controle n=24, rotenona controle n=19, sham PSP n=25 e rotenona PSP n=26. Para o momento rebote de 48 h sham controle n=9, rotenona controle n=8, sham rebote n=10 e rotenona rebote n=12.

A comparação entre o momento pós-PSP 24 h e seu respectivo rebote considerando a discriminação dos odores limão e água encontra-se na figura 22A. O grupo sham controle PSP apresentou maior preferência (86%) que os grupos sham controle rebote (12%), rotenona controle rebote (6%), sham rebote (13%) e rotenona rebote (6%), com $P < 0,001$ para todas as comparações, confirmando esses achados houve significância para o fator grupo [$F(3,26)=3,31$; $P < 0,05$] e interação [$F(3,26)=2,97$; $P \leq 0,05$], porém não para o fator tempo [$F(1,26)=3,75$; $P=0,06$]. Quando foram realizadas as mesmas comparações para os grupos PSP 48 h e seu respectivo rebote não foram encontradas diferenças significativas entre os fatores grupo [$F(3,42)=0,32$; $P=0,81$], tempo [$F(1,42)=0,36$; $P=0,55$], e interação [$F(3,42)=0,00$; $P=0,99$] como mostrado na figura 22B.

Finalmente, foi realizada a comparação do índice de discriminação entre os grupos PSP 24 h e os grupos PSP 48 h, figura 23A. Houve diferenças considerando o fator tempo [$F(1,27)=6,84$; $P < 0,05$], grupo [$F(3,27)=3,52$; $P < 0,05$] e interação [$F(3,27)=3,6$; $P < 0,05$], não havendo diferenciação significativa de compartimentos entre os grupos nesses testados. Também realizou-se essa comparação entre os grupos rebote por 24 h e 48 h, não encontrou-se diferença significativa nos fatores grupo [$F(3,31)=0,8$; $P=0,5$], tempo [$F(1,31)=0,38$; $P=0,54$] e interação [$F(3,31)=0,42$; $P=0,74$], figura 23B.

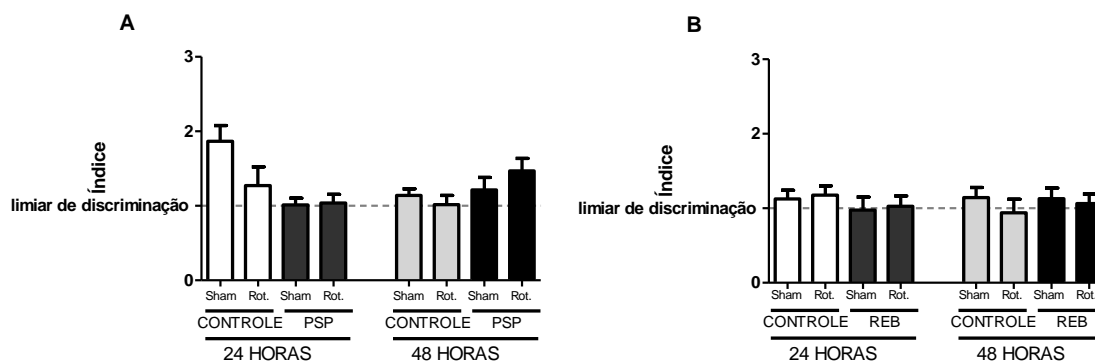


FIGURA 23- ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO (LIMÃO/ÁGUA) AVALIADO PELO TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA UTILIZADO ODOR LIMÃO E ÁGUA, COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS TEMPOS DE PSP E REBOTE. (A) Comparação do índice de discriminação entre os momentos pós-privação de 24 horas e 48 horas; (B) Comparação do índice de discriminação entre os momentos pós-rebote de 24 horas e 48 horas. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. ANOVA de duas vias seguida de post hoc de Bonferroni. Para o momento PSP de 24 h sham controle n=8, rotenona controle n=6, sham PSP n=10 e rotenona PSP n=7. Para o momento PSP de 48 h sham controle n=24, rotenona controle n=19, sham PSP n=25 e rotenona PSP n=26. Para o momento rebote de 24 h sham controle n=9, rotenona controle n=8, sham rebote n=11 e rotenona rebote n=9. Para o momento rebote de 48 h sham controle n=9, rotenona controle n=8, sham rebote n=10 e rotenona rebote n=12.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o desempenho olfatório e motor de ratos submetidos à administração intranigral de rotenona e a PSP de forma isolada ou conjuntamente. De maneira ampla, nossos resultados mostram que tanto a lesão da via nigroestriatal quanto a PSP nos tempos testados foram capazes de produzir efeitos importantes no desempenho olfatório dos ratos. O segundo experimento definiu uma janela temporal para a realização da metodologia de PSP, figuras 16 à 18, excluindo-se os prejuízos motores decorrentes do período de recuperação da lesão da via nigroestriatal. Observou-se que os animais apresentavam recuperação motora total no 7º dia, assim esse dia foi escolhido para o início da PSP. Esse achado corrobora com outro estudo que também utilizou rotenona, porém com administração intraperitoneal (MORAIS et al. 2012). Com relação à motricidade, no experimento 3, pudemos observar que os grupos no momento basal não apresentavam diferenças no parâmetro de distância percorrida, figura 19, e que apenas a PSP de 48 h gerou aumento significativo desse parâmetro para os grupos sham e tendência para rotenona (submetidos à PSP), em relação aos grupos controle. Esse aumento da motricidade é um achado que indica o surgimento da supersensibilidade dopaminérgica classicamente gerada pela PSP (TUFIK et al. 1978; NUNES et al. 1994; LIMA et al. 2008). Nunes e colaboradores (1994), através de um estudo de neuro-imagem de encéfalos de ratos, encontraram aumentos consistentes na densidade de receptores dopaminérgicos, principalmente D2, no

estriado e núcleo accumbens após PSP de 96 h, e ainda tendência de aumento no tubérculo olfatório. Esses achados mostram o efeito da PSP no sistema dopaminérgico, explicando essa alteração no comportamento motor. Observa-se, ainda, que esse efeito é dependente do tempo de PSP, sendo mais evidente com o períodos mais longos de PSP, como 96 h, por exemplo (TUFIK et al. 1978; LIMA et al. 2008; DOS SANTOS et al. 2013).

Com relação ao desempenho olfatório, o teste de discriminação olfatória utilizando odor familiar pareceu ser mais sensível a essas alterações que a utilização do odor não social selecionado (limão), embora os prejuízos tenham sido evidentes nos dois testes. A análise do segundo experimento mostra os efeitos isolados associados aos prejuízos olfatórios oriundos da lesão da SNpc produzida pela administração de rotenona, figura 17. Essas alterações ficaram evidentes quando aplicamos na análise os cálculos que permitiram estabelecer os índices de discriminação olfatória, que se mostraram reduzidos em todos os tempos testados após às lesões com rotenona. Entretanto, como no primeiro dia após a rotenona ainda observa-se um forte viés motor (figura 16), podemos inferir que o prejuízo olfatório encontrado a partir do sétimo dia configurar-se-ia como puramente de natureza olfatória.

No terceiro experimento observamos tais prejuízos dentro do paradigma da PSP, através da não diferenciação entre compartimentos e proximidade do limiar de discriminação nos gráficos do índice de discriminação, figuras 20 à 23. No momento basal (7º dia) houve diferença entre grupos rotenona e sham,

confirmando que a perda neuronal dopaminérgica *per se* foi suficiente para promover prejuízos significativos nos dois tipos de odores testados, odor do próprio animal (figura 20) e limão (figura 22). Os grupos sham apresentaram melhor desempenho no momento basal, tanto no teste de discriminação olfatória com odor familiar quanto no teste modificado. Enquanto que a perda de 30% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, confirmada no experimento 2, foi suficiente para gerar prejuízos na discriminação entre os odores (familiar e não familiar; limão e água) no grupo rotenona, figura 18.

Em nosso estudo pudemos observar que a lesão da via nigroestriatal foi capaz de piorar o desempenho olfatório em 124%, sugerindo que a SNpc também possa ser responsável por algum nível de modulação sobre a olfação. Nesse sentido, observa-se que a administração de levodopa sistemicamente é capaz de gerar melhora no desempenho olfatório em ratos (PAVLIS et al. 2006). Outro estudo que utilizou administração sistêmica de agonistas e antagonistas de receptores D1 e D2, encontrou mudanças nas respostas olfatórias (YUE et al. 2004). Tanto os agonistas D1 quanto os antagonistas D2 melhoraram o desempenho olfatório, enquanto que os antagonistas D1 e agonistas D2 geraram prejuízo severo na discriminação de odores em ratos. Os mecanismos que pelos quais as vias dopaminérgicas influenciam a olfação ainda não foram esclarecidos.

Devemos atentar também para o fato de que a dimensão da lesão alcançada neste experimento (figura 18), mimetiza estágios subclínicos da DP, lembrando que a literatura aponta para lesões acima de 60% da SNpc para o surgimento da

sintomatologia motora (BRAAK et al. 2004), assim a olfação parece ser mais sensível à extensões menores de lesão neuronal dopaminérgica nesta região. Essa hipótese explicaria seu surgimento precoce e importante papel no diagnóstico da DP (PONSEN et al. 2010).

Quanto ao desempenho olfatório após a PSP, apenas do grupo sham apresentou piora com odor familiar (figura 20), o prejuízo dos grupos rotenona se manteve estável, embora pareça haver uma tendência de piora pela redução observado nos índices, sendo que o período rebote foi capaz de reverter esse prejuízo, para o teste com odor familiar, como mostrado na figura 20. Com 48 h de PSP os animais não apresentam prejuízos relevantes, sendo mantida a resposta no período rebote. Nesses animais até mesmo o grupo controle não manteve a piora encontrada no momento basal. Contrariamente, com o odor limão, a PSP de 48 h manteve o prejuízo olfatório, porém esse prejuízo foi visto também nos grupos controles, indicando uma possível habituação que se manteve no período rebote. Comparando-se os tempos diferentes de PSP podemos observar indícios de que as respostas sejam diferentes, como pode ser visualizado no perfil do gráfico apresentado na figura 22B. Esses achados mostram que a olfação também sofreu influência da PSP, isso pode ser explicado pelo fato que a PSP induz uma supersensibilidade de receptores dopaminérgicos, principalmente da família D2 (TUFIK et. al, 1978). Esses receptores como já foi discutido estão relacionados com a piora da olfação (YUE et al., 2004). O desempenho motor após a PSP de 48 horas de PSP, mostrado na figura 19B, confirma que os animais do grupo sham e

rotenona apresentam sinais de hipersensibilidade dopaminérgica, que foi revertida após o período de rebote.

A PSP parece modular de forma mais branda os prejuízos olfatórios quando comparado com a magnitude do efeito observado pela perda neuronal na SNpc, figuras 20 à 23. Mas é inegável que a privação tenha efeito, devido às diferenças na resposta observada após o rebote, principalmente com odores sociais. Os diferentes tempos de privação, também geraram diferentes respostas. Assim, o efeito do tempo pode ser observado também supersensibilidade dopaminérgica nas estruturas olfatórias.

Sobre o padrão de preferência, de forma geral os animais preferiram o odor não familiar e o odor limão, diferente do estudo de Soffié e Lamberty (1988), que utilizou esse teste pela primeira vez. Neste estudo, foi encontrada preferência pelo odor familiar. Carr et. al. (1976) e Prediger et. al. (2005) também demonstraram a preferência pelo compartimento com odor familiar. O interessante é que o grupo rotenona basal apresentou inversão na preferência, indicando que o odor limão tornou-se aversivo para os animais rotenona. Esse odor foi selecionado a partir do experimento 1, visto que a preferência pelo mesmo foi incontestável, como mostra a figura 15. Essas diferenças podem ter ocorrido por diferenças na execução do teste, no presente estudo optamos por colocar a arena do teste no fluxo laminar, diminuindo a interferência de odores externos aos testes. Somando-se a isso, está a diferença na captação e armazenamento do cepilho. Devido a utilização a técnica de plataforma única, não foi possível recolher o cepilho para o teste no momento

pós-privação. Por isso em todos os experimentos os animais foram isolados no 5º dia e o cepilho foi recolhido no 7º dia (permaneceu por 48 h para a impregnação do odor) e armazenado. Em todos os momentos foi utilizado este cepilho recolhido no 7º dia. Propomos que essas diferenças tenham levado à mudança da preferência no teste de discriminação olfatória.

De maneira geral os nossos achados mostram que a SNpc está envolvida, de forma relevante, com a olfação, assim como a PSP que se mostrou capaz de induzir prejuízos olfatórios. Esses achados inéditos, até onde nos consta, mostram a importância da relação desses mecanismos aqui apresentados. A perda neuronal dopaminérgica de 30% na SNpc, que mimetiza estágios prodrômicos, isoladamente, foi suficiente para promover prejuízos significativos no desempenho olfatório. A PSP gerou supersensibilidade dopaminérgica, que pode estar relacionada principalmente por mecanismos dependentes dos receptores D2, como mostrado por Nunes e colaboradores (1994), que parecem modular negativamente a função olfatória. Esses resultados abrem caminhos para uma nova abordagem tanto do ponto de vista fisiopatológico quanto terapêutico, no que diz respeito à DP. Novos estudos serão necessários para permitir maiores avanços no que diz respeito à neurobiologia do sistema olfatório e sua regulação pelo sistema dopaminérgico, particularmente no contexto da DP e de seus modelos animais.

7 CONCLUSÕES

O desempenho olfatório foi prejudicado tanto a lesão da via nigroestriatal quanto pela PSP em ratos.

- A motricidade não foi alterada pela perda dopaminérgica a partir do sétimo dia após a administração da droga, porém a PSP de 48 h gerou aumento da distância percorrida para o grupo sham, sugestivo de hipersensibilidade dopaminérgica;
- Os efeitos na morte neuronal na SNpc apresentaram uma magnitude de 30%, e foram suficientes para promover um pior desempenho olfatório comparando com o grupo sham;
- A PSP per se foi capaz de piorar o desempenho olfatório do grupo sham, o grupo rotenona se manteve prejudicado para o teste de discriminação com odor familiar e limão. O sono rebote foi capaz de reverter o prejuízo no teste de discriminação com odor familiar. O odor limão não foi tão sensível às alterações geradas pela PSP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABA, T.; KIKUCHI, A.; HIRAYAMA, K.; NISHIO, Y.; HOSOKAI, Y.; KANNO, S.; TAKEDA, A. Severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with Parkinson's disease: a 3 year longitudinal study. **Brain**, v. 135, p. 161–9, 2012.

BANNIER, S.; BERDAGUÉ, J. L.; RIEU, I.; DE CHAZERON, I.; MARQUES, A.; DEROST, P.; DURIF, F. Prevalence and phenomenology of olfactory hallucinations in Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 83, p. 1019–21, 2012.

BARRAUD, Q.; LAMBRECQ, V.; FORNI, C.; MCGUIRE, S.; HILL, M.; BIOULAC, B. GHORAYEB, I. Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. **Exp Neurol**, v. 219, p. 574-82, 2009.

BERG, D.; POEWE, W. Can we define “pre-motor” Parkinson's disease? **Mov. Disord.**, v. 27, p.595–6, 2012.

BETARBET, R.; CANET-AVILES, R. M.; SHERER, T. B.; MASTROBERARDINO, P. G.; MCLENDON, C.; KIM, J.; LUND, S.; NA, H.; TAYLOR, G.; BENICE, N. F.; KOPITO, R.; SEO, B. B.; YAGI, T.; YAGI, A.; KLINEFELTER, G.; COOKSON, M. R.; GREENAMYRE, J. T. Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. **Neurobiol. Dis.**, v. 22, p. 404–20, 2006.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; MACKENZIE, G.; GARCIA-OSUNA, M.; PANOV, A. V.; GREENAMYRE, J. T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson ' s disease. **Nature Neurosciences**, v. 26, p.1301–1306, 2000.

BOEVE, B.F.; SILBER, M.H.; FERMAN, T.J.; KOKMEN, E.; SMITH, G.E.; IVNIK, R.J.; PARISI, J.E.; OLSON, E.J.; PETERSEN, R.C. REM sleep behavior disorder and degenerative dementia: an association likely reflecting Lewy body disease. **Neurology**, v. 51, p. 363–70, 1998.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; BRATZKE, H.; HAMM-CLEMENT, J.; SANDMANN-KEIL, D.; & RÜB, U. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). **J. Neurol.**, v. 249, p. III/1–5, 2002.

BRAAK, H.; TREDICI, K. DEL; RÜB, U.; DE VOS, R. A.; JANSEN STEUR, E. N.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol. Aging**, v. 24, p. 197–211 (2003a).

BRAAK, H.; RÜB, U.; GAI, W. P.; TREDICI, K. D. Idiopathic Parkinson's disease : possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. **J. Neural Transm.**, p. 517–536, 2003b.

BRAAK, H.; GHEBREMEDHIN, E.; RÜB, U.; BRATZKE, H.; TREDICI, K. D. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res.**, v. 318, p. 121–34, 2004.

BUSSE, K.; HEILMANN, R.; KLEINSCHMIDT, S.; ABU-MUGHEISIB, M.; HÖPPNER, J.; WUNDERLICH, C.; WALTER, U. Value of combined midbrain sonography, olfactory and motor function assessment in the differential diagnosis of early Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 83, p. 441–7, 2012).

CABEZA-ARVELAIZ, Y.; SCHIESTL, R. H. Transcriptome analysis of a rotenone model of parkinsonism reveals complex I-tied and -untied toxicity mechanisms common to neurodegenerative diseases. **PLoS One**, v. 7, p. e44700, 2012.

CARR, W. J.; YEE, L.; GABLE, D.; MARASCO, E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **J Comp PhysiolPsychol**, v. 90(9), p. 821-8, 1976.

CHOU, A. P.; LI, S.; FITZMAURICE, A. G.; BRONSTEIN, J. M. Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. **Neurotoxicology**, v. 31, p. 367–72, 2010.

COMELLA, C. L.; NARDINE, T. M.; DIEDERICH, N. J.; STEBBINS, G. T. REM sleep behavior disorder in Parkinson ' s disease. **Neurology**, v. 51, p. 526–529, 1998.

DAUVILLIERS, Y.; POSTUMA, R. B.; FERINI-STRAMBI, L.; ARNULF, I.; HÖGL, B.; MANNI, R.; MONTPLAISIR, J. Family history of idiopathic REM behavior disorder: a multicenter case-control study. **Neurology**, v. 80, p. 2233–5, 2013.

DE COCK, V.C.; VIDAILHET, M.; LEU, S.; TEXEIRA, A.; APARTIS, E.; ELBAZ, A., et al. Restoration of normal motor control in Parkinson's disease during REM sleep. **Brain**, v. 130, p. 450-6, 2007.

DHILLON, A. S.; TARBOTTON, J. L.; LEVIN, J. L.; PLOTKIN, G. M.; LOWRY, L. K.; NALBONE, J. T.; SHEPHERD, S. Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. **J Agromedicine**, v. 13(1), p. 37-48, 2008.

DOS SANTOS, A. C. D.; CASTRO, M. A. V.; JOSE, E. A. K.; DELATTRE, A. M., DOMBROWSKI; P. A., DA CUNHA; C.; LIMA, M. M. S. REM sleep deprivation generates cognitive and neurochemical disruptions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. **J. Neurosci. Res.**, v. 91, p. 1508–1516, 2013.

DOUBLE, K. L.; ROWE, D. B.; HAYES, M.; CHAN, D. K. Y.; BLACKIE, J.; CORBETT, A.; HALLIDAY, G. M. Identifying the pattern of olfactory deficits in

Parkinson disease using the brief smell identification test. **Arch. Neurol.**, v. 60, p. 545–9, 2003.

DZIRASA, K.; RIBEIRO, S.; COSTA, R.; SANTOS, L. M.; LIN, S.C., GROSMARK; A., ET AL. Dopaminergic control of sleep-wake states. **J Neurosci.**, v. 26, p. 10577-89, 2006.

FAHN, S. Description of Parkinson ' s Disease as a Clinical Syndrome. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, p. 1–14, 2003.

FANTINI, M. L.; POSTUMA, R. B.; MONTPLAISIR, J.; FERINI-STRAMBI, L. Olfactory deficit in idiopathic rapid eye movements sleep behavior disorder. **Brain Res. Bull.**, v. 70, p. 386–90, 2006.

FLEMING, S. M.; TETREAULT, N. A.; MULLIGAN, C.K.; HUTSON, C. B.; MASLIAH, E.; CHESSELET, M.F. Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. **Eur. J. Neurosci.**, v. 28, p. 247–56, 2008.

GAGNON, J.; BÉDARD, M.; FANTINI, M. L.; PETIT, D.; PANISSET, M. REM sleep behavior disorder and REM sleep without atonia in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 59(4), p. 585–589, 2002.

HAEHNER, A.; HUMMEL, T.; HUMMEL, C.; SOMMER, U.; JUNGHANNS, S.; REICHMANN, H. Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v. 22, p. 839–42, 2007.

HAWKES, C. e DOTY, R. L. **The Neurology of olfaction**. Cambridge University Press, Nova Iorque, 2009.

HAWKES, C. Olfaction in neurodegenerative disorder. **Adv. Otorhinolaryngol.**, v. 63, p. 133–51, 2006.

HUISMAN, E.; UYLINGS, H. B. M.; HOOGLAND, P. V. A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v. 19, p. 687–92, 2004.

ICKENSTEIN, G. W.; KLOTZ, J. M.; LANGOHR, H. D. Virus encephatitis with symptomatic Parkinson syndrome, diabetes insipidus and panhypopituitarism. **Fortschr Neurol Psychiatr**, v. 67(10), p. 476-81, 1999.

IRANZO, A.; MOLINUEVO, J. L.; SANTAMARÍA, J.; SERRADELL, M.; MARTÍ, M. J.; VALLDEORIOLA, F. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. **Lancet Neurol.**, v. 5, p. 572–7, 2006.

Iranzo, A. Parkinson disease and sleep: sleep-wake changes in the premotor stage of Parkinson disease; impaired olfaction and other prodromal features. **Curr. Neurol. Neurosci. Rep.**, v. 13, p. 373, 2013.

KARUPPAGOUNDER, S. S.; MADATHIL, S. K.; PANDEY, M.; HAOBAM, R.; RAJAMMA, U.; MOHANAKUMAR, K. P. Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. **Neuroscience**, v. 236, p.136–48, 2013.

KATZENSCHLAGER, R.; LEES, A. J. Olfaction and Parkinson's syndromes: its role in differential diagnosis. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 17, p. 417–423, 2004.

KILLGORE, W.; MCBRIDE, S. Odor identification accuracy declines following 24 h of sleep deprivation. **J. Sleep Res.**, v. 15, p. 111–116, 2006.

KILLGORE, W. D. S.; KILLGORE, D. B.; GRUGLE, N. L.; BALKIN, T. J. Odor identification ability predicts executive function deficits following sleep deprivation. **Int. J. Neurosci.**, v. 120, p. 328–34, 2010.

LANE, E.; DUNNETT, S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: how close are we to the clinic? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 199 (3), p. 303-12, 2008.

LANG, E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **N. England J. Med**, v. 339, p. 1044-1053, 1998.

LIMA, M. M. S.; REKSIDLER, A. B.; ZANATA, S. M.; MACHADO, H. B.; TUFIK, S.; VITAL, M. A. B. F. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. **Brain Research**, v. 1101(1), p. 117–25, 2006.

LIMA, M. M. S.; ANDERSEN, M. L.; REKSIDLER, A. B.; VITAL, M. A. B. F.; TUFIK, S. Effects of sleep deprivation on tyrosine hydroxylase expression and dopamine-related behaviors in two models of Parkinson's Disease. **Sleep Medicine**, v. Suppl1, p. S103, 2007a.

LIMA, M. M. S.; ANDERSEN, M. L.; REKSIDLER, A. B.; VITAL, M. A. B. F.; TUFIK, S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. **PLoS One**, v. 2, p. 513, 2007b.

LIMA, M. M. S.; REKSIDLER, A. B.; VITAL, M. A. B. F. The dopaminergic dilemma: Sleep or wake? Implications in Parkinson's disease. **Bioscience Hypothesis**, v. 1, p. 9-13, 2008.

LIMA, M. M. S.; ANDERSEN, M. L.; REKSIDLER, A. B.; SILVA, A.; ZAGER, A; ZANATA, S. M.; VITAL, M. A. B. F.; TUFIK, S. Blockage of dopaminergic D(2) receptors produces decrease of REM but not of slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. **Behav Brain Res**, v. 188(2), p. 406-11, 2008a.

LIMA, M. M. S.; REKSIDLER, A. B.; VITAL, M. A. B. F. The neurobiology of the substantia nigra pars compacta: from motor to sleep regulation. **Journal Neural Trasm. Suppl.**, v. 73, p. 135-145, 2009.

LIMA, M. M.; MARTINS, E. F.; DELATTRE, A. M.; PROENCA, M. B.; MORI, M. A.; CARABELLI, B.; FERRAZ, A. C. Motor and non-motor features of Parkinson's disease - a review of clinical and experimental studies. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, p. 439–449, 2012.

LIMA, M. M. S. Sleep disturbances in Parkinson's disease: the contribution of dopamine in REM sleep regulation. **Sleep Med. Rev.**, v. 17, p. 367–75, 2013.

MACHADO, R. B.; SUCHECKI, D.; TUFIK, S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. **Behav. Brain Res.**, v.160, p.356–64, 2005.

MALLICK, B. N.; SINGH, A.; KHANDAY, M. A. Activation of inactivation process initiates rapid eye movement sleep. **Prog. Neurobiol.**, v.97, p.259–76, 2012.

MCCARLEY, R. W. Neurobiology of REM and NREM sleep. **Sleep Med.**, v.8, p.302–30, 2007.

MENA-SEGOVIA, J.; BOLAM, J. P.; MAGILL, P. J. Pedunculo-pontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? **Trends Neurosci.**, v.27, p.585–8, 2004.

MESHOLAM, R. I.; MOBERG, P. J.; MAHR, R. N.; DOTY, R. L. Olfaction in Neurodegenerative Disease. **Archives of Neurology**, v.55, p.84–90, 1998.

MONTI, J. M.; MONTI, D. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking. **Sleep Med. Rev.**, v.11, p.113–33, 2007.

MORAIS, L. H.; LIMA, M. M. S.; MARTYNHAK, B. J.; SANTIAGO, R.; TAKAHASHI, T. T.; ARIZA, D.; VITAL, M. A. B. F. Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration. **Pharmacol. Rep.**, v.64, p.1081–90, 2012.

MOREIRA, C. G.; BARBIERO, J. K.; ARIZA, D.; DOMBROWSKI, P. A.; SABIONI, P.; BORTOLANZA, M.; CUNHA, C. D.; VITAL, M. A.; LIMA, M. M. S. Behavioral, Neurochemical and Histological Alterations Promoted by Bilateral Intranigral Rotenone Administration: A New Approach for an Old Neurotoxin. **Neurotox Res.**, v.21, p.291-301, 2012.

MUNDIÑANO, I. C.; CABALLERO, M.C.; ORDÓÑEZ, C.; HERNANDEZ, M.; DICAUDO, C.; MARCILLA, I.; LUQUIN, M.R. Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. **Acta Neuropathol.**, v.122, p.61–74, 2011.

NUNES JÚNIOR, G. P.; TUFIK, S.; NOBREGA, J. N. Autoradiographic analysis of D1 and D2 dopaminergic receptors in rat brain after paradoxical sleep deprivation. **Brain research bulletin**, v.34(5), p.453–456, 1994.

OLANOW, C. W.; OBESO, J. A. The significance of defining preclinical or prodromal Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v.27, p.666–9, 2012.

OLSON, E. J.; BOEVE, B. F.; SILBER, M. H. Rapid eye movement sleep behaviour disorder: demographic, clinical and laboratory findings in 93 cases. **Brain**, v.123, p.331–9, 2000.

PAVLIS, M.; FERETTI, C.; LEVY, A.; GUPTA, N.; LINSTER, C. I-DOPA improves odor discrimination learning in rats. **Physiol. Behav.**, v.87, p.109–13, 2006.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 5ª edição San Diego: Academic Press, 2005.

PONSEN, M. M.; STOFFERS, D.; BOOIJ, J.; VAN ECK-SMIT, B. L. F.; WOLTERS, E. C.; BERENDSE, H. W. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, v.56, p.173–81, 2004.

PONSEN, M. M.; STOFFERS, D.; WOLTERS, E. C.; BOOIJ, J.; BERENDSE, H. W. Olfactory testing combined with dopamine transporter imaging as a method to detect prodromal Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v.81, p.396–9, 2010.

PORKKA-HEISKANEN, T.; ZITTING, K.-M.; WIGREN, H.-K. Sleep, its regulation and possible mechanisms of sleep disturbances. **Acta Physiol.**, v.208, p.311–28, 2013.

POSTUMA, R. B.; GAGNON, J. F.; VENDETTE, M.; MONTPLAISIR, J. Y. Markers of neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder and Parkinson's disease. **Brain**, v.132, p.3298–307, 2009.

POSTUMA, R. B.; MONTPLAISIR, J. Transcranial ultrasound and olfaction in REM sleep behavior disorder: testing predictors of Parkinson's disease. **Sleep Med.**, v.11, p.339–40, 2010.

POSTUMA, R. B.; AARSLAND, D.; BARONE, P.; BURN, D. J.; HAWKES, C. H.; OERTEL, W.; ZIEMSEN, T. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v.27, p.617–26, 2012.

POSTUMA, R. B.; ARNULF, I.; HOGL, B.; IRANZO, A.; MIYAMOTO, T.; DAUVILLIERS, Y.; MONTPLAISIR, J. Y. A single-question screen for rapid eye movement sleep behavior disorder: a multicenter validation study. **Mov. Disord.**, v.27, p.913–6, 2012a.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol. Aging**, v.26, p.957–64, 2005a.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R. N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behav. Brain Res.**, v.159, p.197–205, 2005b.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; MEDEIROS, R.; PANDOLFO, P.; FLORIO, J. C.; TAKAHASHI, R. N. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Exp. Neurol.**, v.202, p.391–403, 2006.

REKSIDLER, A. B.; LIMA, M. M. S.; DOMBROWSKI, P.; ANDERSEN, M. L.; ZANATA, S. M.; ANDREATINI, R.; TUFIK, S.; VITAL, M. A. B. F. Repeated intranigral MPTP administration: a new protocol of prolonged locomotor impairment mimicking Parkinson's disease. **J. Neurosci. Methods**, v.167, p.268–77, 2008.

ROSS, G. W.; PETROVITCH, H.; ABBOTT, R. D.; TANNER, C. M.; POPPER, J.; MASAKI, K.; WHITE, L. R. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, v.63, p.167–73, 2008.

SAIFEE, T.; LEES, A. J.; SILVEIRA-MORIYAMA, L. Olfactory function in Parkinson's disease in ON versus OFF states. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v.81, p.1292–3, 2010.

SANTIAGO, R. M.; BARBIEIRO, J., LIMA; M. M. S., DOMBROWSKI, P. A.; ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. B. F. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.34, p.1104–14, 2010.

SANTOS, A. C.; ANDERSEN, M. L.; LIMA, M. M. S.; TUFIK, S. Gentle handling temporarily increases c-Fos in the substantia nigra pars compacta. **Braz J Med Biol Res**, v.41(10), p.920-25, 2008.

SCHENCK, C. H.; BUNDLIE, S. R.; MAHOWALD, M. W. Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. **Neurology**, v.46(2), p.388-93, 1996.

SIDEROWF, A.; LANG, A. E. Premotor Parkinson's disease: concepts and definitions. **Mov. Disord.**, v.27, p.608–16, 2012.

SIDEROWF, A.; JENNINGS, D.; EBERLY, S.; OAKES, D.; HAWKINS, K. A.; ASCHERIO, A.; MAREK, K. Impaired olfaction and other prodromal features in the Parkinson At-Risk Syndrome Study. **Mov. Disord.**, v.27, p.406–12, 2012.

SILVEIRA-MORIYAMA, L.; CARVALHO, M. D. J.; KATZENSCHLAGER, R.; PETRIE, A.; RANVAUD, R.; BARBOSA, E. R.; LEES, A. J. The use of smell identification tests in the diagnosis of Parkinson's disease in Brazil. **Mov. Disord.**, v.23, p.2328–34, 2008.

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. **Behav. Processes**, v.17, p.181–190, 1988.

STIASNY-KOLSTER, K.; DOERR, Y.; MÖLLER, J. C.; HÖFFKEN, H.; BEHR, T. M.; OERTEL, W. H.; MAYER, G. Combination of “idiopathic” REM sleep behaviour disorder and olfactory dysfunction as possible indicator for alpha-synucleinopathy demonstrated by dopamine transporter FP-CIT-SPECT. **Brain**, v.128, p.126–37, 2005.

SUZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; YOSHIOKA, M.; MURAKAMI, M.; KAWASAKI, K.; URASHIMA, M. The odor stick identification test for Japanese differentiates Parkinson’s disease from multiple system atrophy and progressive supra nuclear palsy. **BMC Neurol.**, v.11, p.157, 2011.

TISSINGH, G.; BERENDSE, H. W.; BERGMANS, P.; DEWAARD, R.; DRUKARCH, B.; STOOF, J. C.; WOLTERS, E. C. Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson’s disease: Possible implications for early diagnosis. **Mov. Disord.**, v.16, p.41–46, 2001.

TUFIK, S.; LINDSEY, C.J.; CARLINI, E. A. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? **Pharmacology**, v.16, p.98-105, 1978.

VERHAVE, P. S.; JONGSMA, M. J.; VAN DEN BERG; R. M., VIS, J. C.; VANWERSCH, R. A.; SMIT, A.B.; et al. REM sleep behavior disorder in the marmoset MPTP model of early Parkinson disease. **Sleep**, v.34, p.1119-25, 2011.

YUE, E. L.; CLELAND, T. A; PAVLIS, M.; LINSTER, C. Opposing effects of D1 and D2 receptor activation on odor discrimination learning. **Behav. Neurosci.**, v.118, p.184–90, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE 1	ARTIGO PUBLICADO: Does Parkinson's Disease and Type-2 Diabetes Mellitus Present Common Pathophysiological Mechanisms and Treatments?.....	88
------------	---	----

Does Parkinson's Disease and Type-2 Diabetes Mellitus Present Common Pathophysiological Mechanisms and Treatments?

Marcelo M.S. Lima^{*}, Adriano D.S. Targa, Ana Carolina D. Nosedá, Laís S. Rodrigues, Ana Márcia Delattre, Fabíola Vila dos Santos, Mariana H. Fortes, Maira J. Maturana and Anete C. Ferraz

Laboratório de Neurofisiologia. Departamento de Fisiologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

Abstract: Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease afflicting about 1% of people over 65 years old and 4-5% of people over 85 years. It is proposed that a cascade of deleterious factors is set in motion within that neuron made not of one, but rather of multiple factors such as free radicals, excitotoxicity, neuroinflammation, and apoptosis to cite only some of the most salient. In this scenario, chronic systemic inflammation, as well as impaired mitochondrial metabolism, have also been suspected of playing a role in the development of type-2 diabetes, and the possibility of a shared pathophysiology of PD and type-2 diabetes has been proposed. The discussion about the interactions between PD and type-2 diabetes mellitus began in the 1960's and there is still controversy. Insulin and dopamine may exert reciprocal regulation hence; hypoinsulinaemia induced by streptozotocin decreased the amounts of dopamine transporter and tyrosine hydroxylase transcripts in the substantia nigra pars compacta. Accordingly, dopamine depletion in the striatum is able to decrease insulin signaling in basal ganglia, indicating that, perhaps, PD may be considered as a risk factor for the development of type-2 diabetes mellitus. In this sense, it is described that peroxisome proliferator-activated receptor- γ , ATP-sensitive K^+ channels, AMP-activated protein kinase, glucagon-like peptide-1 and dipeptidyl peptidase-4 are important therapeutic targets for PD and reinforces the association with diabetes. Therefore, the objective of the present review is to contextualize the mutual pathophysiological interactions between PD and type-2 diabetes mellitus, as well as the potential common treatments.

Keywords: Dopamine, Treatment, Peroxisome proliferator-activated receptor- γ , Type-2 diabetes mellitus, Parkinson's disease.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease afflicting about 1% of people over 65 years old and 4-5% of people over 85 years. Typically, PD is the result of the degeneration of neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), which leads to the subsequent reduction of dopaminergic input to the striatum. Moreover, there is a degeneration of neurons of selected brain stem nuclei (locus coeruleus, raphe nuclei, dorsal motor nucleus of the vagus), cortical neurons (particularly within the cingulate gyrus and the entorhinal cortex), the nucleus basalis of Meynert and of preganglionic sympathetic and parasympathetic neurons. In the soma of these neurons, the existence of intracellular proteinaceous inclusions, called Lewy bodies and Lewy neurites, mainly composed of α -synuclein, have been observed [1]. The characteristic distribution of these aggregations is considered to be the most classical neuropathological hallmark of PD.

Several reports discuss that the mechanism of neuronal death in PD starts with an otherwise healthy dopaminergic neuron being hit by an etiological factor, such as mutant α -synuclein. Besides, type-2 diabetes mellitus, chronic renal

failure, past brain insults, or genetically determined differences in drug metabolism were also suggested as a risk factor for PD [2, 3]. Also, the coexistence of dopaminergic neurons and insulin receptors in the SNpc reinforce the occurrence of a direct association between the two diseases [4, 5]. There are various ways in which a shared pathogenesis of diabetes, dementia, and PD may occur. One is that there might be an underlying disorder of mitochondrial bioenergetics, manifest in pancreatic beta-cells and adipose tissue; this might be attributable to limited activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), PPAR coactivator-1 α (PGC1 α) and its link to AMP kinase in the SNpc and dopaminergic neurons [6]. Another overlapping cytotoxic disorder is that of abnormal protein folding [7, 8] which is associated with amylin-derivative effects on pancreatic beta-cells in diabetes, the neurodegenerative tauopathies (hyperphosphorylation of tau, low levels of soluble tau) [9], the formation of amyloid precursor protein (characteristic of Alzheimer's disease) and with synucleinopathies in neurodegenerative disorders characterized by neurofibrillary aggregates of α -synuclein protein in neurons and glial cells in PD [10].

Studies with animal models have reinforced this proposition indicating that dopaminergic drugs influence insulin production, insulin resistance, and glycaemic control. For instance, intracerebroventricular delivery of bromocriptine, a potent D2 receptor agonist, improved insulin sensitivity in hamsters [11]. These findings suggest that dopamine (DA) activity in the brain contributes to

^{*}Address correspondence to this author at the Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia, Av. Francisco H. dos Santos s/n, ZIP: 81.531 - 990, Caixa Postal: 19031, Curitiba, Paraná, Brasil; Tel: 0055-041-3361 1722; E-mails: mmslima@ufpr.br, mmeirasantoslina@yahoo.com.br

peripheral insulin-mediated glucose metabolism. Insulin and DA may exert reciprocal regulation; for example, intracerebroventricular delivery of insulin increased the amounts of DA transporter mRNA and activity in the SNpc and in D8 cells [12]. By contrast, hypoinsulinaemia induced by streptozotocin decreased the amounts of DA transporter and tyrosine hydroxylase (TH) transcripts in the SNpc [13]. Consistent with these findings, hypoinsulinaemia resulting from streptozotocin-induced diabetes has been shown to decrease basal DA concentrations and amphetamine-induced DA overflow in the mesolimbic pathway [14].

However, scarce well-controlled human studies have been done in recent years, which make the topic very elusive. Interestingly, some drugs used to treat PD, such as 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), induce hyperglycaemia and hyperinsulinaemia, whereas others, such as bromocriptine, may increase insulin sensitivity [15]. These effects may obfuscate the interpretation of studies in which insulin function is assessed in treated patients. Although, clinical data suggest impaired glucose tolerance and insulin dysregulation characterize many patients with PD, few recent studies have carefully described the specific pattern of dysregulation, nor has a solid case been made for the role of insulin dysregulation independent of hyperglycaemia [16]. Thus, is still intriguing the potential neuroprotective and/or neurorestorative mechanisms elicited by hypoglycemic agents. Therefore, the objective of the present review is to contextualize the mutual pathophysiological interactions between PD and type-2 diabetes mellitus, as well as the potential common treatments.

PATHOPHYSIOLOGY OF TYPE-2 DIABETES MELLITUS

Several events contribute to the maintenance of glucose homeostasis in the body and, thus, may be associated with type-2 diabetes mellitus. However, three pathophysiological events are classically identified as responsible for the development of disease: insulin resistance, β -cell secretory dysfunction and increased glucose production by the liver [17-19]. Following, there is a brief description of those events.

Insulin Resistance

Insulin resistance is the event which consists of a poor transport of glucose from the blood vessels to target tissues, causing an increase in the concentration of blood glucose [20]. This resistance to insulin is observed in adipocytes, in the liver (as will be described later in more detail), and especially in muscle [19, 21, 22]. Several factors have been suggested as responsible for increased insulin resistance by target tissues. It is known that adipocytes from individuals with diabetes or obesity are resistant to anti-lipolytic activity of insulin, which contributes to the increase of free fatty acids in plasma [23, 24]. Studies have shown that elevated concentrations of plasma free fatty acids increases the insulin resistance in muscle and liver and also decrease insulin secretion [24, 25]. Furthermore, the accumulation of triglycerides in liver and muscle appears to contribute to the insulin resistance [26]. This has recently been called

lipotoxicity [24]. The relationship between obesity and diabetes has been the subject of numerous studies and has been increasingly demonstrated the influence of obesity on type-2 diabetes mellitus [27, 28].

Other studies have shown that a decrease in the number of mitochondria in muscle or an impaired function of these may contribute to increased insulin resistance [29, 30]. At the cellular level, proteins that are part of the signaling cascade responsible for the influx of glucose in the target tissues are also indicated as having influence on the increase of insulin resistance [22]. The insulin receptor substrate plays an important role in the cascade of signaling events that occurs after insulin binding to receptor in muscle [31]. In individuals with diabetes, the phosphorylation of the insulin receptor substrate and its activity are decreased, which is highly related to a decrease in the activity of glycogen synthase and a decrease in glucose transport into the muscle [32, 33].

β -Cell Dysfunction

It is still unclear the mechanisms that underlie the decreased secretion by β cells. It is hypothesized that the occurrence of a decrease in the mass of these cells, observed even in subjects with normal glucose tolerance, may contribute to the reduced secretion. This decrease is caused by apoptosis due to the presence of high blood glucose (glutotoxicity) or a large amount of free fatty acids (lipotoxicity) [34, 35]. In addition, it is observed that amyloid plaques are present in the β cells of individuals with diabetes and these plaques are able to destroy cells and eliminate their secretory activity [36]. These plaques consist of sets of islet associated polypeptide, that emerge from a normal protein which is co-secreted by the β cells with insulin and is maintained in the granules of insulin [36, 37]. A complementary explanation for the β -cell apoptosis is due to toxic oxygen species (mainly produced in the mitochondria), which are excessively produced during the course of disease [38].

Increase in Glucose Production by the Liver

In normoglycemic individuals in a fasting situation, there are a production of glucose by the liver which accounts for approximately 85% of the glucose produced by the full body [22]. This glucose is used by the nervous system, internalized by the liver and gastrointestinal tract and also by muscle [22, 39]. When glucose ingestion occurs, insulin is secreted and inhibits hepatic glucose production [22, 40, 41]. During diabetes, insulin resistance occurs in the liver, and has not been observed a decrease in endogenous glucose production [42]. In a fasting situation, this can still be compensated by the high amount of insulin secreted in patients with mild diabetes (fasting hyperglycemia ≤ 140 mg/dl) [43]. In subjects with moderate diabetes (fasting hyperglycemia of 140-200mg/dl) there is an increase in endogenous glucose production, which further increases the glucose concentration in blood during fasting [22, 43].

The production of glucose by the liver is primarily by gluconeogenesis or glycogenolysis [41]. Some risk factors are contributors to an increase in gluconeogenesis as hyperglucagonemia, increased sensitivity to glucagon,

increased free fatty acids oxidation and decreased insulin sensitivity [22]. Some studies also showed increased activity of enzymes that regulate gluconeogenesis and glucose output from the liver [44, 45].

TYPE-2 DIABETES MELLITUS AND PARKINSON'S DISEASE - PATHOPHYSIOLOGICAL INTERCONNECTIONS

Several studies have shown the presence of insulin receptors in numerous brain regions such as the cerebral cortex, choroid plexus, hypothalamus, hippocampus, olfactory regions, amygdaloid complex, entorhinal cortex, cerebellum, SNpc, among other regions [46, 47]. Despite that prevalence of receptors, the role of insulin in the brain is far from being completely understood. It is reported that insulin acts in the brain by increasing the level of blood glucose, decreasing food intake and body weight [48, 49]. Other actions are also mentioned: neurotrophic role [50], increase of activity of choline acetyl transferase [51], influence on the development of cholinergic and dopaminergic neurons [52] and increase in neurotransmitters release [53]. Abbott and colleagues [54] demonstrated the presence of insulin receptor substrate, tyrosine kinase p53-p58, and insulin receptor in the synapses within the hippocampus and cerebellum, suggesting a signaling role for insulin.

Clinical Perspective

According to neuroimaging studies, there are three predominant structural alterations found in the brain's patients with diabetes: white matter lesions, lacunar infarcts and cortical atrophy [55, 56]. Functionally, it has been demonstrated a cognitive decline in diabetic patients [57, 58], which has enabled a frequent association between diabetes and Alzheimer's disease [59-61]. Furthermore, diabetes is also often associated with cerebrovascular diseases such as stroke [62-64].

Historically, the discussion about the interactions between PD and type-2 diabetes mellitus began in the 1960's and there is still controversy with conflicting results in the literature. El'ner and Kandel [65], in 1965, observed that parkinsonian patients had a deficiency in glucose metabolism. In 1971, Van Woert and Mueller [66] found that parkinsonian patients had a delay in the release of insulin, and Boyd [67] noted that the dopaminergic deficiency could cause inhibition of the acute response of insulin secretion after glucose exposure. In the 1970's, it was characterized the occurrence of a glucose intolerance through the analyses of 56 parkinsonian individuals who had not started treatment with (L-DOPA) [68]. Drug-induced parkinsonism (a largely known cause of PD) coexists with higher rates of diabetes incidence, compared to equivalent control subjects [69], suggesting that diabetes may be a risk factor for drug-induced parkinsonism. Besides, deep brain stimulation of the subthalamic nucleus was capable of increase the risk of developing diabetes [70]. Moreover, Takahashi *et al.* [71] and Moroo *et al.* [72] observed that patients with PD, which have a decrease in dopaminergic neurons in the SNpc, also exhibit a decrease in insulin receptor immunoreactivity in the same region.

However, data from two large cohorts of PD involving 530 cases of 171,879 people accompanied by approximately 23 years suggested that PD risk is not significantly related to the history of diabetes [73]. Moreover, a study conducted in Japan found that patients with diabetes had a lower incidence of PD compared with normoglycemic patients [74]. In addition, it was reported, by analysis of UK-based General Practice Research Database between 1994 and 2005, that the risk for developing diabetes is lower in PD patients that make use of L-DOPA [75]. Despite the discrepant results, it is noteworthy the existence of a common pathophysiological interconnection between these two diseases. Besides, it should bear in mind that considering an etiological perspective, PD and diabetes are both chronic diseases related to aging and some pathogenic processes may be common to both conditions due to this perspective.

Common Pathophysiological Mechanisms

Studies with animal models of diabetes indicated an increase in the transport of insulin to the brain [76], arguing the data that described an inhibitory effect of glucose on the transport of insulin to this tissue [77]. Interestingly, in hypoinsulinemic rats the levels of TH mRNA appears to be changed (increased in noradrenergic neurons and decreased in dopaminergic neurons) compared to controls [78]. Thus, hypoinsulinemia incremented the noradrenaline transporter mRNA, whereas the DA transporter did not differed from the control group [78]. Furthermore, the use of streptozotocin or alloxan generated an increment in the sensitivity of dopaminergic receptors, particularly D2, within the striatum, accessed by the increase in the [3H] spiperone binding [79]. Complementarily, the insulin treatment reversed the increased sensitivity initially obtained by the animal models. Together, this evidence suggests that insulin mediates a pronounced role in regulating the synthesis and uptake of these monoamines, especially in dopaminergic neurons of the nigrostriatal system.

Unilateral injections of 6-hydroxidopamine (6-OHDA) in the striatum produced increases in serum levels of insulin and also an increase in insulin resistance [80]. However, the authors found that this lesion was not able to cause insulin resistance in muscle nor did it affect glucose tolerance. The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), which mimics PD [81, 82], is capable of inhibiting complex I (NADH dehydrogenase CoQ) mitochondrial respiratory chain [83]. This inhibition decreases ATP production and increases the release of free radicals, leading to neuronal death observed in dopaminergic neurons in the SNpc of PD patients [84]. A variety of proteins that act in mitochondria have been studied and appear to be involved in the development of parkinsonism, such as Parkin, PTEN-induced putative kinase 1, DJ-1, α -synuclein (see [85]). Remarkably, several studies also attribute to an altered mitochondria function the development of diabetes [86-88]. Hence, dysfunctions in these enzyme complexes constitute an important interconnection between PD and diabetes.

Neuroinflammation process, another factor that contributes to PD, leads to a greater mitochondrial stress, with a release of reactive oxygen species, activation of microglia and release of pro-inflammatory cytokines such as nitric oxide and tumor necrosis factor- α [89]. Concerning

diabetes, studies have shown that acute and chronic inflammation causes insulin resistance. Pro-inflammatory cytokines including IL-6 and tumor necrosis factor- α , which are secreted from leukocytes during inflammation, appear to be involved in this situation [90].

The PGC1 α is an important regulator of enzymes involved in mitochondrial respiration. The reduction in the expression of the *PGC1 α* gene and mitochondrial respiratory nuclear factor-1 are molecular markers of insulin resistance [91]. Indeed, it was detected a cytosine hypermethylation of PPAR- γ and PGC1 α in diabetic subjects, (using whole genome promoter methylation analysis of skeletal muscle) [92]. Methylation levels were negatively correlated with PGC1 α mRNA. This methylation, which may be genetic or environmental-induced, was increased by the presence of tumor necrosis factor- α and by the presence of free fatty acids [92]. In the opposite, parkin interacting substrate is a repressor protein of PGC1 α expression and its regulation is increased in patients with PD. Thus, PGC1 α appears to be associated with greater protection against dopaminergic cell death induced by rotenone [93, 94].

Finally, some studies revealed that the blockade of angiotensin receptors could reduce the incidence of PD [95, 96]. The treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors showed that there is a protection against the loss of dopaminergic neurons in animal models of MPTP and 6-OHDA, due to a decreased binding between angiotensin-II and its receptor AT1 [97-99]. This binding activates the NADPH oxidase complex, which leads to an increase in reactive oxygen species (ROS) [97-99]. Concerning diabetes, studies indicated a relation between renin-angiotensin system and the disease, because local increases in the levels of angiotensin-II resulted in insulin resistance [100-102].

COMMON MOLECULAR THERAPEUTIC TARGETS - EVIDENCE FROM PHARMACOLOGICAL TREATMENTS

Over the past few decades a large core of data originating from clinical studies, autopsy materials, and *in vitro* and *in vivo* experimental models of PD has been accumulated, which led us to begin to have some level of understanding of the pathogenesis of sporadic PD [103]. Available data would argue that the mechanism of neuronal death in PD starts with an otherwise healthy dopaminergic neuron being hit by an etiological factor, such as mutant α -synuclein. Subsequent to this initial event, it is proposed that a cascade of deleterious factors is set in motion within that neuron made not of one, but rather of multiple factors such as free radicals, mitochondrial dysfunction, excitotoxicity, neuroinflammation, and apoptosis to cite only some of the most salient. Still based on this proposed scenario, all of these noxious factors will interact with each other to ultimately provoke the demise of the injured neuron [104]. In this sense, PPAR- γ seems to be a key player in mediating neuroprotective activity against oxidative stress in PD [105, 106]. However, other drugs that interact with different molecular substrates, initially related to type-2 diabetes mellitus are emerging as potential neuroprotective strategies for PD as well (Table 1).

PPAR- γ is a receptor expressed in cells of monocyte/macrophage lineage including brain resident

microglia, and also is highly expressed in various brain regions such as striatum, SNpc, cortex and hippocampus [107]. PPAR- γ agonists, such as rosiglitazone and pioglitazone (both members of thiazolidinediones class - widely used to treat type-2 diabetes mellitus) are related to increase the expression of nuclear encoded subunits responsible for the mitochondrial respiratory chain, reversing the mitochondrial damage in PD [108, 109].

In addition, pioglitazone treatment led to reduction of inducible nitric oxide (iNOS)-positive activated microglia in the SNpc [107]. Inhibition of iNOS expression may be responsible for the neuroprotective effect of the PPAR- γ ligand pioglitazone. This was confirmed by [110], that pioglitazone anti-inflammatory mechanism is by activating PPAR- γ , inactivation of microglia and also reduction expression of iNOS induction. Accordingly, PPAR- γ activation is also involved in the neuroprotection conferred by pioglitazone against MPTP-induced damage in mice and rats. Purportedly, this mechanism involves inhibition of the monoamine oxidase B [111]. Paradoxically, acute but not chronic treatment appeared to be more efficient to restore DA levels [112]. Possibly because pioglitazone has been shown to enhance basal glucose uptake by regulation of glucose transporters in the peripheral tissue [113, 114]. In contrast to the SNpc, striatal glucose uptake remains unchanged or is even reduced in MPTP-treated primates and rodents [115, 116], it is also conceivable that differences in glucose metabolism or the higher energy demand of the striatal nerve terminals compared with the SNpc cell bodies [117] could make the striatum more vulnerable to MPTP toxicity and mask the protective effect of pioglitazone [112, 118].

In the neuroinflammatory PD model induced by lipopolysaccharide [119, 120], it is observed that pioglitazone decreased inflammatory response by the reduction of microglial activation, as well as decrease of oxidative stress and enabling restoration of mitochondrial function. Furthermore, dopaminergic neuronal death in the midbrain was reduced after pioglitazone treatment [121, 122]. Complementarily, *in vitro* studies demonstrated that pioglitazone also reduced prostaglandin E2 synthesis by inhibiting cyclooxygenase-2 expression [123]. Likewise, rosiglitazone also possess neuroprotective properties against toxicity induced by MPTP [124]. In addition, *in vitro* data revealed that rosiglitazone generated a protective effect on 5H-SY5Y cells of human neuroblastoma against toxicity induced by acetaldehyde or 1-methyl-4-phenylpyridinium by attenuating ROS formation and inducing superoxide dismutase and catalase activity [125, 126]. Interestingly, the concomitant treatment with rosiglitazone and an selective antagonist of PPAR- γ (GW9662) did not inhibit the neuroprotective effects elicited by the PPAR- γ activation, suggesting that the anti-oxidant activity of glitazones does not necessarily requires PPAR- γ activation [127].

Another class of drugs widely used to treat type-2 diabetes mellitus is the sulfonylureas, such as glibenclamide, tolbutamide and glipizide. These medications lowers blood glucose levels by stimulating insulin secretion, through the binding with high affinity sulfonylurea receptor-1 and blocking ATP-sensitive K⁺ channels (KATP), from pancreatic beta cells. Inhibition of KATP results in

Table 1. Type-2 Diabetes Mellitus and Parkinson's Disease: Common Therapeutic Targets

Hypoglycaemic Agent	Animal Model	Species/Cell Type	Effects	References
Pioglitazone (20 mg/kg/day - oral)	MPTP (15 mg/kg - IP)	C57BL/6 mice	1. Pioglitazone attenuated MPTP-induced glial activation 2. Prevented the DA cell loss in the SNpc	Breidert, 2002 [103]
Pioglitazone (20 mg/kg/day)	MPTP (30 mg/kg - IP)	C57BL/6 mice	1. Inactivation of microglia and anti-inflammatory action 2. Expression reduced of iNOS	Dehmer, 2004 [106]
Pioglitazone (1 μ M and 10 μ M - cell culture)	LPS (5 ng/ml-40 μ g/mL for 72 h - cell culture)	Neuron-glia cultures from ventral mesencephalic tissues	1. Pioglitazone reduces microglial activation 2. Decrease of prostaglandin E2 synthesis by inhibiting COX2 expression	Xing, 2007 [119]
Pioglitazone (20 mg/kg - twice a day)	MPTP (30 mg/kg - SC)	Mouse	1. Inhibitory effect on MAO-B, blocking the conversion of MPTP to the toxic metabolite MPP ⁺ 2. Prevent TH-positive cells loss induced by LPS	Quinn, 2008 [107]
Rosiglitazone (10 μ M - in culture medium)	MPP ⁺ (10 μ M - in culture medium)	Human neuroblastoma SH-SY5Y cells	1. Showed anti-oxidative properties by reducing ROS formation and inducing SOD and catalase activity 2. Also had anti-apoptotic properties	Jung, 2007 [122]
Rosiglitazone (10 mg/kg - IP)	MPTP (25 mg/kg - IP)	Mouse	1. Reduced microglia over expression and nigrostriatal degeneration	Carta, 2011 [127]
Glibenclamide (10 μ M - in culture medium) Pinacidil (10 μ M - in culture medium)	Rotenone (20 μ M - in culture medium)	SH-SY5Y cell PC12 cell	Pinacidil in the presence of glibenclamide had the protective effect reduced and cell death increased	Tai, 2002 [129]
Glibenclamide (30 mg/kg/day - 2 weeks - IP)	MPTP (20 mg/kg - IP)	Mouse	1. Potentiated the reduction of DAT and TH expression induced by MPTP	Kou, 2006
Exedina-4 (0.1 and 0.5 μ g/kg - IP)	6-OHDA (8 μ g/4 μ l of saline - into the right medial forebrain bundle) LPS (2 μ g/2 μ l saline - into the substantia nigra pars compact)	Rat	1. Reversed the loss of extracellular DA and arrested the establish nigral lesions induced by 6-OHDA and LPS	Harkavyi, 2008 [137]
Vildagliptin (3 mg/kg/day - 12 weeks)	high-fat diet	Rats	1. Improvement of peripheral insulin sensitivity, increase GLP-1 levels in plasma and brain and decreased brain ROS production	Pipatpiboon, 2012 [139]
-----	MPTP (20 mg/kg at 2h intervals, total dosage 80 mg/kg - IP)	Mouse	1. Activation of AMPK exerts a protective effect against the neurotoxic effects of MPP ⁺ .	Choi, 2010 [132]

membrane depolarization, opening of voltage-sensitive calcium channels and increase intracellular calcium influx, which by exocytosis releases insulin [128]. Even though KATP are widely existent in pancreatic cells, they are also present in cardiac and skeletal muscle cells, and neurons of the central nervous system [129]. Indeed, in the brain these channels are expressed in the cortex, basal ganglia, hippocampus, hypothalamus [130], and especially the striatum which contains a significant density of KATP [131].

The employment of glibenclamide in the MPTP model of PD showed a synergic reduction of striatal TH and DA transporter expressions raising the hypothesis that genetic abnormalities in the KATP expression in the basal ganglia could result in a predisposition factor for the development of PD, especially after a chronic treatment with sulfonylureas

[132]. By contrast, the activation of KATP by the agonist pinacidil demonstrated protective effects against the rotenone and MPTP-induced toxicity [133]. However, pinacidil in the presence of glibenclamide had that protective effect weakened, suggesting that activation of KATP is a potential target for neuroprotective strategies in PD [133].

In addition, another therapeutic strategy that is emerging from this approach relies on the activation of AMP-activated protein kinase, which is responsible in controlling cellular energy homeostasis, as well as glucose uptake in muscle, inhibition of hepatic glucose production, and also hepatic and muscle lipids metabolism [134, 135]. Metformin is the prototypical drug that acts according to this mechanism hence, counteracting the 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity [136]. Perhaps, the combination of metformin

and sulphonylureas may be useful for both type-2 diabetes mellitus and PD due to their potential synergistic neuroprotective effects.

The control of glucose homeostasis is made from several hormones including insulin, glucagon, amylin, and incretins. The incretin dysfunction, along with a number of other complications has been reported as a contributor factor to the pathogenesis of diabetes mellitus [137]. The incretin effect was shown to be primarily due to the secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide. The GLP-1 agonists produce similar effects to endogenous GLP-1, and are resistant to degradation by dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). Inhibitors of this enzyme increase the endogenous GLP-1 by preventing its degradation [138]. Thus, there are two incretin based therapies that are used for the treatment of diabetes mellitus: GLP-1 agonists and antagonists of DPP-4 [139]. Activation of GLP-1 by an agonist, such as exendin-4, is reported to prevent the death of dopaminergic neurons in the 6-OHDA and lipopolysaccharide models of PD [140, 141]. In another study with exendin-4, it was found that this agonist was able to induce a recovery of locomotor function in the 6-OHDA PD model by an increased number of TH and vesicular monoamine transporter-2 in neurons within the nigrostriatal system [142]. Complementarily, vildagliptin (a DPP-4 inhibitor) was shown to improve neuronal peripheral resistance to insulin, learning, memory and improving on cerebral mitochondrial function [143].

NUTRITIONAL PROTECTIVE STRATEGY

Numerous food groups and specific nutrients have been investigated as factors related to a high or low risk of PD. According to a population-based study, the prevalence of PD is generally lower in East Asian regions (e.g. China, Taiwan and Japan) than in Western regions (e.g. Europe and the United States) [144]. Similarly, diabetes mellitus is one of the most rapidly growing disease worldwide, and is a prime cause of morbidity and mortality in Western populations [145]. Based on this scenario, more attention has recently been given to dietary habits considering that as a neuroprotective strategy. A prospective study based on food questionnaires answered by 131,368 participants revealed that intake of Mediterranean diet (traditionally composed of vegetable, fruit and fish) was inversely associated with incidence of PD cases after 16 years of follow-up [146]. The neuroprotection effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid has been discussed extensively in animal models, and its brain content directly affects numerous key elements of the dopaminergic systems such as D2 receptor, vesicular monoamine transporter-2, nuclear receptor related-1 protein, DA and TH immunoreactive neurons [147-151].

Considering that patients with type-2 diabetes mellitus may present an inherited defect in mitochondrial oxidative phosphorylation and reduced ATP production by 30% [152] it has been proposed that prolonged dietary restriction (DR) may represent a protective strategy both to neurodegenerative diseases, including PD [153] as well as diabetes [154]. In this sense, damage to dopaminergic neurons and associated motor dysfunction are markedly reduced in the MPTP mouse model of PD that were maintained on alternate-day DR (~30% less food) [155].

Therefore, some alternatives have been proposed to explain these beneficial effects of DR. One possible mechanism is based on the fact that most oxyradicals in cells are produced in mitochondria during the process of oxidative phosphorylation. Since less glucose would be available to mitochondria in cells of DR animals, fewer oxyradicals would be produced [156].

In order to investigate the effects of dietary and exercise intervention, a study involving 577 glucose tolerance subjects introduced to their participants a diet containing 25-30 kcal/kg body weight, 55-65% carbohydrate, 10-15% protein, and 25-30% fat, and were encouraged to consume more vegetables, control their intake of alcohol, and reduce their intake of simple sugars. The follow-up period of 6 years revealed that the diet, exercise, and diet plus exercise interventions were respectively associated with 44%, 41%, and 46% reductions in risk of developing type-2 diabetes mellitus compared to control group (67%) [157]. In addition, in a recent study adult C57BL/6 mice were fed a high-fat diet (60% kcal) for 8 weeks prior to MPTP exposure. This fed caused significant gained weight (+41%), developed insulin resistance and a systemic immune response characterized by an increase in circulating leukocytes and plasmatic cytokines that are responsible to exacerbated effects of MPTP on striatal TH (23%) and dopamine levels (32%), indicating that diet-induced obesity is associated with a reduced capacity of nigral dopaminergic terminals to handle with MPTP-induced neurotoxicity [158].

Furthermore, compelling evidence suggests that dietary components may modulate inflammatory and oxidative processes. Arginine, omega-3 polyunsaturated fatty acid, fibers, magnesium, and other phytochemicals are associated with decreased inflammation [159]. Regarding the polyphenols, including flavonoids, phenolic acids, and resveratrol (presents in food such as tea, coffee, wine, cocoa, cereal grains, soy and fruits), recent studies showed that their intake were able to normalize hyperglycemia, ameliorate insulin resistance and decrease the risk of type-2 diabetes mellitus [160-163]. In the recent years this line of research also contemplated PD, since it was revealed that dietary oxyresveratrol elicited potent neuroprotective effects on 6-OHDA neurotoxicity by attenuating the caspase-3-like activity and suppressing the generation of intracellular ROS [164]. Evidence also suggests that flavonoids may express neuroprotection because its ability to inhibit the inflammation through an attenuation of microglial activation and associated cytokine release, iNOS expression, nitric oxide production and NADPH oxidase activity (see [165]).

EXERCISE AS A PROTECTIVE STRATEGY

The increasing number of studies on physical exercise shows the beneficial effects promoted by these activities in PD and type-2 diabetes mellitus. Chronic physical exercise stimulates the development of new born neurons, perhaps preventing or delaying the onset of cognitive decline observed during the aging [166, 167]. The mechanisms engaged by the exercise are reported as increased neurogenesis and angiogenesis, increased blood flow in cortical and subcortical regions, increased expression of brain-derived neurotrophic factor, increased glucose utilization, increased resistance to the production of ROS,

decreased oxidative damage to proteins and to DNA and maintenance of mitochondrial activities [168, 169].

It has been shown that exercise could promote a neuroprotection against the dopaminergic lesions, through increases in DA levels and neurotrophic factors (such as glial derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor) in models of PD in mice [170]. Besides, exercise is able to modulate the brain redox balance and preserve the content of essential striatal proteins, such as the sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase, according to results obtained from the 6-OHDA PD model [170]. In addition, exercise increases the PGC1 α expression causing a potent suppression of ROS production [171]. Longer periods of exercise (8 weeks of endurance training) caused up-regulation of PGC1 α , sirtuin and increased the mitochondrial DNA content in several brain regions, suggesting the occurrence of anti-oxidative mechanisms and mitochondrial biogenesis [171].

CONCLUSION

Despite the fact that some studies have failed to find associations between PD and type-2 diabetes mellitus, numerous evidence strongly support the existence of common pathophysiological mechanisms between these diseases. Accordingly, it is debated that DA depletion within the striatum is able to decrease insulin signaling in basal ganglia, indicating that perhaps PD may be considered as a risk factor for the development of diabetes. In this sense, it is suggested that PPAR- γ , KATP, AMP-activated protein kinase, GLP-1 and DPP-4 as a result of their described connections in PD and diabetes are important targets for neuroprotective and perhaps neurorestorative therapeutics. Also is noteworthy to mention the nutritional and exercise strategies as valuable tools for the maintenance and prevention of the life quality of PD and type-2 diabetes mellitus patients.

ABBREVIATIONS

KATP	=	ATP-sensitive K ⁺ channels
L-DOPA	=	3,4-dihydroxyphenylalanine
DPP-4	=	Dipeptidyl peptidase-4
DA	=	Dopamine
6-OHDA	=	6-hydroxydopamine
GLP-1	=	Glucagon-like peptide-1
iNOS	=	Inducible nitric oxide
MPTP	=	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
PD	=	Parkinson's disease
PPAR- γ	=	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ
PGC1 α	=	PPAR coactivator-1 α
ROS	=	Reactive oxygen species
SNpc	=	Substantia nigra pars compacta
TH)	=	Tyrosine hydroxylase

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This paper was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - Brasil Grants Casadinho/Procad # 552226/2011-4 and Universal # 473861/2012-7 to MMSL. MMSL and ACF are recipients of Fundação Araucária - Governo do Estado do Paraná fellowship. I would like to acknowledge the contributions from all of my students and co-workers who worked with me at Federal University of Paraná. We declared that no conflict of interests exists.

REFERENCES

- [1] Lima MM. Sleep disturbances in Parkinson's disease: The contribution of dopamine in REM sleep regulation. *Sleep Med Rev* 2013; 17: 367-75.
- [2] Chabolla DR, Maraganore DM, Ahlskog JE, O'Brien PC, Rocca WA. Drug-induced parkinsonism as a risk factor for Parkinson's disease: a historical cohort study in Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 1998; 73: 724-7.
- [3] Ma HI, Kim JH, Chu MK, et al. Diabetes mellitus and drug-induced Parkinsonism: a case-control study. *J Neurol Sci* 2009; 284: 140-3.
- [4] Unger JW, Livingston JN, Moss AM. Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog Neurobiol* 1991; 36: 343-62.
- [5] Unger JW, Moss AM, Livingston JN. Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat. *Neuroscience* 1991; 42: 853-61.
- [6] Zheng B, Liao Z, Locascio JJ, et al. PGC-1 α , a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 2010; 2: 52ra73.
- [7] de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol* 2008; 2: 1101-13.
- [8] Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 2007; 100: 328-41.
- [9] Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, et al. Tau protein: relevance to Parkinson's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1775-8.
- [10] Gallego M, Setien R, Izquierdo MJ, Casis O, Casis E. Diabetes-induced biochemical changes in central and peripheral catecholaminergic systems. *Physiol Res* 2003; 52: 735-41.
- [11] Luo S, Liang Y, Cincotta AH. Intracerebroventricular administration of bromocriptine ameliorates the insulin-resistant/glucose-intolerant state in hamsters. *Neuroendocrinology* 1999; 69: 160-6.
- [12] Figlewicz DP, Szot P, Chavez M, Woods SC, Veith RC. Intraventricular insulin increases dopamine transporter mRNA in rat VTA/substantia nigra. *Brain Res* 1994; 644: 331-4.
- [13] Figlewicz DP, Brot MD, McCall AL, Szot P. Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res* 1996; 736: 54-60.
- [14] Murzi E, Contreras Q, Teneud L, et al. Diabetes decreases limbic extracellular dopamine in rats. *Neurosci Lett* 1996; 202: 141-4.
- [15] Sirtori CR, Bolme P, Azamoff DL. Metabolic responses to acute and chronic L-dopa administration in patients with parkinsonism. *N Engl J Med* 1972; 287: 729-33.
- [16] Craft S, Watson GS. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol* 2004; 3: 169-78.
- [17] Gerich J. Matching Treatment to Pathophysiology in type 2 Diabetes. *Clin Therap* 2001; 23: 14.
- [18] Vivally M, Blicklé JF, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau PJ. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diab Metab* 2007; 33: 231-44.
- [19] DeFronzo RA. Lecture Lilly. The triumvirate: beta cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37: 667-87.

- [20] Leahy JL. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Med Res* 2005; 36: 197-209.
- [21] DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes* 1997; 5: 177-269.
- [22] DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 2004; 88: 787-835.
- [23] Groop LB, Del Prato RC, Ratheiser S, *et al.* Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest* 1989; 84: 205-15.
- [24] Bays H. Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 463-78.
- [25] Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 46: 3-10.
- [26] Bajaj M. Decreased Plasma Adiponectin Concentrations Are Closely Related to Hepatic Fat Content and Hepatic Insulin Resistance in Pioglitazone-Treated Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 200-6.
- [27] Haslam D. Obesity and diabetes: the links and common approaches. *Prim Care Diab* 2010; 4: 105-12.
- [28] Sharma AM, Padwal R, Karmali S, Birch WD. Is it Time to Seriously Target Obesity to Prevent and Control Diabetes? *Can J Diab* 2011; 35: 129-35.
- [29] Yorek WISaMA. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12: 537-77.
- [30] Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 2944-50.
- [31] Tanti JF, Gual P, Grémeaux T, *et al.* Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann Endocrinol* 2004; 65: 43-8.
- [32] Pratipanawatr W, Pratipanawatr T, Cusi K, *et al.* Skeletal Muscle Insulin Resistance in Normoglycemic Subjects With a Strong Family History of Type 2 Diabetes Is Associated With Decreased Insulin-Stimulated Insulin Receptor Substrate-1 Tyrosine Phosphorylation. *Diabetes* 2001; 50: 2572-8.
- [33] Cusi K, Maezono K, Osman A, *et al.* Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000; 105: 311-20.
- [34] Jonas JCS, A.; Hasenkamp, W.; Ilkova, H.; Patane, G.; Laybutt, R.; Bonner-Weir, S.; Weir, G.C. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 1999; 274: 14112-21.
- [35] McGarry JD, Dobbins RL. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 1999; 42: 128-38.
- [36] Höppener JWM, Lips CJM. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. *Intl J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 726-36.
- [37] DeFronzo RA. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes* 2009; 58: 773-95.
- [38] Guillausseau PJ, Meas T, Virally M, *et al.* Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diab Metab* 2008; 34: S43-8.
- [39] Grill V. A comparison of brain glucose metabolism in diabetes as measured by positron emission tomography or by arteriovenous techniques. *Ann Med* 1990; 22: 171-5.
- [40] DeFronzo RAF, E. Regulation of hepatic glucose metabolism in humans. *Diab Metab Rev* 1987; 3: 415-59.
- [41] Cherrington AD. Control of Glucose Uptake and Release by the Liver *In Vivo*. *Diabetes* 1999; 48: 1198-214.
- [42] Mitrakou AK, Veneman D, Jensen T, *et al.* Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes* 1990; 39: 1381-90.
- [43] DeFronzo RA, Ferrannini E, Simonson DC. Fasting hyperglycemia in non-insulindependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism* 1989; 38: 387-95.
- [44] Gastaldelli A, Baldi S, Pettiti M, *et al.* Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes* 2000; 49: 1367-73.
- [45] Clore JN, Stillman J, Sugarman H. Glucose-6-phosphatase flux *in vitro* is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000; 49: 969-74.
- [46] Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, *et al.* Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using *in vitro* autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 1987; 121: 1562-70.
- [47] Hill JM Lesniak MA, Pert CB, Roth J. Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience* 1986; 17: 1127-38.
- [48] Foster LA, Ames NK, Emery RS. Food Intake and Serum Insulin Responses to Intraventricular Infusions of Insulin and IGF-I. *Physiol Behav* 1990; 50: 745-9.
- [49] Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, *et al.* Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction. *Science* 2000; 289: 2122-5.
- [50] Desai M, Li T, Ross MG. Hypothalamic neurosphere progenitor cells in low birth-weight rat newborns: Neurotrophic effects of leptin and insulin. *Brain Res* 2011; 1378: 29-42.
- [51] Kyriakis JM, Hausman RE, Peterson SW. Insulin stimulates choline acetyltransferase activity in cultured embryonic chickens retina neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7463-7.
- [52] Knusel B, Michel PP, Schwaber JS, Hefti F. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development *in vitro* by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and the insulin-like growth factors I and II. *J Neurosci* 1990; 10: 558-70.
- [53] Sauter A, Goldstein M, Engel J, Ueta K. Effect of insulin on central catecholamines. *Brain Res* 1983; 260: 330-3.
- [54] Abbott MA, Wells DG, Fallon JR. The Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate p58/53 and the Insulin Receptor Are Components of CNS Synapses. *J Neurosci* 1999; 19: 7300-8.
- [55] van Harten B, de Leeuw FE, Weinstein HC, Scheltens P, Biessels GJ. Brain Imaging in Patients With Diabetes. *Diab Care* 2006; 29(11): 2539-48.
- [56] Nelson PT, Smith CD, Abner EA, *et al.* Human cerebral neuropathology of Type 2 diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 454-69.
- [57] Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 2000; 23: 542-9.
- [58] Richardson JT. Cognitive function in diabetes mellitus. *Neurosci Biobehav Rev* 1990; 14: 385-8.
- [59] Correia SC, Santos RX, Carvalho C, *et al.* Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: Major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain Res* 2012; 1441: 64-78.
- [60] Zhao WQ, Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 482-96.
- [61] Li L, Hölscher C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: A review. *Brain Res Rev* 2007; 56: 384-402.
- [62] Hatzitolios AI, Didangelos TP, Zantidis AT, *et al.* Diabetes mellitus and cerebrovascular disease: which are the actual data? *J Diab Complic* 2009; 23: 283-96.
- [63] Kameyama M, Fushimi H, Udaka F. Diabetes mellitus and cerebral vascular disease. *Diab Res Clin Prac* 1994; 24: 205-8.
- [64] He C, Yang ZG, Chu ZG, *et al.* Comparison of carotid and cerebrovascular disease between diabetic and non-diabetic patients using dual-source CT. *Eur J Radiol* 2011; 80: e361-5.
- [65] El'ner AM, Kandel EI. Study of the carbohydrate metabolism in Parkinsonism. *ZH Nevropatol Psikhiat IM SS Korsakova* 1965; 65: 46-50.
- [66] Van Woert MH, Mueller PS. Glucose, insulin and free fatty acid metabolism in Parkinson's Disease treated with L-dopa. *Clin Pharm Therap* 1971; 12: 360-7.
- [67] Boyd AE 3rd, Lebovitz HE, Feldman JM. Endocrine function and glucose metabolism in patients with Parkinson's Disease and their alteration by L-dopa. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33: 829-37.
- [68] Lipman IJ, Boykin ME, Flora RE. Glucose intolerance in parkinson's disease. *J Chron Dis* 1974; 27: 573-9.
- [69] Ma HI, Kim JH, Chu MK, *et al.* Diabetes mellitus and drug-induced parkinsonism: A case-control study. *J Neurol Sci* 2009; 284: 140-3.
- [70] Rieu I, Pereira B, Derost P, *et al.* Does deep brain stimulation of the subthalamic nucleus induce metabolic syndrome in Parkinson's disease? e-SPEN *Eur J Clin Nutr Metab* 2011; 6: e126-30.

- [71] Takahashi M, Yamada T, Tooyama I. Insulin receptor mRNA in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1996; 204: 201-4.
- [72] Moroo I, Yamada T, Makino H, et al. Loss of insulin receptor immunoreactivity from the substantia nigra pars compacta neurons in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 1994; 87: 343-8.
- [73] Simon KC, Chen H, Schwarzschild M, Ascherio A. Hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, and risk of Parkinson disease. *Neurology* 2007; 69: 1688-95.
- [74] Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, et al. Case-control study of risk of Parkinson's disease in relation to hypertension, hypercholesterolemia, and diabetes in Japan. *J Neurol Sci* 2010; 293: 82-6.
- [75] Becker C, Brobert GP, Johansson S, Jick SS, Meier CR. Diabetes in Patients With Idiopathic Parkinson's Disease. *Diab Care* 2008; 31: 1808-12.
- [76] Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ. Effect of Diabetes Mellitus on the Permeability of the Blood-Brain Barrier to Insulin. *Peptides* 1997; 18: 1577-84.
- [77] Baura GD, Foster DM, Porte D Jr, et al. Saturable Transport of Insulin from Plasma into the Central Nervous System of Dogs *In Vivo*. *J Clin Invest* 1993; 92: 1824-30.
- [78] Figlewicz DP, Brot MD, McCall AL, Szot P. Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res* 1996; 736: 54-60.
- [79] Lozovsky D, Saller CF, Kopin IJ. Dopamine receptor binding is increased in diabetic rats. *Science* 1981; 214: 1031-3.
- [80] Morris JK, Seim NB, Bomhoff GL, Geiger PC, Stanford JA. Effects of unilateral nigrostriatal dopamine depletion on peripheral glucose tolerance and insulin signaling in middle aged rats. *Neurosci Lett* 2011; 504: 219-22.
- [81] Ballard PA, Tetud JW, Langston JW. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1:2:3:6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology* 1985; 35: 949-56.
- [82] Langston JW, Ballard P, Tetud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-80.
- [83] Gerlach M, Riederer P, Przuntek H, Youdim MB. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* 1991; 208: 273-86.
- [84] Penier C. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 19126-31.
- [85] Aviles-Olmos I, Limousin P, Lees A, Foltynie T. Parkinson's disease, insulin resistance and novel agents of neuroprotection. *Brain* 2013; 136(Pt 2): 374-84.
- [86] Chan SL, Wei Z, Chigurupati S, Tu W. Compromised respiratory adaptation and thermoregulation in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2010; 9: 20-40.
- [87] Schapira AHV. Mitochondrial diseases. *Lancet* 2012; 379: 1825-34.
- [88] Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 8(2): 92-103.
- [89] Tansey MG, Frank-Cannon TC, McCoy MK, et al. Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? *Front Biosci* 2008; 13: 709-17.
- [90] White MF. Insulin Signaling in Health and Disease. *Science* 2003; 302: 1710-1.
- [91] Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8466-71.
- [92] Barrès R, Osler ME, Yan J, et al. Non-CpG Methylation of the PGC-1 α Promoter through DNMT3B Controls Mitochondrial Density. *Cell Metab* 2009; 10: 189-98.
- [93] Shin JH, Ko Han S, Kang H, et al. PARIS (ZNF746) Repression of PGC-1 α Contributes to Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Cell* 2011; 144: 689-702.
- [94] Mounier C, Posner BI. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84: 713-24.
- [95] Lin JJ, Yueh KC, Chang DC, Lin SZ. Association between genetic polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2002; 199: 25-9.
- [96] Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin—A new look at an old system. *Prog Neurobiol* 2011; 95: 49-67.
- [97] Joglar B, Rodriguez-Pallares J, Rodriguez-Perez AI, et al. The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *J Neurochem* 2009; 109: 656-69.
- [98] Lopez-Real A, Rey P, Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Labandeira-Garcia JL. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinsonism. *J Neurosci Res* 2005; 81: 865-73.
- [99] Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, et al. Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. *Neuropharmacology* 2006; 51: 112-20.
- [100] Chen P, Guo AM, Edwards PA, Trick G, Scicli AG. Role of NADPH oxidase and ANG II in diabetes-induced retinal leukostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: 1619-29.
- [101] Yamagishi S, Amano S, Inagaki Y, et al. Angiotensin II-type 1 receptor interaction upregulates vascular endothelial growth factor messenger RNA levels in retinal pericytes through intracellular reactive oxygen species generation. *Drugs Exp Clin Res* 2003; 29: 75-80.
- [102] Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5: 338-49.
- [103] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 2003; 39: 889-909.
- [104] Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2005; 11 Suppl 1: S3-7.
- [105] Chaturvedi RK, Beal MF. PPAR: a therapeutic target in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2008; 106: 506-18.
- [106] Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Therap* 2006; 110: 371-85.
- [107] Breidert T, Callebert J, Heneka MT, et al. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002; 82: 615-24.
- [108] Rodnitsky RL. Upcoming treatments in Parkinson's disease, including gene therapy. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18: S37-40.
- [109] Zheng B, Liao Z, Locascio JJ, et al. PGC-1 α , A Potential Therapeutic Target for Early Intervention in Parkinson's Disease. *Sci Transl Med* 2010; 2: 52ra73.
- [110] Dehmer T, Heneka MT, Sastre M, Dichgans J, Schulz JB. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I κ B α induction and block of NF κ B and iNOS activation. *J Neurochem* 2003; 88: 494-501.
- [111] Quinn LP, Crook B, Hows ME, et al. The PPAR γ agonist pioglitazone is effective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 226-33.
- [112] Barbiero JK, Santiago RM, Lima MM, et al. Acute but not chronic administration of pioglitazone promoted behavioral and neurochemical protective effects in the MPTP model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2010; 216: 186-92.
- [113] el-Kebbi IM, Roser S, Pollet RJ. Regulation of glucose transport by pioglitazone in cultured muscle cells. *Metabolism* 1994; 43: 953-8.
- [114] Smith U. Pioglitazone: mechanism of action. *Int J Clin Pract Suppl* 2001; 121: 13-8.
- [115] Palacios JM, Wiederhold KH. Acute administration of 1-N-methyl-4-phenyl-1:2:3:6-tetrahydropyridine (MPTP), a compound producing parkinsonism in humans, stimulates [2-14C]deoxy-glucose uptake in the regions of the catecholaminergic cell bodies in the rat and guinea pig brains. *Brain Res* 1984; 301: 187-91.
- [116] Palombo E, Porrino LJ, Bankiewicz KS, Crane AM, Kopin IJ, Sokoloff L. Administration of MPTP acutely increases glucose utilization in the substantia nigra of primates. *Brain Res* 1988; 453: 227-34.
- [117] Sokoloff L. Sites and mechanisms of function-related changes in energy metabolism in the nervous system. *Dev Neurosci* 1993; 15: 194-206.
- [118] Breidert T, Callebert J, Heneka MT, et al. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist

- pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002; 82: 615-24.
- [119] Ariza D, Lima MM, Moreira CG, *et al.* Intranigral LPS administration produces dopamine, glutathione but not behavioral impairment in comparison to MPTP and 6-OHDA neurotoxin models of Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2010; 35: 1620-7.
- [120] Lima MMS, Braga Reksidler A, Marques Zanata S, *et al.* Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res* 2006; 1101: 117-25.
- [121] Hunter RL, Choi DY, Ross SA, Bing G. Protective properties afforded by pioglitazone against intrastriatal LPS in Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett* 2008; 432: 198-201.
- [122] Hunter RL, Dragicevic N, Seifert K, *et al.* Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem* 2007; 100: 1375-86.
- [123] Xing B, Liu M, Bing G. Neuroprotection with pioglitazone against LPS insult on dopaminergic neurons may be associated with its inhibition of NF- κ B and JNK activation and suppression of COX-2 activity. *J Neuroimmunol* 2007; 192: 89-98.
- [124] Wang L, Yu CJ, Liu W, Cheng LY, Zhang YN. Rosiglitazone protects neuroblastoma cells against advanced glycation end products-induced injury. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32: 991-8.
- [125] Jung TW, Lee JY, Shim WS, *et al.* Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against acetaldehyde-induced cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 221-7.
- [126] Jung TW, Lee JY, Shim WS, *et al.* Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP+ induced cytotoxicity via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production. *J Neurol Sci* 2007; 253: 53-60.
- [127] Aoun P, Watson DG, Simpkins JW. Neuroprotective effects of PPAR γ agonists against oxidative insults in HT-22 cells. *Eur J Pharmacol* 2003; 472: 65-71.
- [128] Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea Stimulation of Insulin Secretion. *Diabetes* 2002; 51: S368-76.
- [129] Gehlert DR, Robertson DW. ATP sensitive potassium channels: potential drug targets in neuropsychopharmacology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1994; 18(7): 1093-102.
- [130] Wang S, Hu LF, Yang Y, Ding JH, Hu G. Studies of ATP-sensitive potassium channels on 6-hydroxydopamine and haloperidol rat models of Parkinson's disease: Implications for treating Parkinson's disease? *Neuropharmacology* 2005; 48: 984-92.
- [131] Carta AR, Pisani A, Carboni E. Do PPAR-Gamma Agonists Have a Future in Parkinson's Disease Therapy? *Parkinsons Dis* 2011; 2011: 1-14.
- [132] Kou J, Klorig DC, Bloomquist JR. Potentiating effect of the ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide on complex I inhibitor neurotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Neurotoxicology* 2006; 27: 826-34.
- [133] Tai KK, Truong DD. Activation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels confers protection against rotenone-induced cell death: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2002; 69: 559-66.
- [134] Santomauro Junior AC, Ugolini MR, Santomauro AT, Souto RP. Metformin and AMPK: an old drug and a new enzyme in the context of metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52(1): 120-5.
- [135] Musi N, Hirshman MF, Nygren J, *et al.* Metformin Increases AMP-Activated Protein Kinase Activity in Skeletal Muscle of Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 2074-81.
- [136] Choi JS, Park C, Jeong JW. AMP-activated protein kinase is activated in Parkinson's disease models mediated by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 147-51.
- [137] Campbell RK. Clarifying the role of incretin-based therapies in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Therap* 2011; 33: 511-27.
- [138] Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 2006; 368(9548): 1696-705.
- [139] Dalle S, Burcelin R, Gourdy P. Specific actions of GLP-1 receptor agonists and DPP4 inhibitors for the treatment of pancreatic β -cell impairments in type 2 diabetes. *Cell Signal* 2013; 25: 570-9.
- [140] Li Y, Perry T, Kindy MS, *et al.* GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 1285-90.
- [141] Harkavyi A, Abuirmeleh A, Lever R, *et al.* Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 19.
- [142] Bertilsson G, Patrone C, Zachrisson O, *et al.* Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2008; 86: 326-38.
- [143] Pipatpiboon N, Pintana H, Pratchayasakul W, Chattipakom N, Chattipakom SC. DPP4-inhibitor improves neuronal insulin receptor function, brain mitochondrial function and cognitive function in rats with insulin resistance induced by high-fat diet consumption. *Eur J Neurosci* 2013; 37(5): 839-49.
- [144] de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5: 525-35.
- [145] Reimann M, Bonifacio E, Solimena M, *et al.* An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. *Pharmacol Ther* 2009; 121: 317-31.
- [146] Gao X, Chen H, Fung TT, *et al.* Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 1486-94.
- [147] Delattre AM, Kiss A, Szawka RE, *et al.* Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 2010; 66: 256-64.
- [148] Bousquet M, Saint-Pierre M, Julien C, *et al.* Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* 2008; 22: 1213-25.
- [149] Ji A, Diao H, Wang X, *et al.* N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats. *Neurotoxicology* 2012; 33: 780-8.
- [150] Zimmer L, Delion-Vancassel S, Durand G, *et al.* Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 2000; 41: 32-40.
- [151] Ahmad SO, Park JH, Radel JD, Levant B. Reduced numbers of dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area of rats fed an n-3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet: a stereological study. *Neurosci Lett* 2008; 438: 303-7.
- [152] Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004; 350: 664-71.
- [153] Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 237-60.
- [154] Jernendy G. Can type 2 diabetes mellitus be considered preventable? *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 68 Suppl 1: S73-81.
- [155] Guo Z, Ersoz A, Butterfield DA, Mattson MP. Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals: preservation of glucose and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to amyloid beta-peptide, iron, and 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* 2000; 75: 314-20.
- [156] Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
- [157] Pan XR, Li GW, Hu YH, *et al.* Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diab Care* 1997; 20: 537-44.
- [158] Bousquet M, St-Amour I, Vandal M, *et al.* High-fat diet exacerbates MPTP-induced dopaminergic degeneration in mice. *Neurobiol Dis* 2012; 45: 529-38.
- [159] Basu A, Devaraj S, Jialal I. Dietary factors that promote or retard inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 995-1001.
- [160] Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 598-605.
- [161] Zhang Y, Lee ET, Cowan LD, Fabsitz RR, Howard BV. Coffee consumption and the incidence of type 2 diabetes in men and women with normal glucose tolerance: the Strong Heart Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21: 418-23.
- [162] Eshak ES, Iso H, Mizoue T, *et al.* Soft drink, 100% fruit juice, and vegetable juice intakes and risk of diabetes mellitus. *Clin Nutr* 2012; 32(2): 300-8.
- [163] Yan J, Zhao Y, Suo S, Liu Y, Zhao B. Green tea catechins ameliorate adipose insulin resistance by improving oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 1648-57.

- [164] Chao J, Yu MS, Ho YS, Wang M, Chang RC. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1019-26.
- [165] Spencer JP, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med* 2012; 33: 83-97.
- [166] Marques-Aleixo I, Oliveira PJ, Moreira PI, Magalhaes J, Ascensao A. Physical exercise as a possible strategy for brain protection: evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. *Prog Neurobiol* 2012; 99: 149-62.
- [167] Trudeau F, Shephard RJ. Physical education, school physical activity, school sports and academic performance. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2008; 5: 10.
- [168] Aguiar AS Jr, Speck AE, Prediger RD, Kapczinski F, Pinho RA. Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. *J Neural Transm* 2008; 115: 1251-5.
- [169] Zigmund MJ, Cameron JL, Hoffer BJ, Smeyne RJ. Neurorestoration by physical exercise: moving forward. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18 Suppl 1: S147-50.
- [170] Tuon T, Valvassori SS, Lopes-Borges J, *et al.* Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2012; 227: 305-12.
- [171] Steiner JL, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Davis JM. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *J Appl Physiol* 2011; 111: 1066-71.

Received: February 1, 2013

Revised: April 5, 2013

Accepted: April 5, 2013