

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA CAROLINE KMITA

EFEITO NEUROPROTETOR DA ADMINISTRAÇÃO INTRANIGRAL DE RILUZOL
EM MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENONA APÓS
PRIVAÇÃO DE SONO REM

CURITIBA

2017

LUANA CAROLINE KMITA

EFEITO NEUROPROTETOR DA ADMINISTRAÇÃO INTRANIGRAL DE RILUZOL
EM MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENONA APÓS
PRIVAÇÃO DE SONO REM

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia, no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos Lima

CURITIBA

2017



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



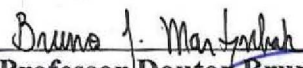
Ata da defesa de dissertação de mestrado de LUANA CAROLINE KMITA

Aos dezenove dias do mês de maio do ano de dois mil e dezessete, foi realizada no auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestrandu LUANA CAROLINE KMITA, intitulada "EFEITO NEUROPROTETOR DA ADMINISTRAÇÃO INTRANIGRAL DE RILUZOL EM MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR ROTENA APÓS PRIVAÇÃO DE SONO REM". A abertura teve início às 13h30min 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 ao primeiro examinador, Professora Doutora Maria Aparecida Barbatu Frazão Vital do Departamento de Farmacologia da UFPR. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Bruno Jacson Martynhak 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 arguido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela " aprovado ", 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. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

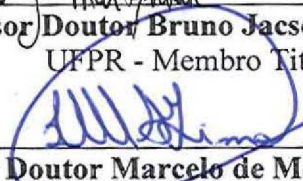
Curitiba, 19 de maio de dois mil e dezessete.



Professora Doutora Maria Aparecida Barbatu Frazão Vital
UFPR - Membro Titular



Professor Doutor Bruno Jacson Martynhak
UFPR - Membro Titular



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

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1714 – Fax (41) 3361-1714 – fisiologia@ufpr.br
www.bio.ufpr.br



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **LUANA CAROLINE KMITA** 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, 19 de maio de 2017

Professora Doutora Maria Aparecida Barbatto Frazão Vital
UFPR - Membro Titular

Professor Doutor Bruno Jacson Martynhak
UFPR - Membro Titular

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e Elenir, que me apoiaram e incentivaram durante toda a minha jornada acadêmica. Se hoje estou aqui, muito desta conquista pertence a eles.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aqueles que amo. Meus pais, Antônio e Elenir, aos quais me faltam palavras suficientes para agradecer tudo o que fizeram e fazem por mim. Com certeza, sem o apoio de vocês nada disso seria possível. Vocês que sempre acreditaram em mim e que fizeram dos meus objetivos os seus. Expresso profunda gratidão por tê-los em minha vida.

Ao Luiz, por ter me acompanhado durante esta jornada, que por vezes pareceu interminável. Por todo carinho, amor, atenção e paciência que dedica a mim todos os dias. Obrigada por ter suportado meus surtos diários e os telefonemas chorosos intermináveis. Você é parte importante deste ciclo. Amo você.

Um agradecimento especial ao meu orientador, prof. Marcelo, por ter me aceito como sua orientanda, por não hesitar em passar seu vasto conhecimento, por me aconselhar e acalmar nas vezes em que precisei. E acima de tudo, por me apresentar este mundo fantástico, e por vezes árduo, da ciência. O amor e comprometimento que você dedica a pesquisa são inspiradores.

Agradeço ao pessoal do laboratório de Neurofisiologia: Adriano, Lais, Ana, Ju, Paty, Jé, Flávia e Priscilla, sem a ajuda de vocês a realização deste trabalho não seria possível. Na convivência nem tudo são flores, mas devemos aprender a conviver e respeitar as diferenças. Sendo assim, este trabalho é tão meu quanto de vocês. Obrigada Tchokos.

Não poderia passar sem dedicar um parágrafo de agradecimento á você, Jéssica. Embarcou nesta jornada comigo e enfrentamos JUNTAS muitas coisas. Obrigada por todos os cafés na cantina, almoços no shopping, trocas de caixas, experimentos finais de semana e feriados, por todas as confidências e por aquela água salvadora que você buscou no biológicas em uma sexta às 10 horas da noite, lembra?!

Estendo aqui meu carinho e agradecimento á você também, Paty. Por todas as conversas, conselhos, caronas e por todos os “para de ser doida” que você me disse durante estes 2 anos. Obrigada!

Á minha amiga Juliana, por ter sido tão importante no início deste ciclo. Ju podemos não estar tão presentes na vida uma da outra o quanto gostaríamos, mas saiba que o meu carinho e amizade por você são infinitos. Obrigada por tudo!

Agradeço á todos os professores do departamento de Fisiologia, pelo exemplo e conhecimento repassado. Aos funcionários do biotério e do departamento de Fisiologia, Fábio, Rogério, Hely e Roberto por terem me ajudado em todas as vezes que precisei.

Agradeço ao prof. Edvaldo, do departamento de biologia celular, e também ao Israel, técnico do laboratório confocal. A contribuição de vocês foi extremamente importante para a conclusão deste trabalho.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro concedido a este projeto.

Por fim, a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero **MUITO OBRIGADO!**

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A excitotoxicidade parece desempenhar papel crucial na patogênese da doença de Parkinson (DP). O tegmento pedunculo pontino (PPT) representa a principal fonte de aferências glutamatérgicas à via nigroestriatal e a interconectividade recíproca entre estas estruturas tem sido relacionada com o mecanismo de controle e manutenção do sono REM (*rapid eye movemet*). Além disso, evidências sugerem que o PPT pode estar hiperativo na DP, ou seja, os neurônios dopaminérgicos estão, supostamente, expostos a níveis anormalmente altos de glutamato e conseqüentemente podem ser mais vulneráveis à neurodegeneração. Decidimos investigar o efeito neuroprotetor do riluzol, um antagonista do receptor NMDA, em ratos submetidos simultaneamente a lesão da via nigroestriatal com rotenona e a privação de sono REM (PSREM). Nossas descobertas mostraram que o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na substância negra pars compacta (SNpc), após a PSREM, protegeu os neurônios dopaminérgicos da lesão com rotenona. Em relação à hipolocomoção gerada pela lesão induzida por rotenona, a administração de riluzol foi capaz de reverter este prejuízo nos grupos controle. Ainda, uma correlação negativa significativa foi observada entre a intensidade de fluorescência do FJC na SNpc e a locomoção ($r = 0,45$; $P = 0,03$) para os grupos controle, indicando que quanto maior foi a locomoção menor foram os processos apoptóticos dos neurônios dopaminérgicos. Além disso, a redução da marcação fluorescente com FJC na SNpc foi associada ao aumento do desempenho cognitivo ($r = - 0,71$; $P = 0,0001$) nos grupos controle. Estes resultados indicam que a redução da excitotoxicidade, pela administração de riluzol, parcialmente protege os neurônios dopaminérgicos do dano neuronal e parece ser eficaz no alívio de sintomas motores.

Palavras-chave: excitotoxicidade, neuroproteção, riluzol, privação de sono REM, rotenona intranigral, doença de Parkinson.

ABSTRACT

Excitotoxicity has been related to play a crucial role in Parkinson's disease (PD) pathogenesis. Pedunculo-pontine tegmental nucleus (PPT) represents the major source of glutamatergic afferences to nigrostriatal pathway and putative reciprocal connectivity between these structures may exert a potential influence on REM sleep control. Also, PPT could be overactive in PD, it seems that dopaminergic neurons are under abnormally high levels of glutamate and consequently might be more vulnerable to neurodegeneration. We decided to investigate the neuroprotective effect of riluzole administration, a NMDA receptor antagonist, in rats submitted simultaneously to nigrostriatal rotenone and 24h of REM sleep deprivation (REMSD). Our findings showed that blocking NMDA glutamatergic receptors in the SNpc, after REMSD challenge, protected the dopaminergic neurons from rotenone lesion. Concerning rotenone-induced hypolocomotion, riluzole rescued this impairment in the control groups. We also found a significant negative correlation between FJC fluorescence intensity, within the SNpc, and locomotion ($r = -0,45$; $P = 0,03$) for the control groups, indicating that the higher was the locomotion the lower was the apoptosis processes of dopaminergic neurons. In addition, decreased FJC labeling within the SNpc was associated with increased cognitive performance ($r = -0,71$; $P = 0,0001$) in control groups. These data indicated that reduction of excitotoxicity, by riluzole administration, partially protects dopamine neurons from neuronal death and appeared to be effective in relieved motor symptoms.

Keywords: excitotoxicity, neuroprotection, riluzole, REM sleep deprivation, intranigral rotenone, Parkinson's disease.

LISTA DE ABREVIações

6-OHDA – 6 - Hidroxidopamina
AMPA - Ácido α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic
AP – Ântero-posterior
DA – Dopamina
DV – Dorso-ventral
ELA – Esclerose lateral amiotrófica
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GPe – Globo pálido externo
GPi – Globo pálido interno
LBD – Demência associada a corpúsculos de Lewy
LC – Locus coeruleus
LDT – Tegmento látero-dorsal
MAS – Atrofia sistêmica múltipla
ML – Médio-lateral
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NMDA - N-methyl-D-aspartato
NOS – Óxido nítrico sintáse
PLM – Movimento límbico dos membros
PPT – Tegmento pedúnculo pontino
PSREM – Privação de sono REM
RBD – Distúrbio comportamental do sono REM
RDN – Núcleo dorsal da rafe
REM – Movimentos oculares rápidos
ROS – Espécies reativas ao oxigênio
SNpc - Substância negra pars compacta
SNr – Substância negra pars reticulata
STN – Núcleo subtalâmico
TH – Tirosina hidroxilase
VA - Núcleo talâmico anterior ventral
VL - Núcleo talâmico anterior ventro-lateral
VTA – Area tegmental ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 DOENÇA DE PARKINSON	11
1.1.1 Distúrbios não motores da doença de Parkinson	13
1.1.2 Distúrbios de sono na doença de Parkinson	14
1.1.3 Papel da dopamina na regulação do sono	15
1.1.4 Sono e memória na doença de Parkinson	18
1.2 EXCITOTOXICIDADE	18
1.2.1 Excitotoxicidade na doença de Parkinson	20
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVO	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.1.1 Objetivos Específicos	26
4 ARTIGO CIENTÍFICO	27
5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é a principal doença neurodegenerativa relacionada a distúrbios do movimento. Segundo a *Parkinson's Disease Foundation*, estima-se que aproximadamente 10 milhões de indivíduos ao redor do mundo apresentem esta doença, sendo que a expectativa é o dobro no número de casos diagnosticados até 2030 (ABDULLAH *et al*, 2014; CUBO *et al*, 2015). A DP foi inicialmente descrita em 1817 por James Parkinson no “Ensaio sobre a Paralisia Agitante” (*Essay on the Shaking Palsy*), relatando alguns sinais como tremor em repouso, lentidão ou ausência de movimentos voluntários, perda de força muscular e instabilidade postural (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; LESS, HARDY & REVESZ, 2009).

Fisiopatologicamente, ela é marcada pela perda de neurônios dopaminérgicos (Fig. 1) da substância negra *pars compacta* (SNpc), sendo que a grande vulnerabilidade desta população de neurônios se deve, em parte, pela sua alta sensibilidade ao estresse oxidativo (DOBLE, 1999), como resultado, ocorrendo redução das projeções dopaminérgicas provenientes da SNpc para o estriado dorsal (LIMA *et al*, 2012a; BADIN *et al*, 2015).

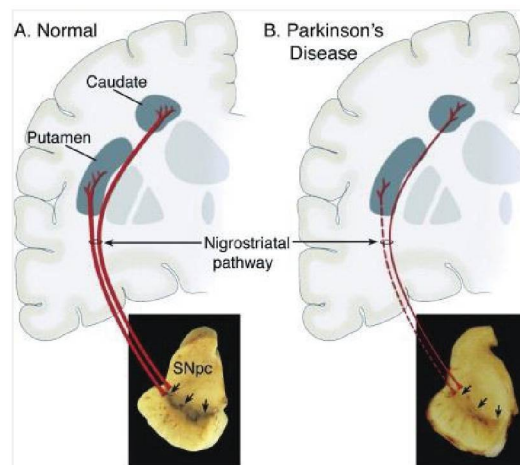


Figura. 1. (A) Representação esquemática da via nigroestriatal em situação normal, composta por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares estão localizados na SNpc e seus respectivos axônios que se projetam para os demais núcleos da base fazendo sinapses com o estriado (i.e., putâmen e núcleo caudado). (B) Representação esquemática da via nigroestriatal na DP, há perda acentuada da população de neurônios dopaminérgicos na SNpc, resultando em redução das projeções dopaminérgicas para o estriado. (Retirado de Dauer & Przedborski, 2003).

Além da SNpc outras populações neuronais são afetadas, tais como: neurônios aminérgicos do tronco encefálico (catecolaminérgicos e serotoninérgicos), neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert, neurônios hipotalâmicos, neurônios corticais (particularmente do giro cingulado e do córtex entorrinal), neurônios do bulbo olfatório, neurônios dos gânglios simpáticos e neurônios parassimpáticos (LANG & LOZANO, 1998). Um dos principais achados *post-mortem* é a presença de inclusões citoplasmáticas de caráter eosinofílico denominadas corpúsculos de Lewy (Fig. 2), cuja composição inclui agregados de diversas proteínas incluindo a α -sinucleína e a ubiquitina, resultando, a nível intracelular, em disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, desregulação do citoesqueleto e neuroinflamação (LANG & LOZANO, 1998; JELLINGER, 2012).

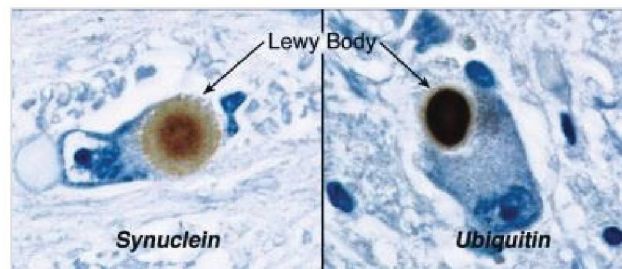


Figura. 2. Imunohistoquímica para inclusões citoplasmáticas de sinucleína e ubiquitina, denominadas corpúsculos de Lewy (*Lewy Body* – setas pretas), em um neurônio dopaminérgico da SNpc. (Retirado de Dauer & Przedborski, 2003).

A degeneração dos neurônios dopaminérgicos leva a um desequilíbrio entre as vias estriato-palidal e pálido-talâmico, as quais são responsáveis pelas manifestações motoras clássicas da doença: bradicinesia, tremor, instabilidade postural e rigidez (CAUDLE & ZANG, 2009; KAKKAR & DAHIYA, 2015), que se iniciam quando ocorre a perda de aproximadamente 60 a 80 % do conteúdo dopaminérgico presente na SNpc (LANG & LOZANO, 1998; NOLDEN, TARTAVOUILLE & PORCHE, 2014). Entretanto, sinais e sintomas não-motores (incluindo distúrbios olfatórios, de sono, ansiedade, depressão, déficits cognitivos e alterações gastrointestinais) também estão presentes na DP e antecedem as disfunções motoras em muitos anos (CAUDLE & ZANG, 2009; LIMA *et al*, 2012a), apresentando então, grande relevância no estudo e entendimento da doença, uma vez que podem possibilitar o seu diagnóstico precoce.

1.1.1 Distúrbios não motores da doença de Parkinson

Os sinais e sintomas não motores da DP correspondem peças chave para o entendimento, diagnóstico e tratamento da doença, visto que, apresentam impacto tão grande na qualidade de vida quanto os sintomas motores (MUZERENGI, CONTRAFATTO & CHAUDHURI, 2007). Nesse sentido destacam-se a depressão, déficits cognitivos, distúrbios olfatórios e de sono (LIMA *et al.*, 2012a). Estudos apontam que 62% dos sintomas não motores podem não ser relatados aos profissionais da saúde, isto porque os portadores da doença sentem-se envergonhados ou não tem conhecimento da relação entre estes e a DP (CHAUDHURI & SCHAPIRA, 2009; CHAUDHURI *et al.*, 2010).

Os distúrbios não motores antecedem as alterações motoras em anos ou até décadas, e isto se deve a característica topografia de progressão da doença, como proposto por Braak e colaboradores. Estes autores descreveram 6 estágios de evolução da doença (Fig. 3), onde nos estágios 1 e 2 ocorre o comprometimento da medula oblonga, tegmento pedunculopontino (PPT) e estruturas do bulbo olfatório, 3 e 4 mesencéfalo, prosencéfalo basal e mesocórtex e nos estágios 5 e 6 neocórtex, incluindo córtex pré-frontal, áreas pré-motoras e áreas sensoriais (BRAAK *et al.*, 2003).

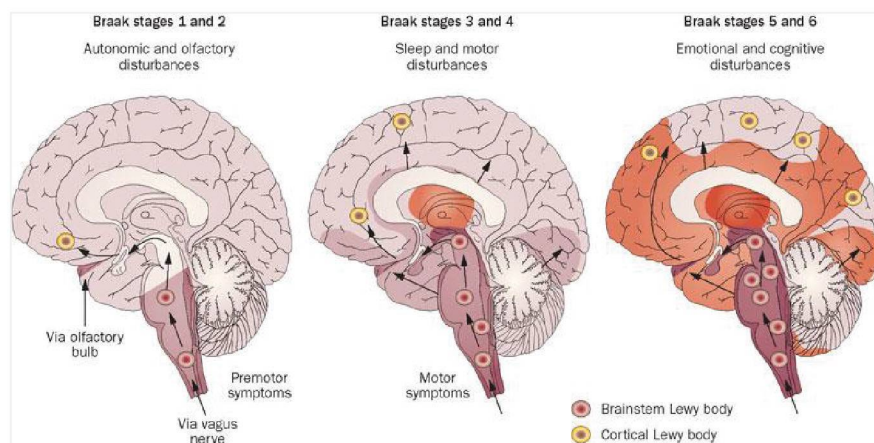


Figura. 3. Representação esquemática dos estágios da DP proposto por Braak e colaboradores. Verifica-se uma característica topográfica de progressão das inclusões citoplasmáticas (corpúsculos de Lewy) em diferentes núcleos encefálicos. A degeneração relacionada com a presença da α -sinucleína é possivelmente iniciada na periferia através do epitélio olfatório ou do estômago, talvez envolvendo fatores xenobióticos. (Retirado de Doty, 2012).

1.1.2 Distúrbios de sono na doença de Parkinson

Distúrbios de sono e a sonolência diurna excessiva são alterações conhecidas da DP, e foram relatadas na descrição original de James Parkinson “...o sono torna-se muito perturbado” (LIMA *et al*, 2012a; Lima, 2013; TODOROVA, JENNER & CHAUDHURI, 2014). Estes distúrbios são um dos problemas mais frequentes vivenciados por portadores de DP, afetando entre 60 e 95 % dos pacientes (BJØNARÄ, DIETRICH & TOFT, 2014) sendo caracterizados como insônia, distúrbio comportamental do sono de movimentos oculares rápidos (REM, do inglês *rapid eye movement*) (RBD, do inglês *REM sleep behavior disorder*), movimento periódico dos membros (PLM, do inglês *periodic limbic movements*) e sonolência diurna excessiva (LIMA, 2013).

O RBD, por exemplo, é uma parassonia presente em 25 – 50 % dos pacientes, caracterizado pela perda da atonia que caracteristicamente acompanha o sono REM, como consequência, os pacientes podem falar, gesticular, socar ou chutar em associação com o conteúdo do sonho (POSTUMA *et al*, 2009; LIMA, 2013). Além disso, esse distúrbio está associado a outras α -sinucleíopatias como a demência associada a corpúsculos de Lewy (LBD, do inglês *Lewy body dementia*) e a atrofia sistêmica múltipla (MSA, do inglês *multiple system atrophy*). Estima-se que, mais de 50 % dos indivíduos com o RBD idiopático eventualmente desenvolvam uma destas doenças (POSTUMA *et al*, 2009; POSTUMA & MONTPLAISIR, 2010; POSTUMA, GANGNON & MONTPLAISIR, 2013), com uma latência média, entre o início do RBD e o diagnóstico da doença neurodegenerativa, de aproximadamente 13 anos (CHEN *et al*, 2014).

Há ainda especulações sobre a associação do RBD com o aumento de outros sintomas não motores em portadores da DP, tais como a depressão e outras alterações de sono. Sugerindo o RBD como um biomarcador para um subgrupo de pacientes com maior prevalência de sintomas não motores (NEIKRUG *et al.*, 2014), além de refletir um avanço no processo neurodegenerativo (CHAHINE, AMARA & VIDENOVIC, 2016).

1.1.3 Papel da dopamina na regulação do sono

A dopamina (DA) foi classicamente descrita como um neurotransmissor envolvido com o estado de vigília, visto que, drogas que aumentam as concentrações sinápticas dela (anfetaminas e modafinil) são capazes de promover a vigília (SCAMMEL, ARRIGONI & LIPTON, 2017). Entretanto, avanços no estudo do sistema dopaminérgico possibilitam uma nova visão sobre este neurotransmissor, evidenciando uma forte associação entre a DA e o sono, em particular o sono REM (LIMA, REKSIDLER & VITAL, 2008).

Um dos primeiros estudos envolvendo este tema foi conduzido por Tufik e colaboradores em 1978, onde demonstrou que a privação de sono REM (PSREM) foi capaz de produzir uma supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos (TUFIK *et al.*, 1978). Mais tarde, outros trabalhos legitimaram o envolvimento entre o sistema dopaminérgico e o sono (TUFIK, 1981a; TUFIK, 1981b; LIMA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2008; TUFIK *et al.*, 2009).

Regiões encefálicas ricas em neurônios dopaminérgicos, tais como a SNpc e área tegmental ventral (VTA, do inglês *ventral tegmental area*) estão altamente conectadas com estruturas relacionadas ao controle do sono, enviando e recebendo projeções de núcleos como: núcleo dorsal da rafe (RDN), tegmento pedunculopontino (PPT), tegmento laterodorsal (LDT), locus coeruleus (LC), hipotálamo, tálamo e tronco encefálico (MONTI & MONTI, 2007).

Observa-se que os núcleos da base estão altamente interconectados com o PPT, aparentemente mais do que com qualquer outra região encefálica (Fig. 4), havendo grande similaridade no padrão das projeções neuronais destas estruturas, incluindo córtex, tálamo, amígdala e tronco encefálico (MENA-SEGOVIA, BOLAM & MAGILL 2004). Ainda, o PPT parece influenciar a atividade da DA estriatal via receptores colinérgicos e glutamatérgicos localizados em neurônios da SNpc (FORSTER & BLAHA, 2003).

dessincronizado de atividade cortical observado durante a ocorrência do sono REM. Paralelamente, também ocorre liberação de DA proveniente da ATV, em resposta ao estímulo glutamatérgico originado do LDT (Fig. 5).

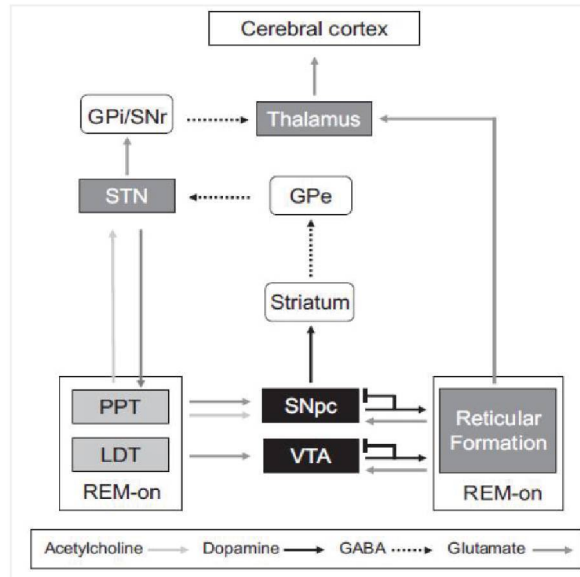


Figura. 5. Modelo de interação entre PPT e SNpc para regulação do sono REM. *Cerebral cortex*, córtex cerebral; GPe, globo pálido externo; GPI, globo pálido interno; LDT, tegmento látero-dorsal; PPT, tegmento pedúnculo-pontino; *Reticular formation*, formação reticular; SNpc, substância negra pars compacta; SNr, substância negra pars reticulata; STN, núcleo subtalâmico; *Striatum*, estriado; *thalamus*, tálamo; VTA, área tegmental ventral. (Retirado de Lima 2013).

Mais precisamente, a relação entre DA e sono REM é mediada pela ativação neuronal (acessada pela imunomarcagem da proteína c-Fos) da SNpc, tendo como componente chave os receptores dopaminérgicos do tipo D2 (PROENÇA *et al*, 2014), visto que, o bloqueio farmacológico destes receptores, produzido pela administração intraperitoneal do antagonista haloperidol, foi capaz de reduzir a porcentagem de sono REM durante o período rebote, após PSREM de 96 horas (LIMA *et al*, 2008).

Tal importância da interação entre o sistema dopaminérgico e o sono foi reforçada pelo trabalho de Targa e colaboradores, onde os animais que sofreram uma lesão seletiva do PPT, pela infusão de ácido ibotênico, apresentaram bloqueio da manifestação compensatória de sono REM, após um período de 24 h de PSREM, efeito este que foi prevenido pela administração estriatal de um agonista D2 (TARGA *et al*, 2016).

Ainda, a administração intraperitoneal do agonista piribedil, foi capaz de melhorar o desempenho cognitivo dos animais em um teste de memória declarativa,

conduzido após um período de PSREM (PROENÇA *et al*, 2014), o que torna esta modulação de receptores uma potencial estratégia para o tratamento de alterações cognitivas e de sono observadas em pacientes com DP (TAN & WAN, 2016).

1.1.4 Sono e memória na doença de Parkinson

Prejuízos cognitivos são bem estabelecidos na DP, estando associados com limitações na realização de atividades cotidianas, bem como na redução da qualidade de vida (FOSTER, MCDANIEL & RENDELL, 2017). Estima-se que a prevalência destes prejuízos, em pacientes recém diagnosticados, aproxime-se de 55% sendo que os principais domínios afetados incluem os das funções executivas como: o planejamento e flexibilidade cognitiva, velocidade de processamento, fluência verbal e processamento viso - espacial (ZWEIG, DISBROW & JAVALKAR, 2016).

Os processos de retenção e consolidação de memórias declarativas, observados, por exemplo, no teste de reconhecimento de objetos, sofrem grande impacto com o concomitante bloqueio de receptores D2 e a PRSEM (PROENÇA *et al*, 2014). Por outro lado, a ativação destes mesmos receptores neutraliza os efeitos causados pela PSREM (PROENÇA *et al*, 2014). Dada a correlação entre distúrbios de sono e prejuízos cognitivos, é possível considerar que alterações de sono observadas em pacientes com DP, tal como o RBD, possa ser considerada como um marcador precoce para os processos de demência (ERRO *et al*, 2012). Portanto, sugere-se que a deterioração na qualidade de sono possa também estar relacionada de forma a retroalimentar os prejuízos cognitivos vividos por estes pacientes.

1.2 EXCITOTOXICIDADE

O termo excitotoxicidade foi inicialmente descrito para definir a morte neuronal causada por altas concentrações de glutamato ou compostos com ação agonista sobre receptores glutamatérgicos (OLNEY, 1969; OLNEY, 1989). O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório presente no sistema nervoso central de mamíferos, portanto, alterações na homeostase desse

neurotransmissor podem resultar em repercussões significantes sobre neurônios, através da geração de cascatas excitotóxicas (CLAUDE & ZHANG, 2009). Suas ações ocorrem por meio da interação com seus receptores, ionotrópicos e metabotrópicos (DOUBLE, 1999). Dentro da classe dos receptores ionotrópicos temos o ácido α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic (AMPA), receptor kainato e o N-methyl-D-aspartato (NMDA). Já os receptores metabotrópicos, acoplados a proteínas G, são divididos em grupos, sendo grupo 1: mGluR1 e mGluR5; grupo 2: mGluR2 e mGluR3; grupo 3: mGluR4, mGluR5, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 (FAROOQUI, ONG & HORROCKS, 2008; CARRILLO-MORA, SILVA-ADAYA & SEÑOR-AGUAYO, 2013; ATOJI, 2015).

Nos primeiros estudos publicados envolvendo glutamato e excitotoxicidade, observou-se que, a aplicação direta deste em neurônios da retina e a injeção subcutânea de glutamato monossódico em camundongos neonatos, produziram lesões retinianas e induziram necrose neuronal aguda em diversas regiões encefálicas em desenvolvimento, respectivamente (LUCAS & NEWHOUSE, 1957; OLNEY, 1969).

A excessiva liberação de glutamato resulta na estimulação de seus receptores (principalmente AMPA e NMDA), permitindo grande influxo de íons Na^+ e Ca^{2+} , sendo que o excessivo influxo de Ca^{2+} pode resultar na mobilização dos estoques intracelulares de Ca^{2+} como do retículo sarcoplasmático e da mitocôndria (ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003). Esse acúmulo de Ca^{2+} pode desencadear a ativação de diversas cascatas intracelulares que culminam com a morte neuronal (Fig. 6), dentre elas a geração de radicais livres, ativação de proteínas kinases e diversas enzimas, incluindo as envolvidas na geração e metabolização do ácido araquidônico, alteração dos gradientes iônicos transmembrana e disfunção mitocondrial, com limitação na produção de ATP (FAROOQUI, ONG & HORROCKS, 2008; RUEDA *et al*, 2016).

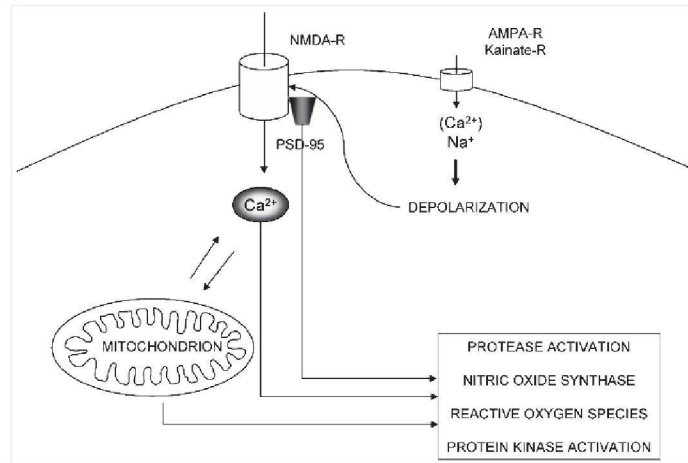


Figura 6. O glutamato se liga a receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e Kainato) permitindo o influxo de Ca^{2+} . O receptor NMDA está ligado a proteína PSD-95 que medeia a ativação da óxido nítrico sintase (NOS) levando a produção de óxido nítrico e espécies reativas ao oxigênio (ROS), culminando em alterações no funcionamento mitocondrial e neurotoxicidade. (Retirado de Henchcliffe & Beal, 2008).

O dano mitocondrial sem dúvida desempenha um papel crucial na morte neuronal, pois, o acúmulo de Ca^{2+} no interior dessa organela resulta em abertura de poros MPT (do inglês *mitochondrial membrane potential*) e perda do potencial de membrana mitocondrial, resultando em redução da síntese de ATP, e ainda, ocorrendo à liberação de fatores pró-apoptóticos como o citocromo-c para o citosol (TIROSH *et al.*, 2000).

1.2.1 Excitotoxicidade na doença de Parkinson

Há evidências de que a excitotoxicidade é um dos mais importantes mecanismos relacionados a doenças neurodegenerativas como relatado no intrigante caso ocorrido em uma população *Chamorro* de *Guam* e outra de *South Sea Islands* que apresentaram um aumento na incidência dos casos esclerose lateral amiotrófica (ELA), Parkinsonismo e demência. A ausência de fatores transmissíveis destas doenças chamou a atenção para a realização de pesquisas envolvendo possíveis fatores ambientais, sendo que nesses casos identificou-se o salgueiro *Cycas circinalis* como o agente causador. Essa planta apresenta um número expressivo de substâncias (em suas sementes) com grande potencial neurotóxico, incluindo o β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) (OLNEY, 1986; ZORUMSKI & OLNEY, 1993). Estudos com esta toxina demonstraram que o dano

neuronal resulta da ativação de receptores NMDA, com consequente aumento na geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e influxo de Ca^{2+} , seguidas de prejuízo na atividade mitocondrial e morte neuronal, indicando que o principal modo de atividade é via mecanismos excitotóxicos (COPANI *et al.*, 1990; CHIU *et al.*, 2011).

Ainda, evidências da literatura sugerem o envolvimento desses mecanismos excitotóxicos na DP, apontando o estresse oxidativo e as alterações na homeostase mitocondrial como fatores contribuintes complementares (MEREDITH, HALLIDAY & TOTTERDELL, 2004; VAN LAAR *et al.*, 2015). Análises *pós mortem* de encéfalos humanos indicam que a produção de ROS e a redução na atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial são importantes mecanismos presentes na DP esporádica (DAWSON & DAWSON, 2002). Além disso, observa-se um aumento nos níveis extracelulares de glutamato na SNpc de ratos tratados cronicamente com MPTP, sugerindo uma superestimulação da via de sinalização glutamatérgica, configurando-se como um importante mecanismo de morte de neurônios dopaminérgicos (MEREDITH *et al.*, 2009).

O modelo de excitotoxicidade frequentemente relacionado à DP provém do desequilíbrio do circuito córtico-basal, sendo que fisiologicamente este sistema funciona da seguinte maneira: na via direta o estriado envia projeções inibitórias (GABAérgicas) para globo pálido interno (GPi) e substância negra *pars reticulada* (SNr), GPi por sua vez envia projeções inibitórias (GABAérgicas) para núcleos talâmicos anterior ventral (VA) e ventro-lateral (VL), que por sua vez emitem conexões excitatórias para os córtices pré-frontal, pré-motor e motor suplementar. Neurônios do estriado apresentam pouca atividade basal, em contraste aos neurônios do GPi que apresentam alto nível de atividade, durante os movimentos o estriado é ativado, e suas projeções inibitórias para o GPi reduzem seu nível de atividade, favorecendo a desinibição dos núcleos VA e VL no tálamo, facilitando o movimento. Já na via indireta, o estriado envia projeções inibitórias (GABAérgicas) para o globo pálido externo (GPe), o qual basalmente inibe o núcleo subtalâmico (NST), assim a inibição do GPe resulta em desinibição do NST, que por sua vez aumenta a liberação de glutamato no GPi e SNpc, resultando em inibição dos núcleos VA e VL do tálamo por influencia do GPi (Fig. 7) (LANGE, KORNHUBER &

RIEDERER, 1997; KOEPPEN & STANTON, 2009; KEELER, PRETSELL & ROBBINS, 2014).

Na DP, a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos produz uma redução de suas projeções para o estriado, resultando em redução da estimulação de receptores D1 (excitatórios) da via direta, combinado a uma perda da inibição da via indireta mediada por receptores D2 (inibitórios) produzindo desinibição do NST causando, secundariamente, um aumento na liberação de glutamato para áreas como GPi e SNpc, esta última, rica em receptores NMDA, AMPA e mGluR1/2/3 (Fig. 7) (CAUDLE & ZANG, 2009; CARRILLO-MORA, SILVA-ADAYA & SEÑOR-AGUAYO, 2013).

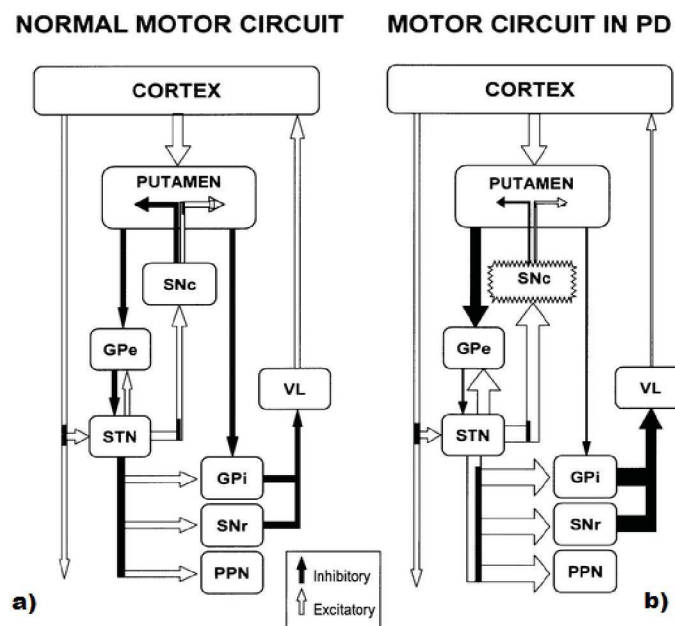


Figura 7. Representação das vias direta e indireta do sistema córtico-basal em circuito motor normal e na DP. a) circuito motor normal; o putâmen (aqui representando estriado) recebe projeções excitatórias do córtex, e inibe GPi e SNr, GPi por sua vez, deixa de inibir núcleos talâmicos (VA e VL), ativando a via cortical. Dopamina modula a atividade estriatal, principalmente por inibir a via indireta e facilitar a via direta. b) na DP ocorre aumento de atividade da via indireta, onde GPe é inibido pelo estriado, deixando de inibir o STN, que através de ação glutamatérgica produz excitação do GPi/SNr, os quais inibem a atividade talâmocortical. SNc, substância negra *pars compacta*; GPe, globo pálido externo; STN, núcleo subtalâmico; GPi, globo pálido interno; SNr substância negra *pars reticulada*; PPN, núcleo pedúnculo pontino; VL, área talâmica ventro lateral. (Retirado de Obeso *et al.*, 2002).

Evidências do papel neurodegenerativo que o NST exerce sobre a população de neurônios dopaminérgicos são provenientes de modelos animais, sendo que a redução do influxo glutamatérgico proveniente do NST têm mostrado um efeito neuroprotetor sobre neurônios dopaminérgicos expostos a diversas neurotoxinas (LUQUIN *et al.*, 2006). Manipulações realizadas no NST, tais como:

lesões com ácido ibotênico ou kainato, estimulação de alta frequência e manipulação genética, a fim de sintetizar e liberar ácido gama-aminobutírico (GABA) ao invés de glutamato, foram capazes de proteger a população de neurônios dopaminérgicos da SNpc ao posterior insulto ocasionado pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), resultando em redução do processo neurodegenerativo (CHEN *et al.*, 2000; CARVALHO & NIKKHAH, 2001; LUO *et al.*, 2002; MAESAWA *et al.*, 2004).

Entretanto, outras estruturas fornecem projeções glutamatérgicas à SNpc, tais como o PPT (FORSTER & BLAHA 2003), sendo este núcleo, uma das maiores origens das projeções glutamatérgicas para os neurônios nigroestriatais, portanto, exercendo grande influência excitatória sobre estes (LAVOIE & PARENT, 1994; LUQUIN *et al.*, 2006). Tal interconectividade foi demonstrada por Kojima e colaboradores, onde lesões no PPT em primatas resultaram em comportamentos de hemiparkinsonismo (postura flexionada e hipocinesia), que possivelmente foram gerados pela redução da atividade dos neurônios nigroestriatais em resposta a redução das projeções excitatórias provenientes do PPT (KOJIMA *et al.*, 1997).

Desta maneira, há a possibilidade de que o PPT, analogamente ao NST, possa vir a desempenhar um papel de favorecer a ocorrência de mecanismos excitotóxicos sobre os neurônios dopaminérgicos da SNpc (CHARARA, SMITH & PARENT, 1996). Portanto, sugere-se a participação do PPT na fisiopatologia da DP, visto que, há evidências do aumento da atividade glutamatérgica e colinérgica deste núcleo em modelo animal induzido pela administração de 6-OHDA na SNpc (BREIT *et al.*, 2001).

Não obstante, PPT e SNpc interagem reciprocamente a fim de iniciar e manter os eventos de sono REM (LIMA, 2013). Todavia, na DP, o PPT poderia desempenhar um papel favorável ao desencadeamento de um processo neurodegenerativo sobre a população de neurônios dopaminérgicos da SNpc, através de suas projeções glutamatérgicas, contribuindo para a ocorrência de distúrbios de sono, tal como o RBD (LIMA, 2013). Uma vez que a DA esteja reduzida pela degeneração de neurônios dopaminérgicos, o PPT poderia gerar uma hiperatividade compensatória, resultando em um aumento da neurotransmissão glutamatérgica em suas projeções para a SNpc, expondo os neurônios dopaminérgicos a potenciais eventos excitotóxicos.

Algumas evidências apontam que, a PSREM pode, potencialmente, contribuir para o dano neuronal através do aumento do estresse oxidativo e indução de mecanismos apoptóticos (BISWAS, MISHRA & MALLICK, 2006; KHADRAWY, NOUR & EZZ, 2011), além de expor os neurônios a, possíveis, eventos excitotóxicos, já que ocorre aumento nos níveis de glutamato em diversas regiões encefálicas (MOHAMMED *et al.*, 2011; KREUTZMANN *et al.*, 2015). Ainda, a privação crônica de sono REM é capaz de alterar a sinalização de Ca^{2+} em células hipocâmpais de ratos idosos, via estimulação glutamatérgica, deixando-os vulneráveis e podendo culminar em morte celular (SOUZA *et al.*, 2012).

Por outro lado, a privação de sono também pode ser capaz de produzir um efeito, aparentemente neuroprotetor, como observado no estudo realizado por Novati e colaboradores, onde os animais que foram privados cronicamente de sono total apresentaram menor sensibilidade a uma lesão excitotóxica produzida pela administração de NMDA no núcleo magnocelular, em comparação aos seus controles (NOVATI *et al.*, 2012). Resultado semelhante foi observado pelo estudo que demonstrou que a privação de sono total foi capaz de reduzir o dano morfológico causado por trauma mecânico prévio no córtex motor de ratos, além de produzir significativa melhora no período de recuperação (MARTINEZ-VARGAS *et al.*, 2012). Entretanto, o papel que a privação de sono, seja ela total ou parcial, exerce sobre a viabilidade neuronal ainda necessita de melhor compreensão.

2 JUSTIFICATIVA

O glutamato é o principal e mais abundante aminoácido excitatório presente no sistema nervoso central de mamíferos, sendo assim, disfunções do sistema glutamatérgico têm sido relacionadas com diversas patologias, incluindo doenças neurodegenerativas. Entretanto, o papel que a excitotoxicidade desempenha na etiologia e progressão destas doenças ainda necessita de melhor compreensão. Em relação à DP, a excitotoxicidade é frequentemente relacionada a um desequilíbrio entre o sistema córtico-basal, promovendo aumento da atividade das projeções glutamatérgicas do NST. Todavia, considerando a interação recíproca entre o PPT e a SNpc, durante o início e manutenção do sono REM, é possível que em um contexto de DP, a superestimulação da via glutamatérgica proveniente do PPT em direção à SNpc, possa potencialmente, expor a população de neurônios dopaminérgicos a cascatas excitotóxicas e vir a contribuir para o processo neurodegenerativo. Desta maneira, o estudo do envolvimento desta via com eventos excitotóxicos pode revelar novas perspectivas para o tratamento e consequente melhora na qualidade de vida destes pacientes.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a ocorrência de um possível efeito neuroprotetor através do bloqueio dos receptores do tipo NMDA, presentes na SNpc, em animais submetidos simultaneamente a lesão da via nigroestriatal e PSREM.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos motores produzidos pelo bloqueio de receptores do tipo NMDA (através do tratamento com riluzol) na SNpc através do teste do campo aberto em modelo animal de Parkinsonismo induzido por rotenona, em um contexto de PSREM;
- Analisar os efeitos cognitivos produzidos pelo bloqueio de receptores do tipo NMDA (através do tratamento com riluzol) na SNpc através do teste de reconhecimento de objetos em modelo animal de Parkinsonismo induzido por rotenona, em um contexto de PSREM;
- Investigar os eventos excitotóxicos decorrentes da PSREM, por meio de fluorescência para células apoptóticas na SNpc em modelo animal de Parkinsonismo induzido por rotenona;
- Detectar eventos excitotóxicos decorrentes da PSREM, por meio de fluorescência para células apoptóticas na SNpc, produzidos pelo bloqueio de receptores do tipo NMDA (através do tratamento com riluzol) na SNpc em modelo animal de Parkinsonismo induzido por rotenona;
- Estabelecer possíveis correlações entre os parâmetros de sinalização de ocorrência de apoptose na SNpc com os desempenhos motor e cognitivo, advindos do tratamento com riluzol, em um contexto de PSREM;

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Intranigral riluzole administration partially protected SNpc neurons from rotenone-induced lesion preventing locomotor but not cognitive deficits

Luana Caroline Kmita¹, Jéssica L. Ilkiw¹, Lais S. Rodrigues¹, Adriano D. S. Targa¹, Ana Carolina D. Nosedá¹, Patrícia dos Santos¹, Juliane M. Fagotti¹, Edvaldo S. Trindade² and Marcelo M. S. Lima¹✉.

¹ Laboratório de Neurofisiologia, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil;

² Laboratório de Processos Celulares, Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil;

✉ **Corresponding author:**

Marcelo M. S. Lima, PhD

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

Phone number: 0055-041-3361 1754

E-mail: mmslima@ufpr.br or marcelomslima.neuro@gmail.com

ABSTRACT

Excitotoxicity has been related to play a crucial role in Parkinson's disease (PD) pathogenesis. Pedunculo-pontine tegmental nucleus (PPT) represents one of the major source of glutamatergic afferences to nigrostriatal pathway and putative reciprocal connectivity between these structures may exert a potential influence on REM sleep control. Also, PPT could be overactive in PD, it seems that dopaminergic neurons are under abnormally high levels of glutamate and consequently might be more vulnerable to neurodegeneration. We decided to investigate the neuroprotective effect of riluzole administration, a NMDA receptor antagonist, in rats submitted simultaneously to nigrostriatal rotenone and 24h of REM sleep deprivation (REMSD). Our findings showed that blocking NMDA glutamatergic receptors in the SNpc, after REMSD challenge, protected the dopaminergic neurons from rotenone lesion. Concerning rotenone-induced hypolocomotion, riluzole rescued this impairment in the control groups. We also found a significant negative correlation between FJC fluorescence intensity, within the SNpc, and locomotion ($r = -0,45$; $P = 0,03$) for the control groups, indicating that the higher was the locomotion the lower was the apoptosis processes of dopaminergic neurons. In addition, decreased FJC labeling within the SNpc was associated with increased cognitive performance ($r = -0,71$; $P = 0,0001$) in control groups. These data indicated that reduction of excitotoxicity, by riluzole administration, partially protects dopamine neurons from neuronal death and appeared to be effective in relieved motor symptoms.

Keywords: excitotoxicity, neuroprotection, riluzole, REM sleep deprivation, intranigral rotenone, Parkinson's disease.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most common progressive neurodegenerative disorder, especially prominent in aging societies (Verhave *et al.*, 2012; Lima, 2013). PD is characterized by progressive dopaminergic neuronal loss within the substantia nigra pars compacta (SNpc) that tends to be more broadly in the ventrolateral layer followed by medial ventral and dorsal layers (Lang & Lozano, 1998; Luquin *et al.*, 2006). PD pathogenesis is a complex and multifactorial process, both genetic features and environmental stressors converge and compromising neuronal activity (Amobrosi, Cerri & Blandini, 2014).

The precise intrinsic mechanism of the dopaminergic neuronal death remains unknown, however, several lines of evidence highlighted the importance of enhanced glutamatergic neurotransmission in basal ganglia and related structures in the PD development (Luquin *et al.*, 2006). In PD, some glutamatergic systems are somewhat hyperactive, such as corticostriatal and subthalamo-nigral pathways, potentially contributing to dopaminergic neuronal death, through the excitotoxicity process (Olney, 1969; Olney, 1989; Carbone, Duty & Rattray, 2012).

In this sense, pedunculopontine tegmental nucleus (PPT) is one of the major source of glutamatergic afferences to nigrostriatal pathway (Lavoie & Parent, 1994). Remarkably, the basal ganglia, including SNpc, and PPT share numerous similarities in projections to cortex, thalamus amygdala and brainstem (Mena-Segovia *et al.*, 2004). Accordingly, there is a hypothesis that PPT could play an excitotoxic role in dopaminergic neurons, suggesting some level of participation in PD pathogenesis, since PPT demonstrated to be highly active in the 6-OHDA animal model (Charara, Smith & Parent, 1996; Breit *et al.*, 2001).

Furthermore, mutual interactions between PPT and SNpc are associated with REM sleep generation. Thus, nigral degeneration has been related with significant disruption in REM sleep in both animal models (LIMA *et al.*, 2007; BARRAUD *et al.*, 2009; TARGA *et al.*, 2016) and PD (ZHANG *et al.*, 2016; PIERANTOZZI, *et al.*, 2016). In this context, PPT could play a role in neurodegenerative process, triggering excitotoxicity within the SNpc, contributing to the occurrence of sleep disorders (Lima, 2013).

Therefore, it is considered that reduced nigrostriatal activity would inflict in a compensatory PPT firing, resulting in increased glutamatergic neurotransmission to SNpc, with potential excitotoxic mechanisms. Based on these observations, we promoted nigrostriatal lesions with the neurotoxin rotenone (REF), associated with REM sleep deprivation (REMSD) and/or riluzole administration, a NMDA receptor antagonist with clinical neuroprotective applications, p.e., in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Jaiswal, 2017). Our hypothesis is also based on a 24 h REMSD-induced down-regulation of tyrosine hydroxylase (TH) expression, within the nigrostriatal pathway (Tufik *et al.*, 1981; Nunes, Tufik & Nobrega, 1994; Lima *et al.*, 2012), possibly promoting an increased PPT activity, negatively impacting SNpc neurons through excessive glutamatergic signaling.

Material and Methods

Animals and house conditions

All of the experiments performed in this study were approved by the ethics committee of Federal University of Paraná (approval ID#918) and conducted according to the guidelines of ethics and experimental care and use of laboratory animals (SBCAL). Male Wistar rats weighing 280-230 g at the beginning of the experiment were used. The animals were randomly housed in groups of 5 in polypropylene cages and maintained in a temperature controlled room ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) with a 12h light-dark cycle (lights on at 7:00 am). Bottles of water and pellets of food were available throughout the entire experiment.

Experimental design

One week before the experiments begin, the animals were maintained in the room described above for habituation. Before the stereotaxic surgeries the animals were distributed randomly in two groups: Sham (n=48) and Rotenone (n=48). Afterwards, the animals were redistributed in eight groups (n=12/group): sham control vehicle, sham control riluzole, rotenone control vehicle, rotenone control

riluzole, sham REMSD vehicle, sham REMSD riluzole, rotenone REMSD vehicle and rotenone REMSD riluzole. As indicated in Fig. 1, on the day 0, the animals underwent stereotaxic surgery and bilateral guide cannulas were implanted within the SNpc. On day 7 the animals received a bilateral intranigral infusion of 1 μ l of rotenone (12 μ g/ μ l) or equal volume of its vehicle dimethylsulfoxide (DMSO) and then the rats were subjected to 24 h of REM sleep deprivation (REMSD) or kept in their home cages (control). Immediately after this period, the animals received a single bilateral intranigral infusion of 1 μ l of riluzole (10 μ g/ μ l) or equal volume of DMSO, subsequently (30 minutes after) they were tested in the OF and ORT. At the end of these experiments, the animals were perfused for fixation and the brains removed for subsequent confocal microscopy analysis of apoptotic cells in the SNpc.

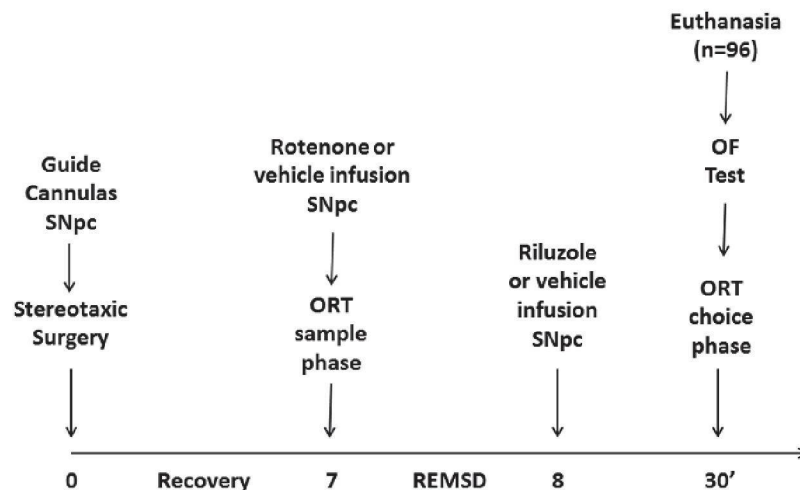


Figure 1. Experimental design. On the day 0, guide cannulas were implanted in the SNpc, after 7 days of recovery, the animals performed the ORT sample phase and received a singular bilateral intranigral infusion of the neurotoxin rotenone or vehicle (DMSO). After this procedure, the animals were exposed to 24h of REMSD. On the day 8, the animals received a singular bilateral infusion of riluzole (NMDA receptor agonist) or vehicle (DMSO) and 30 minutes later they performed the OF test and ORT choice phase. At the end of this experiment, the animals were euthanized.

Stereotaxic surgery and intranigral infusions

The animals were sedated with intraperitoneal xylazine (10 mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Brazil) and anaesthetized with intraperitoneal ketamine (90 mg/kg; Syntec do Brasil Ltda, Brazil). The following coordinates were used for bilateral guide cannulas implantation, bregma as a reference: SNpc (AP) = - 5,0 mm, (ML) = \pm 2,1 mm e (DV) = - 7,8 mm (Paxinos and Watson 2005).

Bilateral intranigral infusions of 1 μ l of Rotenone (12 μ g/ μ l), 1 μ l of riluzole (10 μ g/ μ l; Sigma-Aldrich®, United States) or 1 μ l of DMSO (Sigma-Aldrich®, United States) were all made through the guide cannulas, at a rate of 0.33 ml/min for 3 min (RODRIGUES *et al*, 2014; TARGA *et al*, 2016), with the assistance of an electronic infusion pump (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brazil).

REMSD procedure

REMSD was attained by means of the single platform method. The animals were individually placed in a circular platform (6.5 cm in diameter) inside of a tank (23 x 23 x 35 cm) filled with water up 1 cm below the platform surface for 24 h. Once the animal experiences a REM sleep episode, it loses its muscular tonus and falls into the water, being awakened. This procedure has demonstrated effectiveness in ablation of REM sleep without affecting NREM sleep (MACHADO *et al*, 2004). Throughout the study, the experimental room was maintained at controlled conditions (22 \pm 2 °C, 12 h light/dark cycle, lights on 7:00 a.m.). The control group (non-sleep deprived) was maintained in the same room during the period, but isolated in their usual home cages, to mimic a possible effect of isolation caused by the procedure. Water and food were available during the entire experiment.

Open Field Test (OF)

The apparatus consists of a circular arena (1 m of diameter) limited by a 40 cm high wall and illuminated by four 60 W lamps situated 48 cm above the arena floor, providing illumination around 300 lx (BROADHURST, 1960). The animals were gently placed in the center of the arena and were allowed to freely explore the area for 5 min. During the experiments, the open field test was video recorded and the measures of locomotion of the groups were computed by an image analyzer system (Smart junior, PanLab, Harvard Apparatus, Spain).

Object Recognition Test (ORT)

The apparatus consists of an open box (width × length × height = 80 cm × 80 cm × 50 cm) made of wood and covered with a black opaque plastic film. The illumination on the floor of the box apparatus was around 186 lx. The objects to be discriminated were available in triplicate copies and were made of a biologically neutral material such as glass, plastic, or metal. The objects were weighted so that the animals could not move them around in the arena. They are not known to have any ethological significance for the rats and they had never been associated with any reinforcement (Ennaceur & Delacour, 1988). The object recognition test consists of two phases, a sample phase (3-min duration) and a choice phase (3-min duration). In the sample phase, two identical objects are exposed in the back corners of the open box, 10 cm away from the sidewall. The rat is placed in the open box facing away from the objects for 3 times with a 15 min retention interval between the times. After 24 h, the rat is reintroduced to the open box and the choice phase is started. In the choice phase, two different objects are exposed in the same locations that were occupied by the previous sample objects. One of the objects is identical to the object seen in the sample phase and the other is a novel object, the total time spent in exploring the two objects was video recorded. The frequencies of approaches of each object are recorded. The exploration is recorded only when the rat touches the object with its nose or that the rat's nose is directed toward an object at a distance ≤ 2 cm. As a measure of discrimination, "discrimination index (DI)" was calculated by dividing the difference in number of explorations between the two objects (object novel – object familiar) by the total amount of exploration for both objects (object novel + object familiar). DI was then multiplied by 100 to express as a percentage.

Fluoro Jade C (FJC) staining within SNpc

Animals were deeply anesthetized with ketamine immediately after the OF and ORT, and were intracardially perfused with saline first, then with 4% of the fixative solution formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were removed from the skulls and were immersed for 48 hours in that fixative solution at

4°C. Subsequently, the brains were placed in 30% sucrose solution for 3 days and were freeze at -80°C before sectioning. Four 40 µm sections per animal were taken from the SNpc (-4.92 mm and -5.28 mm). The coordinates were obtained from Paxinos & Watson (2005).

Prior to staining, sections were mounted from distilled water onto gelled slides. Gelatin coated slides were prepared by immersion in a 60 °C solution of 1% pig skin gelatin (Sigma; type A, 300 Bloom) and then oven dried overnight at the same temperature. The sections were mounted onto the slides from distilled water and then air dried for at least 30 min on a slide warmer at 50 °C. Slides bearing frozen cut tissue sections were first immersed in a solution containing 1% sodium hydroxide in 80% ethanol for 5 min. They were then rinsed for 2 min in 70% ethanol, for 2 min in distilled water, and then incubated in 0.06% potassium permanganate solution for 10 min. Slides were then transferred for 10 min to a 0.0001% solution of Fluoro-Jade C (Chemicon International) dissolved in 0.1% acetic acid vehicle. The proper dilution was accomplished by first making a 0.01% stock solution of the dye in distilled water and then adding 1 ml of the stock solution to 99 ml of 0.1% acetic acid vehicle. The working solution was used within 2 h of preparation. The slides were then rinsed through three changes of distilled water for 1 min per change. Excess water was drained onto a paper towel, and the slides were then air dried on a slide warmer at 50 °C for at least 5 min. The air dried slides were then cleared in xylene for 5 min and then coverslipped with Fluoromount-G (SouthernBiotech) non-fluorescent mounting media.

The images were analyzed in Nikon Confocal Microscope A1RSiMP (NIKON; Tokyo, Japan), using 20x lenses immersed in oil. For FJC, 525-50 nm laser was used for excitation and a 500-550nm band pass filter was employed. The Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON; Tokyo, Japan) was used for images visualization.

Statistical analysis

Homogeneity of variance was assessed by the Bartlett test and normal distribution of the data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between groups in the OF, ORT and discrimination index were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's post hoc test. Fluorescence

intensity was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls multiple comparison test. Pearson's correlation coefficients (r) were calculated to establish relationships between fluorescence intensity and behavioral parameters. Values were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). The level of significance was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Open Field Test (OF)

As can be seen in Figure 2, the control rotenone vehicle group presented an impaired locomotion in comparison to the control sham vehicle group ($P \leq 0.05$), as indicated by the group factor [$F(3,54) = 2.21$; $P \leq 0.09$]. Interestingly, the same effect was not observed in the control rotenone riluzole group when compared to the control sham vehicle ($P \geq 0.96$) and control sham riluzole ($P \geq 0.99$) groups. Complementarily, the rotenone REMSD groups did not exhibit reductions in locomotion when compared to the control sham ($P \geq 0.95$) and REMSD sham ($P \geq 0.97$) groups, according to the treatment [$F(1,54) = 0.063$; $P = 0.8$] and interaction [$F(3,54) = 1.59$; $P = 0.20$] factors.

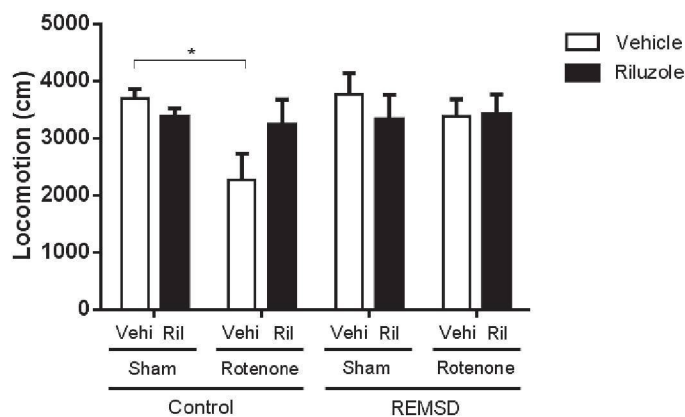


Figure 2. Locomotion parameter obtained from the open field test 8 days after surgery, 30 minutes after drug (riluzole) or vehicle (DMSO) micro infusion. Comparison between control and REMSD groups. Values are expressed as mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Object Recognition Test (ORT)

Regarding the cognitive analysis, we found that the control sham vehicle group showed an increment in the time exploring the novel object in comparison to the familiar ($P \leq 0.01$) during the choice phase, as well as the control sham riluzole group ($P \leq 0.01$), by means of the treatment [$F(7.10)=3.17$; $P \leq 0.01$] and interaction [$F(7.10)=3.63$; $P \leq 0.001$] factors (Fig. 3A). Conversely, the control rotenone groups demonstrated a similar exploration time for both objects, indicating memory impairment as showed by the object [$F(1.10)=2.57$; $P=0.1$] factor. Besides, it was detected that REMSD, itself, produced a remarkable impairment in the object recognition, since all the sleep deprived groups explored both objects equally.

Figure 3B shows the discrimination index (DI) obtained from the time of objects exploration recorded for each control and REMSD groups. Accordingly, the control rotenone vehicle exhibited a significant reduction in this parameter when compared to the control sham vehicle ($P \leq 0.05$). As observed in the previous parameter, REMSD, per se, promoted a noteworthy decrease in this index for all the groups that were sleep deprived. Therefore, we observed a significant decrease in the DI for the REMSD sham vehicle ($P \leq 0.01$) and REMSD sham riluzole ($P \leq 0.05$) groups when compared to their respective controls [$F(3.57)=10.84$; $P < 0.0001$].

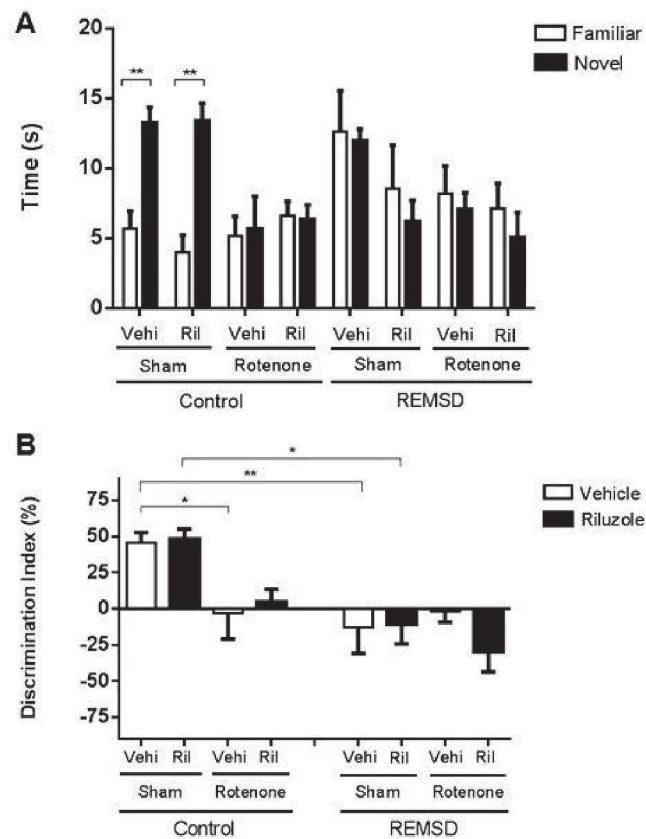


Figure 3. Cognitive effects produced by riluzole administration after REMSD, detected in the object recognition test. **(A)** Time (s) exploring the familiar and novel object 8 days after surgery, 30 minutes after drug (riluzole) or vehicle (DMSO) micro infusion. **(B)** Discrimination index calculated by $(N-F/N+F) \times 100$, N is the time exploring novel object and F is the time exploring familiar object. Comparison between control and REMSD groups. Values are expressed as mean \pm SEM. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Fluoro Jade C (FJC) staining within SNpc

Figure 4 depicts the differences on fluorescence intensity among the groups. The control sham vehicle (Fig. 4A) and REMSD sham vehicle (Fig. 4B) groups barely exhibited fluorescent labeling (Fig. 4C). In opposite, the control rotenone vehicle (Fig. 4A) and REMSD rotenone vehicle (Fig. 4B) groups shown significant fluorescence increase compared, respectively, to the groups control sham vehicle ($P < 0.001$) and REMSD sham vehicle ($P < 0.001$) (Fig. 4C). Conspicuously, we detected that riluzole treatment produced a prominent reduction in the FJC fluorescence intensity as can be seen in the control rotenone riluzole (Fig. 4A) and REMSD rotenone riluzole (Fig. 4B) groups, compared to the control rotenone vehicle ($P < 0.001$) and REMSD rotenone vehicle ($P < 0.001$) groups, respectively [$F(7,43)=78.31$; $P < 0.0001$] (Fig. 4C).

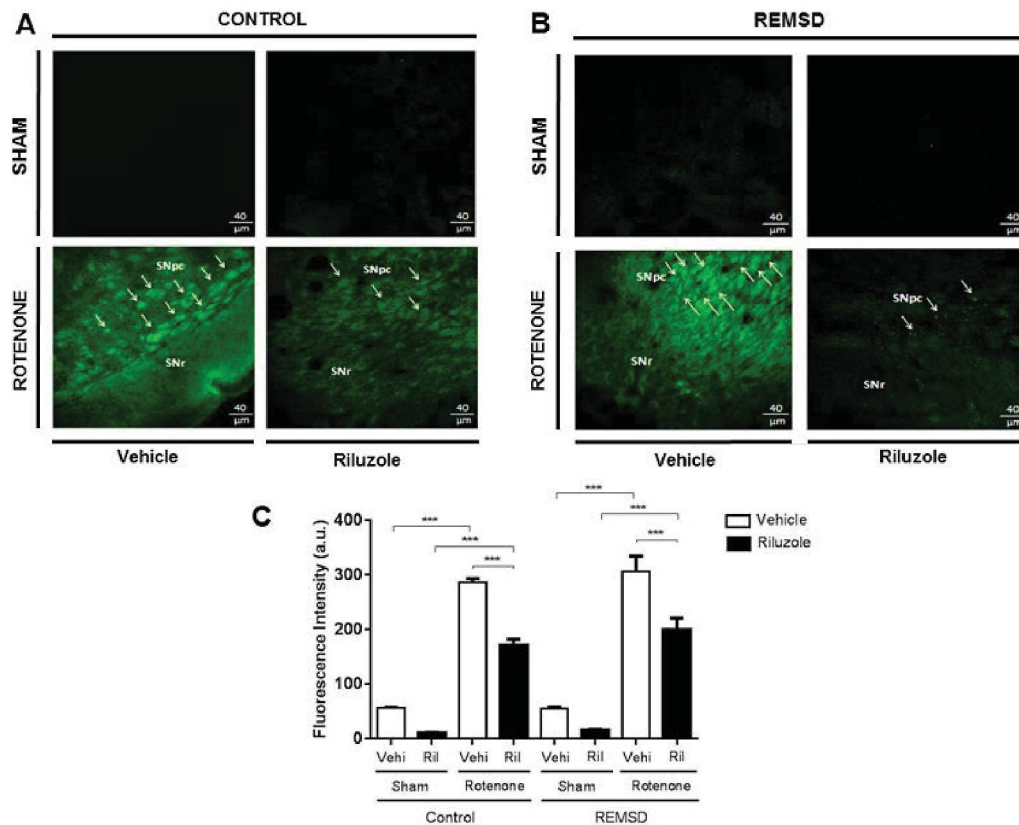


Figure 4. Comparison of Fluoro-Jade C (FJC) staining in the SNpc. Panel (A) Control groups. Panel (B) REMSD groups. (C) -Fluorescence Intensity (a.u.) of Fluoro-Jade C (FJC) staining for degenerative neuronal cells in the SNpc. Comparison between control and REMSD groups. Values are expressed as mean \pm SEM. *** $P < 0.001$. One-way ANOVA followed by Newman Keuls test.

Statistical correlations between behavioral parameters and FJC staining

Pearson's correlation coefficients revealed the existence of a moderate negative correlation ($r = -0.45$; $P = 0.03$) between locomotion and fluorescence intensity for the control groups (Fig. 5A). However, REMSD was able to abolish such relation in view of the absence of statistical significance ($r = -0.05$; $P = 0.79$) observed from the REMSD groups (Fig. 5B). In addition, a rather stronger negative correlation ($r = -0.71$; $P = 0.0001$) was observed between DI and fluorescence intensity for the control groups (Fig. 5C), although, this association is lost in the sleep deprived groups ($r = -0.06$; $P = 0.74$). (Fig. 5D).

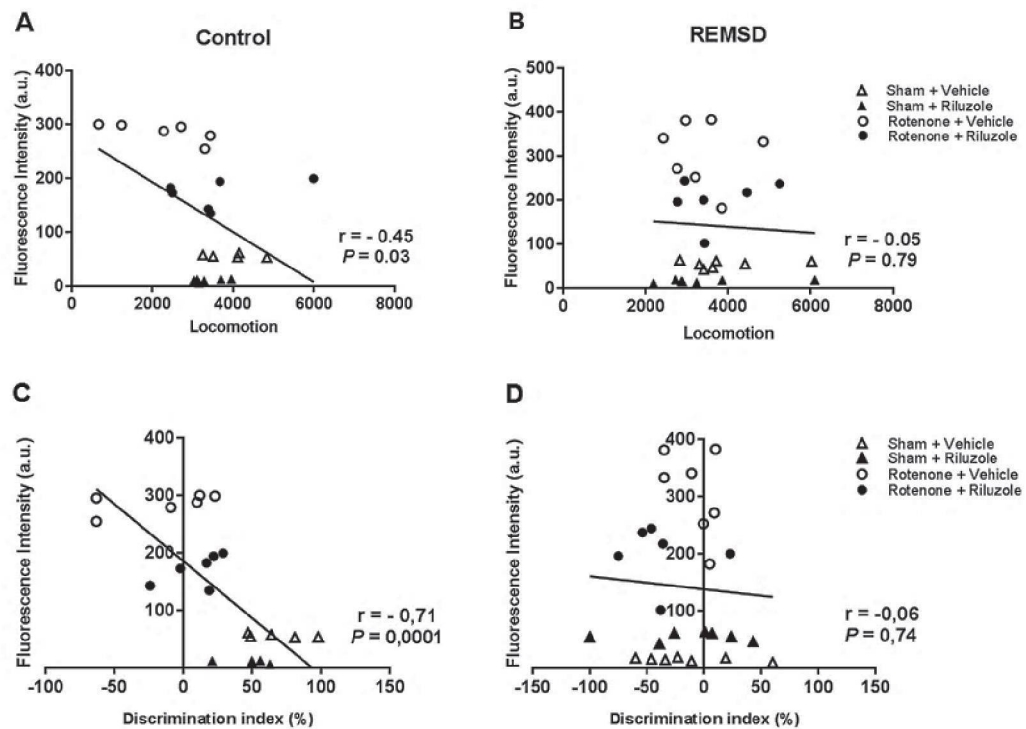


Figure 5. Correlations between behavioral and Fluoro-Jade C (FJC) nigral fluorescence. Pearson's correlations coefficients were calculated considering the following: **(A)** Fluorescence intensity (a.u.) x Locomotion – control groups. **(B)** Fluorescence intensity (a.u.) x Locomotion – REMSD groups. **(C)** Fluorescence intensity (a.u.) x Discrimination index (%) – control groups. **(D)** Fluorescence intensity (a.u.) x Discrimination index (%) – REMSD groups.

DISCUSSION

In the present study we observed that blocking NMDA glutamatergic receptors, within the SNpc, immediately after an acute REMSD challenge, partially protected the dopaminergic neurons from the rotenone lesion and the excitotoxicity purportedly inflicted by PPT increased activity. Such limited protection was also manifested as an absence of memory preservation observed in the rotenone-treated groups. Besides, sleep deprivation generated massive memory impairment in all the groups subjected to this condition, hampering the identification of any possible protective effect of the drug in this context. Nevertheless, we detected an interesting effect of riluzole preserving the locomotor activity of the control rotenone-treated rats. In addition, REMSD counteracted the locomotion deficit induced by the lesion due to

the occurrence of a vastly reported effect of dopaminergic supersensitivity (Tufik *et al.*, 1978; Nunes *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2008).

Riluzole has been consistently demonstrated to provide a multitude of neuroprotective effects in neurodegenerative disorders, such as amyotrophic lateral sclerosis (Verhave *et al.*, 2012). Moreover, analogous effects were reported in studies from animal models of PD induced by neurotoxins as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 6-hydroxydopamine, showing reduction in the dopaminergic neuronal loss, covered by a variety of administration protocols (Carbone, Duty & Rattray, 2012; Araki *et al.*, 2001a; Araki *et al.*, 2001b, Boireau *et al.*, 1994). It is described that the pharmacological mechanism of riluzole is based on the noncompetitive blockade of NMDA receptors, reduction of glutamate release from presynaptic terminals, inhibition of voltage-gated sodium channels and inhibition of protein kinase C, and overall contributing to counteract excitotoxic processes (Doble, 1996; Fumagalli *et al.*, 2008; Carbone, Duty & Rattray, 2012).

Rotenone is a neurotoxin that produces massive inhibition of mitochondrial complex I, increase of reactive oxygen species and selective degeneration of the dopaminergic neurons, reproducing key pathological features of PD (Testa, Sherer & Greenamyre, 2005; Moreira *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017). Evidence suggest that rotenone might induce neuronal damage via excitotoxic mechanisms (Munhall *et al.*, 2012) potentiating NMDA-mediated currents in the dopaminergic neurons (Wu & Jonhson, 2007; Wu & Jonhson, 2011). Similar results were found in human postmortem tissues, indicating that mitochondrial alterations are important in the pathogenesis of sporadic PD (Dawson & Dawson, 2012).

The localization and activity profile of the ionotropic glutamate receptors in the SNpc suggest that these receptors may provide a positive feedback mechanism triggered by PPT activation (Forster *et al.*, 2003; Lima 2013). As a result, a putative reciprocal connectivity between those structures may exert a potential influence on the mechanism of REM sleep (Lima 2013). This raises the intriguing possibility, for which there is currently no evidence, that reducing the glutamatergic drive from the PPT and/or from reticular formation to the dopaminergic cells of the SNpc may have neuroprotective effects and influence the rate of the progression of PD (Lima 2013).

In view of that, we detected a reduction in the FJC labeling in both riluzole-treated groups. However, such neuroprotection was partially achieved because this apoptotic marker (Schmued *et al.*, 2005) had their fluorescence increased compared

to the sham groups. In addition, REMSD did not inflict increased or synergic neuronal death associated to rotenone lesions, as originally expected. One plausible explanation is that the nigrostriatal damage may have been substantially extensive and the REMSD effect on neuronal death could not be observed. In fact, rotenone produces a considerable reduction on the percentage of SNpc tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons (about 60%) (Moreira *et al.*, 2012). Furthermore, it seems to be more potent when compared to other neurotoxins requiring lower doses to produce the lesion (Alam, Mayerhofer & Schmidt, 2004). Thus, additional studies, with lower neurotoxin dosages, will be necessary to completely refute the current hypothesis, hence, we cannot completely exclude the potential deleterious effects of REMSD as demonstrated by other studies (Biswas, Mishra & Mallick, 2006; Khadrawy, Nour & Ezz, 2011; Souza *et al.*, 2012).

Regarding the rotenone-induced hypolocomotion, riluzole rescued this impairment in the control groups. This is in accordance to previous reports that described a positive effect of riluzole in the motor performance in PD animal models (Benazzouz *et al.*, 1995; Barnéoud *et al.*, 1996). However, we did not find locomotion differences between the sham REMSD groups, neither in the rotenone REMSD groups. Probably due to REMSD is able to elicit a locomotion increase, per se, associated to the well-known supersensitivity of dopaminergic receptors (Tufik, Lindsey & Carlini, 1978; Tufik, 1981a; Tufik, 1981b; Dos Santos *et al.*, 2013). Hence, our data suggested an important negative correlation between FJC fluorescence intensity, within the SNpc, and locomotion ($r = -0.45$; $P = 0.03$) for the control groups. That is, the higher was the locomotion the lower was the processes of apoptosis of dopaminergic neurons. Conversely, REMSD was able to disrupt such correlation ($r = -0.05$; $P = 0.79$), as a consequence of its locomotor repercussions.

Concerning the cognition, ORT is a familiarity-based memory task correlated with the human episodic-like memory (Morris, 2001; Dere *et al.*, 2004) which is compromised in early-stages PD patients (Souchay *et al.*, 2006). In light of this, given the correlation between sleep disturbances and cognitive impairments, it is possible to consider that sleep disorders observed in PD patients, might be considered as an early marker for dementia processes (ERRO *et al.*, 2012). Accordingly, our results demonstrated that riluzole did not affect memory processes of control groups and also not rescued the impairment impinged by rotenone, REMSD or their combination. Furthermore, REMSD generated remarkable memory impairment, corroborating with

previous reports (Palchykova *et al.*, 2006; Chen, Tian & Ke, 2014). Such result is opposite to other studies that tested riluzole in different chronic and systemic protocols showing levels of improvement of cognitive performance (Sugiyama *et al.*, 2015; Mokhtari *et al.*, 2017). This discrepancy could be related to our experimental design that projected riluzole administration to a period of high neurotoxic condition, i.e., 24 h after rotenone and immediately after the end of REMSD (challenge to induce PPT activation). Complementarily, decreased FJC labeling within the SNpc was associated with increased cognitive performance ($r = -0.71$; $P = 0.0001$) in controls, but not in REMSD ($r = -0.06$; $P = 0.74$) groups, possibly due to massive memory disruption inflicted by sleep loss. These data indicate improvement of memory performance in the control animals with lower dopaminergic neuronal loss, as an outcome of the excitotoxicity blockade.

In summary, the intranigral administration of riluzole partially protected the dopaminergic neurons from the rotenone-induced lesion, particularly preventing the occurrence of locomotor, but not declarative-like memory deficits. The data also indicate absence of a synergic excitotoxic mechanism triggered by a supposed PPT overactivity towards SNpc, through reciprocal projections. Although, we cannot completely exclude this potential association because more studies will be necessary to identify the levels of glutamatergic PPT activation inflicted by different protocols of REMSD, perhaps in a more gradual and chronic situation, mimicking PD.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by CAPES, FINEP - Edital Pró-Infra 2009 (CT-INFRA) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - Brasil Grants Casadinho/Procad # 552226/2011-4 and Universal # 473861/2012-7 to MMSL. MMSL is a recipient of CNPq fellowship (Grant # 305986/2016-3).

REFERENCES

- Alam, M, A Mayerhofer and WJ Schmidt (2004). The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. *Behavioural Brain Research* 151: 117-124.
- Ambrosi, G, S Cerri and F Blandini (2014). A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurotransmission* 121:849-859.
- Araki, T, Y Muramatsu, K Tanaka, M Matsubara and Y Imai (2001a). Riluzole (2-amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole) attenuates MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in mice. *Neuroscience Letters* 312:50-54.
- Araki, T, T Kumagai, K Tanaka, M Matsubara, H Kato, Y Itoyama *et al* (2001b). Neuroprotective effect of riluzole in MPTP-treated mice. *Brain Research* 918:176-181.
- Barnéoud, P, M Mazadier, JM Miquet, S Parmentier, P Dubédat, A Doble. *et al* (1996). Neuroprotective effects of riluzole on a model of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience* 4:971-983.
- Barraud, Q, V Lambrecq, C Forni, S Mcguire, M Hill, B Bioulac. *et al* (2009). Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. *Exp Neurol* 219:574-582.
- Benazzouz, A, T Boraud, P Dubédat, A Boireau, JM Stutzmann, C Gross (1995). Riluzole prevents MPTP-induced parkinsonism in the resus monkey: a pilot study. *European Journal of Pharmacology* 284:299-307.
- Biswas, S, P Mishra and BN Mallick (2006). Increased apoptosis in rats brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience* 142:315-331.
- Boireau, A, P Dubédat, F Bordier, C Peny, JM Miquet, G Durand, *et al* (1994). Riluzole and experimental parkinsonism: antagonism of MPTP-induced decrease in central dopamine levels in mice. *Neuroreport* 18:2657-2660.
- Breit, S, R Bouali-Benazzouz, AL Benabid, A Benazzouz (2001). Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway induces an increase of neuronal activity of the pedunculopontine nucleus, which is reversed by the lesion of the subthalamic nucleus in rats. *European Journal of Neuroscience* 14:1833-1842.
- Carbone, M, S Duty and M Rattray (2012). Riluzole neuroprotection in a parkinson's disease model involves suppression of reactive astrocytosis but not GLT-1 regulation. *BMC Neuroscience* 13:1-8.
- Chen, L, S Tian and J Ke (2014). Rapid eye movement sleep deprivation disrupts consolidation but not reconsolidation of novel object recognition memory in rats. *Neurosci Lett* 20:12-16.
- Charrara, A, Y Smith and A Parent (1996). Glutamatergic inputs from the pedunculopontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *The journal of Comparative Neurology* 364:254-266.
- Dawson, TM and VL Dawson (2002). Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. *Nature Neuroscience supplement* 5:1058-1061.

- Dere E, MA Silva and JP Huston (2004). Higher order memories for objects encountered in different spatio-temporal contexts in mice: evidence for episodic memory. *Rev Neurosci* 15:231–240.
- Doble, A (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacol. Ther* 81:163-221.
- Dos Santos, ACD, MAV Castro, EAK Jose, AM Delattre, PA Dombrowski, C Da Cunha. *et al* (2013). REM sleep deprivation generates cognitive and neurochemical disruptions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research* 91: 1508-1516.
- Ennaceur, A and J Delacour (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav. Brain Res* 31:47-59.
- Erro, R, G Santangelo, M Picillo, C Vitale, M Amboni, K Longo *et al* (2012). Link between non-motor symptoms and cognitive dysfunctions in de novo, drug-naïve patients. *J Neurol* 259:1808-1813.
- Fumagalli, E, M Funicello, T Rauen, M Gobbi, T Mennini (2008). Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *European Journal of Pharmacology* 578:171-176.
- Khadrawy, YA, NA Nour and HSA Ezz (2011). Effect of oxidative stress induced by paradoxal sleep deprivation on the activities of Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in the cortex and hippocampus of rat. *Translational Research* 157:100-107.
- Jaiswal, MK (2017). Riluzole but not melatonin ameliorates acute motor neuron degeneration and moderately inhibits SOD1-mediated excitotoxicity induced disrupted mitochondrial Ca²⁺ signaling in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci* 10:1-14.
- Lang, AE and AM Lozano (1998). Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine* 339:1044-1053.
- Lavoie, B and A Parent (1994). Pedunculo pontine nucleus in the squirrel monkey: Projections to the basal ganglia as revealed by anterograde tract-tracing methods. *The Journal of Comparative Neurology* 344:210-231.
- Lima, MMS, ML Andersen, AB Reksidler, MABF Vital, S Tufik (2007). The role of the substantia nigra pars compacta in regulating of sleep patterns in rats. *PLOS ONE* 6:1-7.
- Lima, MMS, AB Reksidler and MABF Vital (2008). The dopaminergic dilemma: Sleep or wake? Implications in Parkinson's disease. *Bioscience Hypotheses* 1:9-13.
- Lima, MMS, ML Andersen, AB Reksidler, AC Ferraz, MABF Vital, S Tufik, S (2012). Paradoxical sleep deprivation modulates tyrosine hydroxylase expression in the nigrostriatal pathway and attenuates motor deficits induced by dopaminergic depletion. *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets* 11:359-368.
- Lima, MMS (2013). Sleep disturbances in Parkinson's disease: The contribution of dopamine in REM sleep regulation. *Sleep Medicine Reviews* 17:367-375.
- Luquin, MR, L Saldise, J Guillén, S Belzunegui, W San Sebastián, A Izal, *et al* (2006). Does increase excitatory drive from the subthalamic nucleus contribute to dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease? *Experimental Neurology* 201:407-415.

Mena-Segovia, J, JP Bolam and PJ Magill (2004). Pedunculo-pontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same Family? *TRENDS in Neuroscience* 27:585-588.

Mokhtari, Z, T Baluchnejadmojarad, F Nikbakht, M Mansouri, M Roghani (2017). Riluzole ameliorates learning and memory deficits in A β 25-35-induced rat model of Alzheimer's disease and is independent of cholinergic activation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 87:135-144.

Moreira, CG, D Ariza, PA Dombrowski, P Sabioni, M Bortolanza, C da Cunha, et al (2011). Characterisation of behavioural, neurochemical and histological alterations promoted by bilateral intranigral rotenone administration. *Neuropharmacology* 21: 285-286.

Morris RG (2001). Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:1453–1465.

Munhall, AC, YN Wu, JK Belknap, CK Meshul, SW Johnson (2012). NMDA alters rotenone toxicity in rat substantia nigra zona compacta and ventral tegmental area dopamine neurons. *NeuroToxicology* 33:429-435.

Nunes, GP, S Tufik and JN Nobrega (1994). Autoradiographic analysis of D1 and D2 dopaminergic receptors in rat brain after paradoxical sleep deprivation. *Brain Res. Bull* 34:453-456.

Olney, JW (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721.

Olney, JW (1989). Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 26:505-525.

Palchykova S, R Winsky-Sommerer, P Meerlo, R Du`rr, I Tobler (2006). Sleep deprivation impairs object recognition in mice. *Neurobiol Learn Mem* 85: 263–271.

Paxinos, G and C Watson (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th edition San Diego: Academic Press.

Pierantozzi, M, F Placidi, C Liquori, M Albanese, P Imbriani, MG Marciani, *et al.* (2016). Ritigotine may improve sleep architecture in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled polysomnographic study. *Sleep Med* 21:140-144.

Proença, MB, PA Dombrowski, C Cunha, L Fischer, AC Ferraz and MMS Lima (2014). Dopaminergic D2 receptor is a key player in the substantia nigra par compacta neuronal activation mediated by REM sleep deprivation. *Neuropharmacology* 76:118-126.

Rodrigues, LS, ADS Targa, ACD Nosedá, MF Aurich, LC Cunha and MMS Lima (2014). Olfactory impairment in the rotenone model of Parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:1-11.

Souchay C, M Isingrini and R Gil (2006). Metamemory monitoring and Parkinson's disease. *J Clin Exp Neuropsychol* 28:618–630.

Souza, L, SS Smaili, RP Ureshino, R Sinigaglia-Coimbra, ML Andersen, GS Lopes, *et al* (2012). Effect of chronic sleep restriction and aging on calcium signaling and apoptosis in the hippocampus of young and aged animals. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 39:23-30.

Sugiyama, A, A Saitoh, M Inagaki, O Jun-Ichiro, M Yamada (2015). Systemic administration of riluzole enhances recognition memory and facilitates extinction of fear memory in rats. *Neuropharmacology* 97:322-328.

Schmued, LC, CC Stowers, AC Scallet, L Xu (2005). Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Research* 1: 24-34.

Targa, ADS, LS Rodrigues, ACD Nosedá, M Aurich, ML Andersen, S Tufik, et al. (2016) Unraveling a new circuitry for sleep regulation in Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 108:161-171.

Testa, CM, TB Sherer and JT Greenamyre (2005). Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Molecular Brain Research* 134:109-118.

Tufik S, CJ Lindsey and EA Carlini (1978). Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology* 16:98-105.

Tufik S (1981a). Changes of response to dopaminergic drugs in rats submitted to REM-sleep deprivation. *Psychopharmacology* 72:257–260.

Tufik, S (1981b). Increased responsiveness to apomorphine after REM sleep deprivation: supersensitivity of dopamine receptors or increase in dopamine turnover? *J. Pharm. Pharmacol* 33: 732.

Verhave, PS, MJ Jongasma, RM Van Der Berg, RAP Vanwersch, AB Smit, HCHM Philippens (2012). Neuroprotective effects of riluzole in early phase Parkinson's disease on clinically relevant parameters in the marmoset MPTP model. *Neuropharmacology* 62:1700-1707.

Wu, YN and SW Johnson (2007). Rotenone potentiates NMDA currents in substantia nigra dopamine neurons. *Neuroscience Letters* 421:96-100.

Wu, YN and SW Johnson (2011). Dopamine oxidation facilitates rotenone-dependent potentiation of N-methyl-D-aspartate currents in rat substantia nigra dopamine neurons. *Neuroscience* 195:138-144.

Zhang, ZN, JS Zhang, J Xiang, ZH Yu, W Zhang, M Cai, et al (2017). Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. *Brain Research* 1655:104-113.

Zhang, LY, WY Liu, WY Kang, Q Yang, XY Wang, JQ Ding, et al (2016). Association of rapid eye movement sleep behavior disorder with sleep-disordered breathing in Parkinson's disease. *Sleep Med* 20:110-115.

5 CONCLUSÕES

- O bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na SNpc, imediatamente após 24h de PSREM, parcialmente protegeu a população de neurônios dopaminérgicos expostos a lesão com a neurotoxina rotenona e a mecanismos excitotóxicos.
- Os animais do grupo rotenona controle tratados com riluzol apresentaram melhora no desempenho locomotor quando comparado com seu respectivo veículo. Ainda, uma significativa correlação negativa foi observada entre a intensidade de fluorescência e a locomoção nos grupos controle, indicando um aumento da atividade locomotora nos animais que apresentaram menor intensidade de apoptose na SNpc.
- Os animais submetidos à lesão da via nigroestriatal apresentaram prejuízo de memória, o qual, aparentemente, não foi revertido pelo tratamento com riluzol. Além de que, a PSREM gerou um evidente comprometimento de memória em todos os grupos submetidos a esta condição, dificultando a identificação de qualquer efeito neuroprotetor do riluzol neste contexto.
- Entretanto, foi observada uma forte correlação negativa entre intensidade de fluorescência e o DI, onde os animais dos grupos controle com menor intensidade de morte neuronal apresentaram melhor desempenho cognitivo.
- A aplicabilidade de estratégias neuroprotetoras em um contexto de DP, ainda necessita de melhor compreensão. Entretanto, seu uso pode revelar uma nova perspectiva no tratamento destes pacientes. Impactando na progressão da doença, alívio dos sintomas e consequente melhora da qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, R.; BASAK, I.; PATIL, K. S.; ALVES, G.; LARSEN, J. P.; MOLLER, S. G. Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link. *Experimental Gerontology*, v. 68, p. 33-38, 2015.
- ARUDINE, M.; TYAMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, v. 34, p. 325-337, 2003.
- ATOJI, Y. Expression of ionotropic glutamate receptors, AMPA, Kainite and NMDA, in the pigeon retina. *Experimental Eye Research*, v. 136, p. 72-77, 2015.
- BADIN, R. A.; VADORI, M.; COZZI, E.; HANTRAYE. Translational research for Parkinson's disease: The value of pre-clinical primate models. *European Journal of Pharmacology*, v. 759, p. 118-126, 2015.
- BARRAUD, Q, V LAMBRECQ, C FORNI, S MCGUIRE, M HILL, B BIOULAC. *et al.* Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. *Exp Neurol*, v. 219, p. 574-582, 2009.
- BERDICHEVSKI, E.; RIVEROS, N. SÁNCHEZ-ARMÁSS, S.; ORREGO, F. Kainate N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neuroscience Letters*, v. 36, p. 75-80, 1983.
- BISWAS, S.; MISHRA, P.; MALLICK, B. N. Increased apoptosis in rats brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience*, v. 142, p. 315-331, 2006.
- BJØNARA, K. A.; DIETRICH, E.; TOFT, M. Clinical features associated with sleep disturbances in Parkinson's disease. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 124, p. 37-43, 2014.
- BRAAK, H.; TREDICI, K. D.; RUB, U.; de VOS, R. A. I.; JANSEN STEUR, E. N. H.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, v. 24, p. 197-211, 2003.
- BREIT, S.; BOUALI-BENAZZOZ, R.; BENABID, A. L.; BENAZZOUZ, A. Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway induces an increase of neuronal activity of the pedunculopontine nucleus, which is reversed by the lesion of the subthalamic nucleus in rats. *European Journal of Neuroscience*, v. 14, p. 1833-1842, 2001.
- CARRILLO-MORA, P.; SILVA-ADAYA, D.; SEÑOR-AGUAYO, K. V. Glutamate in Parkinson's disease: Role of antihypertensive drugs. *Basal Ganglia*, v. 3, p. 147-157, 2013.
- CARVALHO, G. A.; NIKKHAH, G. Subthalamic nucleus lesions are neuroprotective against terminal 6-OHDA-induced striatal lesions and restore postural balancing reactions. *Experimental Neurology*, v. 171, p. 405-417, 2001.
- COPANI, A.; CANONICO, P. L.; NICOLETTI, F. β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a potent agonist of metabotropic glutamate receptors. *Eur. J. Pharmacol*, v. 181, p. 327-328, 1990.
- COSTA, A.; CARLESIMO, G. A.; CALTAGIRONE, C.; MAZZONE, P.; PIERANTOZZI, M.; STEFANI, A.; PEPPE, A. Effects of deep brain stimulation of the pedunculopontine area on

working memory tasks in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 16, p. 64-67, 2010.

CUBO, E.; DOUMBE. J.; NJIENGWE. E.; ONANA, P.; GAROÑA, R.; ALCALDE, J, *et al.* A Parkinson's disease tele-education program for health care providers in Cameroon. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 357, p. 285-287, 2015.

CHAHINE, L. M.; AMARA, A. W.; VIDENOVIC. A systematic review of the literature on disorders of sleep and wakefulness in Parkinson's disease from 2005 to 2015. **Sleep Medicine Reviews**, p. 1-18, 2016.

CHARRARA, A.; SMITH, Y.; PARENT, A. Glutamatergic inputs from the pedunculo-pontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. **The journal of Comparative Neurology**, v. 364, p. 254-266, 1996.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **Lancet**, v. 8, p. 464-472, 2009.

CHAUDHURI, K. R.; PRIETO-JURCYNANSKA, C.; NAIDU, Y.; MITRA, T.; FRADES-PAYO, B.; TLUK, S.; RUESSMANN, A. *et al.* The nondeclaration of nonmotor symptoms of Parkinson's disease to health care professionals: an international study using the non-motor symptoms questionnaire. **Mov Disord**, v. 25, p. 704-709, 2010.

CHEN, T. Z.; XU, G. J.; ZHOU, G. A.; WANG, J. R.; CHAN, P.; DU, Y. F. Postural sway in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: A potential marker of prodromal Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1559, p. 26-32, 2014.

CHIU, A. S.; GEHRINGER, M. M.; WELCH, J. H.; NEILAN, B. A. Does α -amino- β -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 8, p. 3728-3746, 2011.

CHOI, D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **The Journal of Neuroscience**, v. 7, p. 369-379, 1987.

CLAUDE, M. W.; ZHANG, J. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. **Experimental Neurology**, v. 220, p. 230-233, 2009.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. **Nature Neuroscience supplement**, v. 5 p. 1058-1061, 2002.

DOBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. **Pharmacol. Ther**, v. 81, p. 163-221, 1999.

ENNACEUR, A., MICHALIKOVA, S., BRADFORD, A., AHMED, S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. **Behav. Brain Res.**, v. 159, p. 247-266, 2005.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. **Behav. Brain Res.**, v. 31, p. 47-59, 1988.

ERRO, R.; SANTANGELO, G.; PICILLO, M.; VITALE, C.; AMBONI, M.; LONGO, K. et al. Link between non-motor symptoms and cognitive dysfunctions in de novo, drug-naïve patients. **J Neurol**, v. 259, p. 1808-1813, 2012.

HENCHCLIFFE, C.; BEAL, M, F. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson's disease pathogenesis. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 4, p. 600-609, 2008.

FAROOQUI, A. A.; ONG, W.I.; HARROCKS, L.A. **Neurochemical aspects of extotoxicity**. New York: Springer, 2008.

FORSTER, G. L.; BLAHA, C. D. Pedunculo pontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 751-762, 2003.

FORSTER, E. R.; McDANIEL, M. A.; RENDELL, P. G. Improving prospective memory in persons with Parkinson's disease: A randomized controlled trial. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, p. 1-11, 2017.

JELLINGER, K. A. Interaction between pathogenic proteins in neurodegenerative disorders. **J. Cell. Mol. Med**, v. 16, p. 1166- 1183, 2012.

KEELER, J. F.; PRETSELL, D. O.; ROBBINS, T. W. Functional implications of dopamine D1 vs D2 receptors: A "prepare and select" model of the striatal direct vs indirect pathways. **Neuroscience**, v. 282, p. 156-175, 2014.

KHADRAWY, Y. A.; NOUR, N. A.; EZZ, H. S. A. Effect of oxidative stress induced by paradoxal sleep deprivation on the activities of Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in the cortex and hippocampus of rat. **Translational Research**, v. 157, p. 100-107, 2011.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. *Berne e Levy Fisiologia*. Elsevier, São Paulo, 2009.

KOJIMA, J.; YAMAJI, Y.; MATSUMARA, M.; NAMBU, A.; INASE, M.; TOKUNO, H. et al. Excitotoxic lesions of the pedunculo pontine tegmental nucleus produce contralateral hemiparkinsonism in the monkey. **Neuroscience Letters**, v. 226, p. 111-114, 1997.

KREUTZMANN, J. C.; HAVEKES, R.; ABEL, T.; MEERLO, P. Sleep deprivation and hippocampal vulnerability: changes in neuronal plasticity, neurogenesis and cognitive function. **Neuroscience** (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.053>.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 1044-1053, 1998.

LANGE, K. W.; KORNUBER, J.; RIEDERER, P. Dopamine/glutamate interactions in Parkinson's disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, p. 393-400, 1997.

LAPIDUS, K. A. B.; SOLEIMANI, L.; MURROUGH, J. W.; Novel glutamatergic drugs for the treatment of mood disorders. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 9, p. 1101-1112, 2013.

LAVOIE, B.; PARENT, A. Pedunculo pontine nucleus in the squirrel monkey: Projections to the basal ganglia as revealed by anterograde tract-tracing methods. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 344, p. 210-231, 1994.

LESS, A.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, p. 2055-66, 2009.

LIMA, M. M. S. Sleep disturbances in Parkinson's disease: The contribution of dopamine in REM sleep regulation. **Sleep Medicine Reviews**, v. 17, p. 367-375, 2013.

LIMA, M. M. S.; ANDERSEN, M. L.; REKSIDLER, A. B.; FERRAZ, A. C.; VITAL, M. A. B. F.; TUFIK, S. Paradoxical sleep deprivation modulates tyrosine hydroxylase expression in the nigrostriatal pathway and attenuates motor deficits induced by dopaminergic depletion. **CNS & Neurological Disorders – Drug Targets**, v. 11, p. 359-368, 2012b.

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 of sleep patterns in rats. **PLOS ONE**, v. 6, p. 1-7, 2007.

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

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

LUCAS, R.D.; NEWHOUSE, J.P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **AMA Arch. Ophthalmol**, v. 58, p. 193-201, 1957.

LUQUIN, M. R.; SALDISE, L.; GUILLÉN, J.; BELZUNEGUI, S.; SAN SEBASTIÁN, W.; IZAL, A. *et al.* Does increase excitatory drive from the subthalamic nucleus contribute to dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease? **Experimental Neurology**, v. 201, p. 407-415, 2006.

LUO, J.; KAPLITT, M. G.; FITZSIMONS, H. L.; ZUZGA, D. S.; LIU, Y.; OSHINSKY, M. *et al.* Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. **Science**, v. 298, p. 425-429, 2002.

MAESAWA, S.; KANEOKE, Y.; KAJITA, Y.; USUI, N.; MISAWA, N.; NAKAYAMA, A. *et al.* Long term stimulation of the subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats: neuroprotection of dopaminergic neurons. **J Neurosurg**, v. 100, p. 679-687, 2004.

MARTINEZ-VARGAS, M.; ROJO, F. E.; TABLA-RAMON, E.; NAVARRO-ARGUELLES, H.; ORTIZ-LAIZON, N. *et al.* Sleep deprivation has a neuroprotective role in traumatic brain injury of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 529, p. 118-122, 2012.

MEHTA, A.; PRABHAKAR, M.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R.; SHARMA, P. L. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, p. 6-18, 2013.

MENA-SEGOVIA, J.; BOLAM, J. P.; MAGILL, P. J. Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same Family? **TRENDS in Neuroscience**, v. 27, p. 585-588, 2004.

MEREDITH, G. E.; HALLIDAY, G. M.; TOTTERDELL, S. A critical review of the development and importance of proteinaceous aggregates in animal models of Parkinson's disease: new insights into Lewy Body formation. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 10, p. 191-202, 2004.

- MEREDITH, G. E.; TOTTERDELL, S.; BEALES, M.; MESHUL, C. K. Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 219, p. 334-340, 2009.
- MOHAMMED, H. S.; EZZ, H. S. A.; KHADRAWY, Y. A.; NORR, N. A. Neurochemical and electrophysiological changes induced by paradoxical sleep deprivation in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 225, p. 39-46, 2011.
- MONTI, J. M.; MONTI, D. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking. **Sleep Medicine Reviews**, v. 11, p. 113-133, 2007.
- MUZERENGI, S.; CONTRAFATTO, D.; CHAUDHURI, K. R. Non-motor symptoms: Identification and management. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 13, p. 450-456, 2007.
- NEIKRUG, A. B.; AVANZINO, J. A.; LIU, L.; MAGLIONE, J. E.; NATARAJAN, L.; COREY-BLOOM, J. *et al.* Parkinson's disease and REM sleep behavior disorder result in increased non-motor symptoms. **Sleep Medicine**, v. 15, p. 959-966, 2014.
- NOLDEN, L. F.; TARTAVOULLE, T.; PORCHE, D. J. Parkinson's Disease: Assessment, Diagnosis and Management. **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 10, p. 500-506, 2014.
- NOVATI, A.; HULSHOF, H. J.; GRANIC, I.; MEERLO, P. Chronic partial sleep deprivation reduces brain sensitivity to glutamate N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. **J. Sleep Res**, v. 21, p. 3-9, 2012.
- NUNES G, P, TUFIK S, NOBREGA J. N. Autoradiographic analysis of D1 and D2 dopaminergic receptors in rat brain after paradoxical sleep deprivation. **Brain Res Bull**, v. 34, p. 453-456, 1994.
- OBESO, J. A.; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M.; ARBIZU, J.; GIMÉNEZ-AMAYA, J. M. The basal ganglia and disorders of movement: Pathophysiological mechanisms. **News Physiol Sci**, v. 17, p. 51-55, 2002.
- OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, p. 719-721, 1969.
- OLNEY, J.W. Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. **Biol Psychiatry**, v. 26, p. 505-525, 1989.
- OLNEY, J.W.; PRICE, M.T.; SAMSON, L.; LABRUYERE, J. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, v. 65, p. 65-71, 1986.
- PAYNE, J. D. Learning, memory and sleep in humans. **Sleep Med Clin**, v. 6, p. 15-30, 2011.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 5th edition San Diego: Academic Press, 2005.
- POSTUMA, R. B.; GAGNON, J. F.; MONTEPLAISIR, J. Y. REM sleep disorder behavior disorder and prodromal neurodegeneration- Where are we headed? **Tremor and Other Hyperkinetic Movements**, v. 3, p. 1-4, 2013.
- POSTUMA, R. B.; GAGNON, J. F.; VENDETTE, M.; MONTEPLAISIR, J. Y. Markers of neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder and Parkinson's disease. **Brain**, v. 132, p. 3298-3307, 2009.

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

PROENÇA, M. B.; DOMBROWSKI, P. A.; CUNHA, C.; FISCHER, L.; FERRAZ, A. C.; LIMA, M. M. S. Dopaminergic D2 receptor is a key player in the substantia nigra par compacta neuronal activation mediated by REM sleep deprivation. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 118-126, 2014.

RODRIGUES, L. S.; TARGA, A. D. S.; NOSEDA, A. C. D.; AURICH, M. F.; CUNHA, L. C.; LIMA, M. M. S. Olfactory impairment in the rotenone model of Parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 1-11, 2014.

RUEDA, C. B.; LLORENTE-FOLCH, I.; TRABA, J.; AMIGO, I.; GONZÁLEZ-SANCHEZ, P.; CONTRERAS, L. *et al.* Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺ regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters (CaMCs). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1857, p. 1158-1166, 2016.

SCAMMELL, T. E.; ARRIGONI, E.; LIPTON, J. O. Neural circuitry of wakefulness and sleep. **Neuron**, v. 93, p. 747-765, 2017.

SOUZA, L.; SMAILI, S. S.; URESHINO, R. P.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; ANDERSEN, M. L.; LOPES, G. S. *et al.* Effect of chronic sleep restriction and aging on calcium signaling and apoptosis in the hippocampus of young and aged animals. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v. 39, p. 23-30, 2012.

TAN, S. M.; WAN, Y. M. Pramiprexole in the treatment of REM sleep behavior disorder: A critical review. **Psychiatry Research**, v. 243, p. 365-372, 2016.

TARGA, A. D. S.; RODRIGUES, L. S.; NOSEDA, A. C. D.; AURICH, M.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. *et al.* Unraveling a new circuitry for sleep regulation in Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 108, p. 161-171, 2016.

TIROSH, O.; SEN, C. K.; ROY, S.; PACKER, L. Cellular and mitochondrial changes in glutamate-induced HT4 neuronal cell death. **Neuroscience**, v. 97, p. 531-541, 2000.

TODOROVA, A.; JENNER, P.; CHAUDHURI, K. R. Non-motor Parkinson's: integral to motor Parkinson's, yet often neglected. **Pract Neurol**, v. 14, p. 310-322, 2014.

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.

TUFIK S. Changes of response to dopaminergic drugs in rats submitted to REM-sleep deprivation. **Psychopharmacology**, v. 72, p. 257-260, 1981a.

TUFIK, S. Increased responsiveness to apomorphine after REM sleep deprivation: supersensitivity of dopamine receptors or increase in dopamine turnover? **J. Pharm. Pharmacol**, v. 33, p. 732, 1981b.

TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L.; BITTENCOURT, L. R. A.; MELLO, M. T. Paradoxal sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. **An Acad Bras Cien**, v. 81, p. 521-538, 2009.

VAN LAAR, V. S.; ROY, N.; LIU, A.; RAJPROHAT, S.; ARNOLD, B.; DUKES, A. A. Glutamate excitotoxicity in neurons triggers mitochondrial and endoplasmic reticulum accumulation of Parkin, and, in the presence of N-acetyl cysteine, mitophagy. **Neurobiology of Disease**, v. 74, p. 180-193, 2015.

VERHAVE, P. S.; JONGSMA, M. J.; VAN DER BERG, R. M.; VANWERSCH, R. A. P.; SMIT, A. B.; PHILIPPENS, H. C. H. M. Neuroprotective effects of riluzole in early phase Parkinson's disease on clinically relevant parameters in the marmoset MPTP model. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 1700-1707, 2012.

WU, Y.; SATKUNENDRARAJAH, K.; TENG, Y.; CHOW, D. S. L.; BUTTIGIEG, J.; FEHLINGS, M. G.; Delayed post-injury administration of riluzole is neuroprotective in a preclinical rodent model of cervical spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 30, p. 441-452, 2013.

ZWEIG, R. M.; DISBROW, E. A.; JAVALKAR, V. Cognitive and psychiatric disturbances in Parkinsonism syndromes. **Neurol Clin**, v. 34, p. 235-246, 2016.

ZORUMSKI, C. F.; OLNEY, J. W. Excitotoxic neuronal damage and neuropsychiatric disorders. **Pharmac. Ther**, v. 59, p. 145-162, 1993.