

Felipe Azevedo Gomes

HOMEOSTASE GLICÊMICA E LIPÍDICA EM MODELO
DE PARKISONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA EM
RATOS

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Alex
Rafacho

Coorientador: Prof. Dr. Rui
Daniel Schroder Prediger

Florianópolis, 2018

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

Gomes, Felipe Azevedo
HOMEOSTASE GLICÊMICA E LIPÍDICA EM MODELO DE
PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA EM RATOS / Felipe
Azevedo Gomes ; orientador, Alex Rafacho,
coorientador, Rui Daniel Schroder Prediger, 2018.
89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Doença de Parkinson. 3. 6
OHDA. 4. Prejuízos metabólicos. 5. Glicose. I.
Rafacho, Alex. II. Prediger, Rui Daniel Schroder.
III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

"Homeostase glicêmica e lipídica em modelo de parkinsonismo induzido por 6-OHDA em ratos"

Por

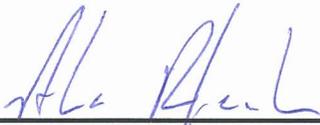
Felipe Azevedo Gomes

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (017/2018/PPGFMC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.

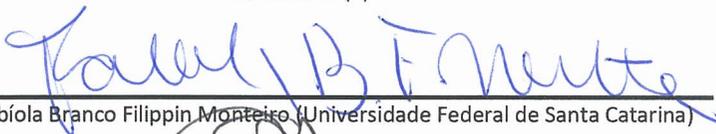


Prof.(a) Dr.(a) Rui Daniel Schröder Prediger
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr.(a) Alex Rafacho (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Fabíola Branco Filippin Monteiro (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Geison de Souza Izídio (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 17 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Alex Rafacho, por todos os ensinamentos e motivações. Pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua dedicada orientação. Por todo tempo investido em reuniões, conversas e seminários sempre pensando na minha formação e pela amizade durante esses dois anos de muito aprendizado.

Ao meu coorientador, professor Dr. Rui Prediger, pela colaboração e aprendizagem.

Aos meus amados e queridos pais, Claudio e Lucinéia, ao meu grande amigo e irmão, Rafael, por todo amor, carinho, confiança, por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Ao meu namorado, Henrique, pelo amor, companheirismo e por todo suporte em mais um de tantos obstáculos que enfrentamos juntos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Amanda, Cinthia, Guilherme, Flavia, Francielle, Henver, Natália, Priscila, Thayz e em especial Maciel e Rafael, por toda ajuda e ensinamentos ao longo desses dois anos.

Aos meus queridos amigos e segunda família, Beatriz, Gabriela, Guilherme, Jefferson, Maria Lidia e Raiane, por todos os conselhos e momentos partilhados.

Ao Sr. Dorival José Rafacho pela construção dos aparatos (rotarod e campo aberto) para realização dos testes motores.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram para minha formação científica.

Aos funcionários do LAMEB que me auxiliaram e colaboraram durante a execução deste trabalho.

A todos os professores e cientistas que de alguma maneira colaboraram na execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, que me acolheu em mais uma importante etapa.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo suporte financeiro e a concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Há uma associação entre doenças metabólicas e doenças neurodegenerativas. Nesse sentido, tem sido demonstrado que pacientes com *diabetes mellitus* do tipo 2 apresentam maiores riscos de desenvolver doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA). Por outro lado, também há evidências de que pacientes portadores de DA apresentam alteração no metabolismo. No entanto, não há estudos associando a possível relação entre a doença de Parkinson (PD) e alterações no metabolismo. Considerando que há relação entre DA e desfechos metabólicos e que a PD é um tipo de doença neurodegenerativa, este trabalho visa avaliar possíveis alterações na homeostase metabólica decorrentes de alterações neurológicas semelhantes às aquelas caracterizadas na PD. Para tal, reproduzimos um modelo de prejuízo motor induzido pela administração bilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no estriado dorso lateral em ratos jovens e avaliamos desfechos motores e metabólicos 7, 21 e 35 dias após a inoculação da toxina. Além disso, no 32º dia do protocolo experimental, foi iniciado o tratamento com dexametasona (i.p.) com o intuito de desafiar o metabolismo e revelar possíveis vulnerabilidades metabólicas, haja vista a ação diabetogênica dos glicocorticoides. Os animais 6-OHDA e 6-OHDA+Dexa apresentaram prejuízo na locomoção espontânea e no comportamento exploratório, quando comparados ao grupo Controle, 7 dias após a administração da neurotoxina. Foi possível observar que a 6-OHDA foi capaz de manter o prejuízo motor, 35 dias após a cirurgia estereotáxica. Também foi observado que administração bilateral de 6-OHDA foi capaz de promover prejuízo na coordenação motora dos animais 6-OHDA e 6-OHDA+Dexa no 7º, 21º e 35º dia do protocolo experimental, quando comparados aos animais Controle. Os grupos Dexa e 6-OHDA+Dexa apresentaram redução no ganho de massa corporal, mesmo com uma semelhante ingestão calórica, quando comparados aos demais grupos experimentais, Controle e 6-OHDA, os quais apresentaram ganho de peso contínuo ao longo do tratamento. Os ratos Dexa e 6-OHDA+Dexa apresentaram normoglicemia associada à hipertriacilgliceridemia, aumento no conteúdo de glicogênio e triacilglicerol hepático, redução da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina. Em contrapartida, o grupo 6-OHDA, não apresentou diferenças nesses parâmetros, quando comparado ao grupo Controle. Deste modo, concluímos que a lesão bilateral no estriado dorsolateral com 6-OHDA causa prejuízos motores persistentes e não exacerba qualquer efeito adverso causado pelo excesso

de GC no metabolismo glicêmico e lipídico. Com isso, é possível afirmar que, ao menos nesse modelo, as alterações centrais não promovem alterações periféricas metabólicas.

Palavras chave: Parkinson, metabolismo, dexametasona.

ABSTRACT

There is a real combination between metabolic diseases and neurodegenerative diseases. Therefore, it has been shown that patients with type 2 diabetes mellitus are at greater risk of developing neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD). On the other hand, there is also evidence that patients with Alzheimer's disease have altered metabolism. However, no studies are associating possible causality between Parkinson's disease (PD) and changes in metabolism. Considering that, there is a relationship between AD and metabolic outcomes and that PD is a type of neurodegenerative disease, this study aims to evaluate possible changes in metabolic homeostasis due to neurological changes like those characterized in PD. To do so, we reproduced a model of motor impairment induced by the bilateral administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in the lateral dorsal striatum in young rats and assessed motor and metabolic outcomes 7, 21 or 35 days after inoculation of the toxin. Also, on the 32nd day of the experimental protocol dexamethasone (i.p.) treatment was started to challenge the metabolism and reveal possible metabolic vulnerabilities, due to the diabetogenic action of glucocorticoids. The 6-OHDA and 6-OHDA+Dexa animals showed a reduction in spontaneous locomotion and exploratory behavior when compared to the control group 7 days after neurotoxin administration. It was observed that 6-OHDA was able to maintain motor impairment 35 days after stereotactic surgery. It was also observed that bilateral administration of 6-OHDA was able to promote impairment in the motor coordination of 6-OHDA and 6-OHDA+Dexa animals on the 7th, 21st and 35th day of the experimental protocol, when compared to control animals. The groups Dexa and 6-OHDA+Dexa showed a reduction in body weight gain, even with similar caloric intake, when compared to the other experimental groups, Control and 6-OHDA, which presented continuous weight gain throughout the treatment. Dexa and 6-OHDA + Dexa rats showed a normoglycemia associated with hypertriacylglyceridemia, increased glycogen content and hepatic triacylglycerol and reduced glucose tolerance and insulin sensitivity. In contrast, the 6-OHDA group showed no differences in these parameters when compared to the Control group. Thus, we conclude that bilateral lesion in the dorsolateral striatum with 6-OHDA causes persistent motor deficits and does not exacerbate any adverse effects caused by excess GC in glycemic and lipid metabolism. Thus, it is possible to state that, using

this model, the central alterations do not cause metabolic peripheral alterations

Keywords: Parkinson, metabolism, dexamethasone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da 6-hidroxidopamina sobre neurônios dopaminérgicos.	25
Figura 2. Efeitos adversos dos glicocorticoides em tecidos periféricos envolvidos no controle da homeostase glicêmica.	28
Figura 3. Delineamento experimental.	34
Figura 4. Imagem da arena onde foi realizado o teste Campo aberto. .	36
Figura 5. Imagem do rotarod utilizado para realização dos testes motores.	37
Figura 6. Imagem ilustrativa da marcação do perímetro do tecido pancreático e das ilhotas pancreáticas.	41
Figura 7. Porcentagem de animais responsivos ao protocolo de avaliação motora basal.	43
Figura 8. Efeito da injeção de 6-OHDA, no 7º dia do protocolo experimental, em parâmetros motores de ratos avaliados no teste do campo aberto.	44
Figura 9. Efeito da injeção de 6-OHDA, no 35º dia do protocolo experimental, em parâmetros motores de ratos avaliados no teste do campo aberto.	45
Figura 10. Efeito da injeção de 6-OHDA, no 7º dia do protocolo experimental, em parâmetro motor de ratos avaliado no rotarod.	46
Figura 11. Efeito da injeção de 6-OHDA, no 21º dia do protocolo experimental, em parâmetro motor de ratos avaliado no rotarod.	47
Figura 12. Efeito da injeção de 6-OHDA, no 35º dia do protocolo experimental, em parâmetro motor de ratos avaliado no teste rotarod.	48
Figura 13. Peso corpóreo e ingestão alimentar ao longo de 11 semanas. primeiras semanas.	49
Figura 14. Valores de glicemia durante o teste intraperitoneal de tolerância à glicose e à insulina no 7º e 8º dia do protocolo experimental, respectivamente.	51
Figura 15. Valores de glicemia durante o teste intraperitoneal de tolerância à glicose e à insulina no 22º e 23º dia do protocolo experimental, respectivamente.	52
Figura 16. Valores de glicemia durante o teste intraperitoneal de tolerância à glicose e à insulina no 36º e 37º dia do protocolo experimental, respectivamente.	53
Figura 17. Parâmetros circulantes.	54

Figura 18. Parâmetros hepáticos.	55
Figura 19. Imagens representativas do fígado nos grupos experimentais Controle, Dexa, 6-OHDA e 6-OHDA+dexa.	56
Figura 20. Acúmulo de triacilglicerol e glicogênio hepáticos nos 4 grupos experimentais analisados.....	57
Figura 21. Massa relativa dos órgãos coletados.....	58
Figura 22. Massa de pâncreas endócrino.	59
Figura 23. Imagens representativas do pâncreas nos grupos experimentais Controle, Dexa, 6-OHDA e 6-OHDA+dexa.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA - 6-hidroxidopamina

6-OHDA+dexa – 6-hidroxidopamina + dexametasona

AD - Alzheimer's disease

AGL – Ácidos Graxos Livres

AKT - Proteína cinase B

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CTL – Controle

DA - Doença de Alzheimer

DAT - Transportador de dopamina;

DEXA – Dexametasona

DM – Diabetes mellitus

DM2 – Diabetes mellitus do tipo 2

DP – Desvio padrão

EDL – Estriado dorsolateral

EPM – Erro padrão da média

ERO – Espécies reativas de oxigênio

G6P - Glicose-6-fosfato

G6Pase - Glicose-6-fosfatase

GCs – Glicocorticoides

GLUT-4 - Transportador de glicose tipo 4

GR – Receptor de glicocorticoide

GS - Glicogênio sintase

GSK-3 - Cinase da glicogênio sintase

GTT – Teste de tolerância à glicose

IKK β - Cinase do I κ B

IRS - Substrato do receptor de insulina

ITT – Teste de tolerância à insulina

JNK - Cinase c-jun N-terminal

LC - Locus coeruleus

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

PD - Parkinson's disease/Doença de Parkinson

PDK-1 - Proteína cinase dependente de inositol 1

PEPCK - Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase

PFA – paraformaldeído

PI - Fosfoinositol

PI(3,4,5)P₃ - Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato

Pi3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA - proteína cinase A

PKB - Proteína cinase B

PKC - proteína cinase C

RI – Resistência à insulina

VMAT - Transportador de monoaminas vesicular

SUMÁRIO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON EM HUMANOS	17
1.2. HOMEOSTASE GLICÊMICA E LIPÍDICA NO CONTEXTO SAUDÁVEL E NAS DOENÇAS METABÓLICAS.....	19
1.4. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS E METABÓLICAS: UMA RELAÇÃO DE DUAS VIAS?	22
1.5. MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO	23
1.6. GLICOCORTICÓIDES COMO FERRAMENTA FARMACOLÓGICA PARA DESAFIO METABÓLICO	26
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. ANIMAIS.....	33
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E GRUPOS EXPERIMENTAIS	33
4.2.1. Grupos experimentais antes do tratamento com dexametasona:.....	34
4.2.2. Grupos experimentais tratados com dexametasona	34
4.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	34
4.4 TRATAMENTO COM DEXAMETASONA.....	35
4.5 PARÂMETROS MOTORES.....	35
4.5.1. Campo aberto.....	35
4.5.2. Rotarod.....	36
4.6 PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS E METABÓLICOS....	37
4.6.1 Massa corporal.....	37
4.6.2 Consumo de ração.....	38

4.6.3. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipgtt):	38
4.6.4. Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipitt):	38
4.6.5. Eutanásia, perfusão e coleta de órgãos	39
4.6.6. Glicogênio hepático	39
4.6.7 Gordura hepática.....	40
4.7. PARÂMETROS HISTOLÓGICOS.....	40
4.7.1. Morfologia hepática:.....	40
4.7.2. Massa relativa de pâncreas endócrino	40
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS:	41
5. RESULTADOS.....	43
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO 6-OHDA	43
5.1.1. Animais responsivos ao rotarod.....	43
5.2. PARÂMETROS MOTORES.....	43
5.2.1. Campo aberto.....	43
5.2.2. Rotarod	45
5.3. PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS E METABÓLICOS... ..	49
5.3.1. Peso corpóreo e ingestão alimentar	49
5.3.2. Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina	50
5.3.3 parâmetros circulantes	53
5.3.4 parâmetros hepáticos	54
5.3.5. Adiposidade e órgão metabólicos	57
5.3.6 Massa de pâncreas endócrino	58
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	67
8. PERSPECTIVAS.....	67
9. DESAFIOS ENCONTRADOS.....	67
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON EM HUMANOS

A primeira descrição da Doença de Parkinson (PD) foi realizada por James Parkinson no início do século XIX (PEARCE, 1989). Ela é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo, afetando 1% da população mundial acima dos 60 anos (SCHAPIRA, 2009), sendo 2 vezes mais comum nos homens (VAN DEN EEDEN, 2003). A taxa de mortalidade dos pacientes portadores da PD não difere dos indivíduos não parkinsonianos nos 10 primeiros anos pós-diagnóstico, mas ela aumenta drasticamente após esse período (PINTER *et al.*, 2015). Nos últimos anos os avanços alcançados nos serviços de saúde têm propiciado um aumento da sobrevida dos pacientes parkinsonianos (LIX *et al.*, 2010). Sendo assim, é esperado que o número de pessoas com PD duplique entre os anos de 2005 e 2030 (DORSEY *et al.*, 2007).

A doença é caracterizada pela perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN) que resulta em perda gradual das funções motoras, além de causar problemas neurológicos não motores como disfunção olfatória, manifestações neuropsiquiátricas, distúrbios do sono, disfunções autonômicas, hipotensão postural, prejuízos cognitivos, entre outros (STERN, LANG & POEWE, 2012). No estágio inicial, a perda de neurônios dopaminérgicos é restrita à substância negra ventrolateral, com relativa preservação de agrupamentos neuronais dopaminérgicos do mesencéfalo, porém, a morte neuronal se difunde nos estágios mais avançados (FEARNLEY, LEES, 1991). No entanto, é enganoso reduzir a PD a uma doença exclusiva da SN. De fato, tem sido repetidamente demonstrado, nos últimos 60 anos, que as células noradrenérgicas do locus coeruleus (LC) também degeneram na doença (GREENFIELD, BOSANQUET, 1953; EHRINGER, HORNYKIEWICZ, 1960; GERMAN *et al.*, 1992; BERTRAND *et al.*, 1997; TOHGI *et al.*, 1997; EHRINGER, HORNYKIEWICZ, 1998).

O diagnóstico da PD se dá por meio da presença dos sinais motores cardinais: rigidez, tremor e perda do reflexo postural, sendo necessário o indivíduo apresentar bradicinesia (lentidão dos movimentos) associada a um dos problemas motores mencionados (BEAL, 2005; RIEDERER, WUKETICH, 1976). Neste contexto os pacientes

apresentam aproximadamente apenas 40% dos neurônios dopaminérgicos intactos e a presença de dopamina no estriado se restringe a aproximadamente 20-30% da condição pré-doença (RIEDERER, WUKETICH, 1976).

Ainda não se conhece a causa primária da doença, porém estudos epidemiológicos a associam com diversos fatores de risco como o envelhecimento, fatores genéticos e ambientais (e.g. pesticidas, herbicidas, bifenilos policlorados – PCBs, cobre, tricloroetileno), vírus (e.g. Herpes Simplex – HSV-I, Influenzavírus A) e hábitos alimentares inadequados (e.g. baixo consumo de vitaminas, alta ingestão calórica) (MARTTILA *et al.*, 1977; MARTTILA, RINNE, 1978; ELIZAN *et al.*, 1979; GORELL *et al.*, 1997, 1999; JOHNSON *et al.*, 1999; MATTSON, 2003; LAU, BRETILER, 2006; STEENLAND *et al.*, 2006; GOLDMAN, 2010, 2011). Evidências sugerem que a inflamação possui uma ação importante na patogênese e sintomatologia da PD. Vários fatores como a deposição e aglomeração acentuada de α -sinucleína, aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e a incidência de eventos neuroinflamatórios parecem responder pela morte progressiva dos neurônios na substância negra, os quais são acompanhados pelo aumento da expressão de citocinas inflamatórias (MCGEER *et al.*, 1988; DAUER, PRZEDBORSKI, 2003; GAO *et al.*, 2003; HUNOT, HIRSCH, 2003; OLANOW *et al.*, 2003; MCGEER, MCGEER, 2004; MARCHETTI, ABBRACCHIO, 2005; MARCHETTI, 2005; MARCHETTI, SERRA & L'EPISCOPO, 2005; JENNER, 2007; KLEGERIS *et al.*, 2007; MCGEER, MCGEER, 2008; TANSEY *et al.*, 2007; HIRSCH, HUNOT, 2009).

Uma das alterações neuropatológicas que merece destaque nesses pacientes é a deposição anormal de α -sinucleína no citoplasma de certos neurônios em várias regiões cerebrais, promovendo a formação de um agregado proteico, denominado corpos de Lewy (BRAAK *et al.*, 2003; DAUER, PRZEDBORSKI, 2003). Os corpos de Lewy aparecem, inicialmente, em neurônios colinérgicos e monoaminérgicos do tronco cerebral e em neurônios do sistema olfatório, mas também são encontrados em regiões límbicas e neocorticais conforme a progressão da doença (BRAAK *et al.*, 2003). Portanto, há, também, perda de neurônios colinérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos, responsáveis pelo aparecimento de sintomas não motores como problemas olfatórios, de

memória, no sono, ansiedade, depressão e distúrbios digestivos (CHAUDHURI, 2006).

Vários estudos sugerem que o comprometimento do sistema de degradação da α -sinucleína pode estar relacionado ao seu acúmulo. De fato, indivíduos idosos apresentam redução das funções do sistema ubiquitina-proteassoma e do processo de autofagia lisossomal, responsáveis pela degradação da α -sinucleína (KAUSHIK, CUERVO, 2015). Além dos prejuízos causados pelo acúmulo de α -sinucleína, evidências têm demonstrado o envolvimento das mitocôndrias como um elemento chave na patogênese da PD. É proposto que o acúmulo de α -sinucleína na organela leva a déficits do complexo I mitocondrial e consequente aumento do estresse oxidativo, o que de fato pode ser observado em pacientes com PD (SCHAPIRA, 2007; DE MIRANDA, VAN & SANDERS, 2016). Estudos também demonstram que neurônios dopaminérgicos nigrais são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo por variadas razões: *i*) apresentam axônios não mielinizados e longos, que realizam grande número de sinapses, utilizando mais energia (BOLAM, PISSADAKI, 2012; PISSADAKI, BOLAM, 2013); *ii*) redução nos níveis de dopamina citosólica e seus metabólitos podem causar estresse oxidativo e toxicidade neural (LOTHARIUS, BRUNDIN, 2002); *iii*) a disfunção mitocondrial e o aumento do estresse oxidativo podem levar à depleção e ao comprometimento funcional do sistema de degradação da α -sinucleína (DEHAY *et al.*, 2010). Além dos eventos supracitados, há evidências de que a agregação de α -sinucleína induz a resposta da imunidade inata e adaptativa (RANSOHOFF, 2016) e, por outro lado, que a neuroinflamação também pode promover o envelhecimento incorreto da α -sinucleína (GAO, 2008).

1.2. HOMEOSTASE GLICÊMICA E LIPÍDICA NO CONTEXTO SAUDÁVEL E NAS DOENÇAS METABÓLICAS

A glicose é um substrato metabólico fundamental para o funcionamento de todos os tecidos do organismo humano e é obtida por meio de fontes exógenas, como a ingestão de alimentos e a consequente absorção intestinal, e fontes endógenas, como a produção hepática derivada da glicogenólise ou gliconeogênese (ARONOFF *et al.*, 2004; NUNES, RAFACHO, 2016). A concentração plasmática desse substrato

é controlada, majoritariamente, pelo hormônio insulina e seus contrarreguladores, glucagon, adrenalina, cortisol e hormônio do crescimento, em uma complexa interação entre o sistema nervoso central e os órgãos periféricos (ARONOFF *et al.*, 2004).

A insulina é um hormônio peptídico secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas que regula não somente a homeostase glicêmica, mas também controla o metabolismo de lipídios e proteínas, bem como o crescimento celular por meio de seus efeitos mitogênicos (WILCOX, 2005). Em um contexto fisiológico, a insulina é secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas, controlando a absorção intestinal de glicose, a captação periférica de glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo, a estimulação da glicogênese, a inibição da secreção de glucagon das células α pancreáticas e a inibição da glicogenólise e gliconeogênese hepáticas, promovendo a normalização das concentrações de glicose no sangue (GERICH *et al.*, 1974; KAHN, HULL & UTZSCHNEIDER, 2006; HUANG, CZECH, 2007; KELLETT *et al.*, 2008; OH *et al.*, 2013). Além disso, a insulina é capaz de modular o apetite por meio de sua ação molecular no núcleo arqueado do hipotálamo (VOGT, BRÜNING, 2013).

A secreção de insulina ocorre principalmente por estimulação da glicose que, uma vez transportada à célula β por meio de transportadores facilitadores de glicose (GLUT2), é oxidada e resulta em produção de ATP intracelular. O aumento nas concentrações de ATP intracelular promove a inativação do canal de potássio e a consequente ativação do canal de cálcio dependente de voltagem, provocando uma rápida exocitose de grânulos de insulina e ativando vias de sinalização potencializadoras como a proteína cinase A (PKA) e proteína cinase C (PKC), promovendo uma amplificação e o caráter bifásico de liberação dos grânulos de insulina (MATSCHINSKY, 1995; NESHER *et al.*, 2002; NUNES, RAFACHO, 2016).

A obesidade é o principal fator de risco para o surgimento de doenças metabólicas haja vista que a obesidade pode estar composta por inúmeras disfunções como a resistência periférica à insulina, dislipidemia e hipertensão, principalmente quando o excesso de tecido adiposo está localizado no compartimento visceral (ALBERTI *et al.*, 2009). Além da suscetibilidade genética, fatores ambientais bem como a microbiota intestinal também podem influenciar no desenvolvimento da obesidade (ALONSO-MAGDALENA, QUESADA & NADAL, 2011; JANESICK,

BLUMBERG, 2011; CANI *et al.*, 2014). No entanto, independentemente desses fatores, o alto consumo calórico somado ao sedentarismo são fatores determinantes para o desenvolvimento da obesidade (NUNES, RAFACHO, 2016).

O aumento do consumo calórico com a consequente desregulação do balanço energético promove a expansão do tecido adiposo. Entretanto, quando a expansão tende a alcançar um limite, outros tecidos passam a armazenar lipídios, promovendo a formação de gordura ectópica, contribuindo para o desenvolvimento da resistência à insulina (VIRTUE, VIDAL-PUIG, 2010). Além disso, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, derivadas de tecido adiposo expandido, assim como as células imunes infiltradas neste tecido, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina (WEISBERG *et al.*, 2003; FAIN *et al.*, 2004; WELLEN, HOTAMISLIGIL, 2005; YANG *et al.*, 2005; SKURK *et al.*, 2007). Ademais, a expansão do tecido adiposo é comumente associada à prejuízos vasculares, caracterizados pela redução do suprimento sanguíneo e, por fim, à hipóxia, o que promove o recrutamento de macrófagos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (WOOD *et al.*, 2009). Sendo assim, essas respostas adaptativas à obesidade se correlacionam com o início da resistência à insulina que, também, está associada ao pré-diabetes e ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (WELLEN, HOTAMISLIGIL, 2005).

O diabetes mellitus tipo 2 é a forma mais prevalente do diabetes mellitus, caracterizada por um aumento nas concentrações de glicose sanguínea (hiperglicemia), devido ao comprometimento da ação e/ou secreção de insulina (MAITRA, ABBAS, 2005; DAS, ELBEIN 2006). Normalmente, os indivíduos obesos resistentes à insulina são normotolerantes e não desenvolvem hiperglicemia, devido à um incremento compensatório na secreção de insulina, explicado por um aumento da função ou da massa de células β pancreáticas (KAHN *et al.*, 1993; WEIR, BONNER-WEIR, 2004). No entanto, o aparecimento de um quadro de intolerância à glicose ocorre quando a secreção de insulina, seja por perda de função ou de massa celular, é insuficiente para compensar a diminuição da sensibilidade à insulina, levando ao favorecimento do desenvolvimento do DM2 (WEIR, BONNER-WEIR, 2004; KAHN, HULL & UTZSCHNEIDER, 2006). Deste modo, é possível afirmar que as principais anormalidades fisiopatológicas subjacentes ao DM2 são a

resistência à insulina e a redução da função das células β pancreáticas (HALBAN *et al.*, 2014).

1.4. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS E METABÓLICAS: UMA RELAÇÃO DE DUAS VIAS?

Diversos estudos têm revelado uma associação entre doenças neurodegenerativas e disfunções na homeostase metabólica e vice-versa. Alguns trabalhos indicam que o encéfalo de pacientes portadores da Doença de Alzheimer (DA) apresenta falhas na sinalização da insulina em decorrência de problemas relacionados à deposição das placas amiloides (MOLONEY *et al.*, 2010; FERREIRA & KLEIN, 2011; SELKOE, 2011; MUCKE & SELKOE, 2012). Por outro lado, há uma parcela de estudos mostrando que pacientes hiperglicêmicos e hipersulinêmicos apresentam aumento nas concentrações plasmáticas do peptídeo β -amilóide, principal constituinte das placas amiloides no encéfalo dos pacientes com DA (HO *et al.*, 2004; TAKEDA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012). A partir de estudos com camundongos, Clarke e colaboradores (2015) mostraram que a administração intracerebroventricular do oligômero β -amilóide provoca uma resposta inflamatória no hipotálamo levando a disfunções na homeostase glicêmica, como a intolerância à glicose e a resistência periférica à insulina. Portanto é possível afirmar que, pelo menos em roedores, há uma relação entre a DA e problemas metabólicos. No entanto, a maioria dos estudos são direcionados à DA, havendo pouco ou nenhum estudo propondo avaliar o possível impacto da PD sobre parâmetros metabólicos em ratos.

Ainda que pouco compreendido, há alguns estudos alertando para o impacto das doenças cerebrovasculares, hipertensão e dislipidemia (e.g., muitas vezes presentes como comorbidades no DM) na contribuição de problemas cognitivos e motores na PD (VERDELHO *et al.*, 2007; HAJJAR *et al.*, 2011; WARDLAW, VALDES, MUNOZ-MANIEGA, 2015). Alguns autores vêm sugerindo o DM2 como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a PD (HU *et al.*, 2007; KLIMEK *et al.*, 2015). Há evidências de que o DM2 está associado com a piora do quadro motor e dos problemas cognitivos nos pacientes com PD (ALVEZ *et al.*, 2006; POST *et al.*, 2007;

KOTAGAAL *et al.*, 2013). Além disso, uma maior prevalência de DM2 foi reportada em pacientes com PD (PRESSLEY *et al.*, 2003).

Apesar de haver algumas associações entre desfechos metabólicos e PD, ou vice-versa, um estudo observacional relata que a prevalência de DM2 em pacientes com PD é semelhante à prevalência dos indivíduos sem PD (BECKER, *et al.*, 2008). Outro estudo também demonstra uma relação similar entre a associação entre PD e DM2. Scigliano e colaboradores (2006) reportaram menor prevalência de DM2 nos pacientes diagnosticados com PD, enquanto que não encontraram diferenças no risco do desenvolvimento de PD entre pacientes eutróficos e pacientes diabéticos (SIMON *et al.*, 2007).

Sendo assim, a associação entre o DM2 e a PD ainda não é bem compreendida e os estudos visando essa relação causal entre distúrbios metabólicos e PD e vice-versa ainda são incipientes. Assim mesmo, sabe-se que a PD é capaz de impactar em diversas áreas cerebrais, podendo afetar regiões envolvidas no controle metabólico como o hipotálamo (DAYAN, SKLEROV & BROWNER, 2018). Deste modo, é de fundamental importância a avaliação da possível relação causal, se é que ela existe, entre a PD e disfunções na homeostase metabólica ou vice-versa.

1.5. MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO

Diversas toxinas e agentes farmacológicos têm sido utilizados para se tentar mimetizar a PD em modelos animais. As duas substâncias mais empregadas são a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos e a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) em camundongos e primatas (BLESA, PRZEDBORSKI, 2014). Ainda, outros compostos como a rotenona, paraquat e psicoestimulantes anfetamínicos também são empregados para indução do modelo animal de parkinsonismo. No entanto, estas abordagens podem diferir da PD natural, pois promove rápida degeneração dos neurônios dopaminérgicos além de não serem capazes de induzir o aparecimento de agregados proteicos típicos da PD, denominadas corpos de Lewy (BLESA, PRZEDBORSKI, 2014).

O MPTP é uma das ferramentas para investigações sobre os mecanismos envolvidos na morte de neurônios dopaminérgicos na PD, promovendo danos à via dopaminérgica nigrostriatal, com uma profunda perda de dopamina no estriado e na substância negra pars compacta (SNpc) (DAUER, PRZEDBORSKI, 2003). O estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio e a inflamação têm sido consistentemente apontados como marcas da PD e a administração do MPTP é capaz de mimetizar tais características em primatas e camundongos (LANGSTON *et al.*, 1983). No entanto, Chiueh e colaboradores (1983) mostraram que ratos apresentam resistência ao MPTP.

O modelo animal clássico da PD é obtido através da utilização da 6-hidroxdopamina (6-OHDA), substância que não atravessa a barreira hematoencefálica e, portanto, exige que a sua administração seja realizada diretamente na SNpc ou no estriado (JACKSON-LEWIS, BLESÁ & PRZEDBORSKI, 2012). Como pode ser observado na Figura 1, a 6-OHDA utiliza o mesmo sistema de transporte de dopamina e se acumula no citosol, induzindo a neurotoxicidade bem como a neurodegeneração e inflamação nas áreas cerebrais atingidas pela 6-OHDA (LUTHMAN *et al.*, 1989; GONZALEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2004). A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela auto-oxidação da 6-OHDA é considerada o principal mecanismo molecular subjacente à neurotoxicidade da substância (SACHS, JONSSON, 1975; KUMAR *et al.*, 1995; SOTO-OTERO *et al.*, 2000). Estudos sugerem que a 6-OHDA possui capacidade de inibir o complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondriais, gerando estresse oxidativo e morte celular (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008; KUPSCH *et al.*, 2014).

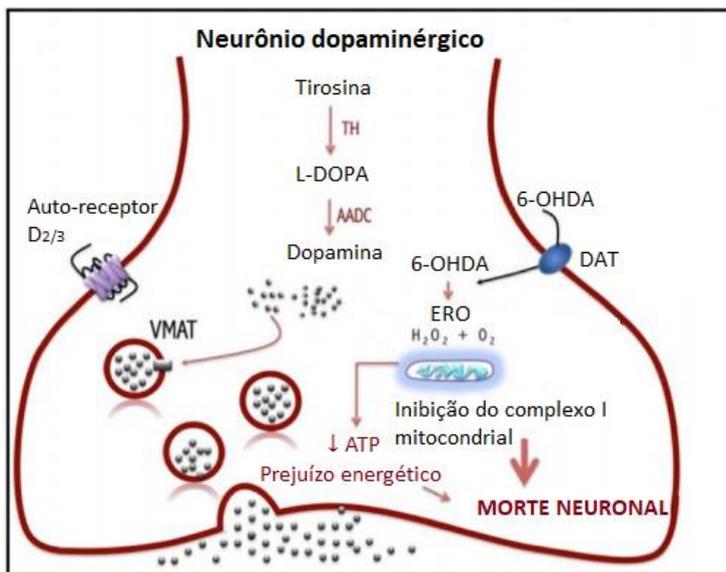


Figura 1. Efeito da 6-hidroxidopamina sobre neurônios dopaminérgicos. A substância promove o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO), afetando a função mitocondrial, levando à problemas na geração de energia e morte neuronal. DAT: Transportador de dopamina; VMAT: transportador de monoaminas vesicular.

Fonte: Adaptado de RANGEL-BARAJAS, CORONEL & FLORÁN, 2015.

Como demonstrado pela primeira vez por Ungerstedt em 1968, uma injeção intranigral de 6-OHDA em ratos ou camundongos, elimina rapidamente cerca de 60% dos neurônios positivos para tiosina-hidroxilase (TH) nesta área cerebral, com a perda subsequente dos terminais positivos de TH no estriado (BLANDINI, ARMENTERO, 2008). Por outro lado, a administração do composto no estriado, favorece uma degeneração mais lenta, progressiva e com subsequente perda na SNpc, o que também ocorre no contexto da PD (SAUER, OERTEL, 1994; PRZEDBORSKI *et al.*, 1995; LEE, SAUER & BJORKLUND, 1996).

Santiago e colaboradores (2014) relataram que a administração bilateral intranigral de 6-OHDA em ratos, na dose 6 µg não foi capaz de gerar déficits motores no 1º, 7º, 14º e 21º dia após a administração da

toxina. Além disso, Tadaiesky e colaboradores mostraram que a administração bilateral de 12 µg no estriado ventrolateral de ratos também não foi suficiente para promover prejuízos motores no 7º e 21º dias após a administração do composto. Matheus (2015) também mostrou que a administração bilateral de 5 e 10 µg de 6-OHDA em ratos, no estriado dorsolateral, não foi capaz de produzir problemas comportamentais motores no 7º e 21º dia após a inoculação da toxina. Os prejuízos motores são consistentes com a administração bilateral de 15 µg de 6-OHDA no estriado ventrolateral de ratos (RAMPERSAUD *et al.*, 2012), assim como de 20 µg de 6-OHDA no estriado dorsolateral, no 7º e 21º dia após a administração da substância (MATHEUS, 2015).

1.6. GLICOCORTICÓIDES COMO FERRAMENTA FARMACOLÓGICA PARA DESAFIO METABÓLICO

Os glicocorticoides (GCs) endógenos (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) são hormônios esteroides capazes de regularem inúmeros processos fisiológicos e de desenvolvimento (CAIN, CIDLOWSKI, 2017). Como todos os hormônios esteróides, os GCs são sintetizados, nas mitocôndrias, a partir do colesterol por meio de um processo enzimático chamado esteroidogênese (MILLER, AUCHUS, 2011). A biossíntese de GCs ocorre no córtex adrenal, embora a produção local de GCs também tenha sido relatada no timo, intestino e na pele (TALABER, JONDAL, & OKRET, 2013). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é o responsável pela regulação da secreção desse hormônio que apresenta diversas ações fisiológicas, tais como: potente ação imunossupressora, anti-alérgica e anti-inflamatória (SCHÄCKE, DÖCKE & ASADULLAH, 2002).

As inúmeras ações dos GCs, levaram ao desenvolvimento de análogos sintéticos mais potentes e mais seletivos, como a dexametasona; fármaco amplamente utilizado na terapia de processos inflamatórios crônicos e agudos, assim como em patologias associadas a auto-imunidade (BOSSCHER, HAEGEMAN, & ELEWAUT, 2010) e apresenta afinidade 50 vezes superior ao receptor de GC (GR) em relação ao próprio cortisol (SCHÄCKE, DÖCKE & ASADULLAH, 2002).

Os efeitos adversos causados pelo uso agudo dos GCs não representam problemas significativos à saúde e a elevação na secreção de insulina é suficiente para impedir qualquer prejuízo no metabolismo da glicose. Contudo, o uso de longo prazo ou a administração de doses suprafarmacológicas devem ser observados com cautela (THOMAS, 1984). Os glicocorticoides, quando em excesso, promovem alterações no metabolismo hepático da glicose, relacionado com a redução da ação da insulina no fígado que induz aumento da gliconeogênese por meio da estimulação gênica da fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK) e da glicose-6-fosfatase (G6Pase) (JITRAPAKDEE, 2012) e consequente intolerância à glicose (MCMAHON, GERICH & RIZZAT, 1988; STOJANOVSKA *et al.* 1990; MOKUDA *et al.*, 1991; RAFACHO *et al.* 2008). Além disso, podem promover alterações metabólicas em outros tecidos, como o músculo esquelético, o qual representa o principal local de captação de glicose mediada por insulina, prejudicando a ação desse hormônio e, corroborando para a intolerância à glicose (DIMITRIADIS *et al.*, 1997). Os GCs também podem favorecer a lipólise do tecido adiposo, resultando em dislipidemias e aumento nas concentrações de ácidos graxos livres que favorecem a deposição de gordura ectópica e a resistência à insulina (REBUFFE-SCRIVE *et al.*, 1988; REBUFFE-SCRIVE *et al.*, 1992; ROCKALL *et al.* 2003; RAFACHO *et al.* 2008; ARNALDI *et al.*, 2010). Estudos *in vivo* em ratos tratados com dexametasona (1 mg/kg, por 5 dias consecutivos), revelaram, adaptações que ocorrem nas células β -pancreáticas para que ocorra hipersecreção de insulina diante deste contexto de resistência à insulina causada pelo excesso de GC (RAFACHO *et al.*, 2011). Dentre eles, há aumento no acoplamento estímulo-secreção de insulina pela glicose que se dá em partes por maior influxo de cálcio células β -pancreáticas, bem como maior ativação das proteínas PKA e PKC. Tais alterações, contudo, não evitam a presença da intolerância à glicose (RAFACHO, BOSCHERO, & ORTSÄTER, 2012). A Figura 2 sumariza as principais alterações metabólicas observadas a partir do tratamento com doses elevadas de GC em roedores.

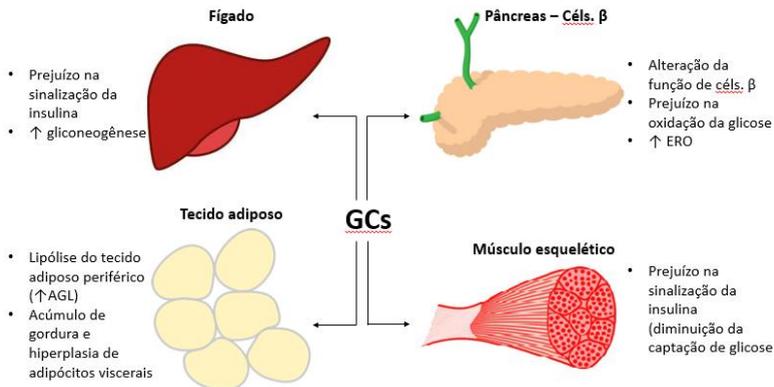


Figura 2. Efeitos adversos dos glicocorticoides em tecidos periféricos envolvidos no controle da homeostase glicêmica. AGL: ácidos graxos livres, ERO: espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Adaptado de Rafacho et al., 2014.

Por meio de estudos com animais de laboratório, foi possível coletar evidências a respeito das alterações na homeostase glicêmica relacionada à superdosagem ou ao uso crônico de glicocorticoide. Estudos mostraram que a administração de dexametasona em ratos é capaz de promover aumento na produção hepática de glicose, diminuição quantitativa dos receptores de insulina e na fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS) -1 no fígado. Além disso, observaram uma diminuição da ação da insulina na captação da glicose e na produção de glicogênio no músculo sóleo e epitrocleares (MOKUDA *et al.*, 1991; VENKATESAN *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 2000; RUZZIN *et al.*, 2005). Para mais, ilhotas de ratos tratados com dexametasona apresentaram um aumento na responsividade à glicose, na sensibilidade à glicose e na secreção de insulina estimulada pela glicose como forma compensatória de se evitar desfechos metabólicos (KARLSSON *et al.*, 2001; RAFACHO *et al.*, 2008, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Dorsey e colaboradores (2006) estimaram que em 2005 haviam aproximadamente 4 milhões de pessoas com PD e projetaram um incremento para os anos seguintes sugerindo que este número poderá alcançar 9 milhões de pessoas até 2030. No Brasil, estima-se que a prevalência da PD seja de 3,3% em pessoas acima de 65 anos (BARBOSA *et al.*, 2006). Raramente a doença se inicia antes dos 50 anos de idade e sua incidência apresenta um aumento acentuado após os 60 anos de vida (VAN DEN EEDEN *et al.*, 2003; DE LAU *et al.*, 2006; WIRDEFELDT *et al.*, 2011). Este cenário também é geralmente visualizado em patologias relacionadas a prejuízos metabólicos, como a DM2.

O processo fisiopatológico da PD é complexo haja vista que pode envolver fatores de risco ambientais, genéticos e inflamatórios que ainda não são bem compreendidos. Para além dos fatores causais da PD, é inconclusivo e, portanto, desconhecido, se as alterações centrais observadas na doença podem repercutir de forma negativa sobre aspectos metabólicos periféricos como a glicemia, lipídemia, tolerância à glicose e a sensibilidade periférica à insulina. Assim, não há uma definição de quem seja o fator causal; se as disfunções metabólicas favorecem o desenvolvimento da PD ou, se o contrário é verdadeiro. Ou ainda, se ambas as condições podem ocorrer.

Assim, devido à alta prevalência das doenças metabólicas e da PD nas populações idosas e a lacuna de conhecimento acerca da relação entre PD e desfechos metabólicos, nos propusemos a demonstrar o possível impacto da 6-OHDA sobre a homeostase glicêmica e lipídica, bem como a presença de eventual vulnerabilidade frente à um desafio diabetogênico induzido com GC. Deste modo, nossas hipóteses são: i) que os ratos com déficits motores causados pela administração de 6-OHDA apresentem deterioração do metabolismo glicêmico e lipídico; ii) que estas alterações sejam exacerbadas pelo desafio metabólico causado pelo tratamento com o GC.

3. OBJETIVOS

Avaliar se a administração de 6-OHDA afeta a homeostase glicêmica e lipídica na ausência ou presença de um desafio metabólico por glicocorticoide.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros motores em três momentos pós-administração de 6-OHDA.

Estratégia utilizada: exposição ao campo aberto no 7º e 35º dia do protocolo experimental e ao rotarod no 7º, 21º e 35º dia do protocolo experimental.

- Avaliar parâmetros murinométricos e plasmáticos pós-administração de 6-OHDA.

Estratégia utilizada: determinação do peso corpóreo e ingestão alimentar; da concentração plasmática de insulina e triacilglicerol; do conteúdo de glicogênio e gordura hepáticos; do conteúdo da massa das gorduras epididimária, omental e retroperitoneal.

- Avaliar parâmetros metabólicos relacionados à homeostase glicêmica em três momentos pós-administração de 6-OHDA.

Estratégia utilizada: determinação da tolerância à glicose no 8º, 22º e 36º dia do protocolo experimental e da tolerância à insulina no 9º, 23º e 37º dia do protocolo experimental.

- Avaliar parâmetros estruturais relacionados à homeostase glicêmica.

Estratégia utilizada: determinação da massa relativa e da densidade das ilhotas pancreáticas; determinação da distribuição e conteúdo de gordura e glicogênio hepático.

- Avaliar o impacto da administração de glicocorticoide sobre parâmetros metabólicos.

Estratégia utilizada: determinação do peso corpóreo e da ingestão alimentar; da concentração de glicose sanguínea; da tolerância à glicose e à insulina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corpóreo entre 280-350g, provenientes do Biotério Central da UFSC, localizado no Câmpus Trindade, Florianópolis, SC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas no biotério setorial do Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas – LIDoC, e em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), luzes acesas das 06:00 Às 18:00, com livre acesso à comida e água. Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC – protocolo n° 446810111.

4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a execução deste trabalho foram utilizados 40 ratos Wistar machos. Em um primeiro momento os animais foram divididos em 2 grupos, seguido de nova distribuição em 4 grupos experimentais, como será descrito a seguir. Os animais chegaram ao biotério do LIDoC com 30 dias de vida, onde permaneceram por mais 60 dias até o início do protocolo experimental (Figura 3). Os animais foram submetidos a um protocolo de avaliação basal no rotarod (como descrito em 4.5.2) e os que obtiveram êxito neste teste foram incluídos no estudo e submetidos à cirurgia estereotáxica, realizada no dia 0 do protocolo experimental. Dos 40 animais expostos ao protocolo de avaliação basal, 37 seguiram para a cirurgia estereotáxica. No 7° e 35° dias após a cirurgia, foi realizado o teste campo aberto, enquanto que o segundo teste motor, o rotarod, foi realizado no 7°, 21° e 35° dias pós-operatório. O teste de tolerância à glicose (ipGTT) foi realizado no 8°, 22° e 36° dias do protocolo experimental pós-operatório, ao passo que o teste de tolerância à insulina (ipITT) foi aplicado no 9°, 23° e 37° dias pós-operatório. No 32° dia, foi iniciado o tratamento com dexametasona (i.p.), que se estendeu até o 37° dia do protocolo experimental (6 dias). No 38° dia, os animais foram eutanasiados e o plasma e órgãos de interesse foram coletados para posteriores análises bioquímicas. Esse protocolo experimental ocorreu

em 2 lotes distintos de modo que os procedimentos foram replicados ao menos em duas ocasiões distintas.

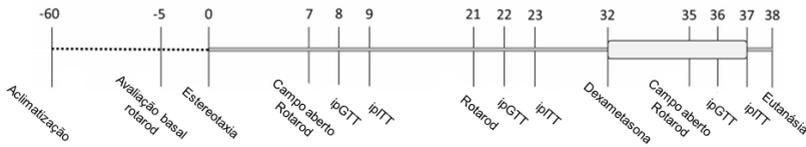


Figura 3. Delineamento experimental. Vide o texto para compreensão detalhada.

4.2.1. Grupos experimentais antes do tratamento com dexametasona:

- 1) Grupo controle (CTL) (n=19): ratos tratados apenas com veículo na porção intra-estriatal (como descrito 4.3);
- 2) Grupo 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (n=18): ratos tratados com 6-hidroxidopamina na porção intra-estriatal (como descrito em 4.3).

4.2.2. Grupos experimentais tratados com dexametasona

- 1) Grupo dexametasona (Dexa) (n=10): metade dos ratos oriundos do grupo CTL foram submetidos à administração intraperitoneal (i.p.) de dexametasona (como descrito em 4.4). Os demais foram tratados com solução salina (1 ml/kg, peso corpóreo, i.p.) (CTL) (n=9);
- 2) Grupo 6-hidroxidopamina + dexametasona (6-OHDA+Dexa) (n=9): metade dos ratos oriundos do grupo 6-OHDA foram submetidos à de dexametasona como descrito para o grupo DEXA. Os demais foram tratados com solução salina (como descrito em 4.4) (6-OHDA) (n=9)

4.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a cirurgia estereotáxica, os animais foram previamente anestesiados com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A neurotoxina foi

injetada bilateralmente no estriado dorsolateral (EDL). As coordenadas estereotáxicas foram definidas utilizando o atlas de neuroanatomia de rato de Paxinos e Watson (1997): AP: +0,2 milímetros, ML: \pm 3,5 mm e DV: - 4,8 milímetros do bregma. Para a infusão foi utilizada seringa Hamilton de 10 μ L, conectada a um tubo de polietileno com uma agulha de 26G em sua extremidade. Após a injeção bilateral da 6-OHDA (na dose de 20 μ g, com volume de injeção de 3 μ L e taxa de infusão de 1 μ L/min) ou do veículo (solução salina, com volume de injeção de 3 μ L e taxa de infusão de 1 μ L/min), a agulha permaneceu no local de injeção durante 5 min para permitir a difusão completa da toxina. Após a cirurgia, os animais receberam uma dose de 200 mg de paracetamol por via oral a cada 6 horas, durante 3 dias.

4.4 TRATAMENTO COM DEXAMETASONA

O desafio metabólico foi realizado nos últimos seis dias que precederam a eutanásia dos animais por meio da administração de dexametasona. O fosfato dissódico de dexametasona teve seu volume corrigido para obtermos 1 mg/mL de dexametasona que então foi administrada como 1 mg/kg, peso corpóreo (Decadron®, Aché, Campinas, SP, Brasil). A administração ocorreu via i.p., uma vez ao dia entre 07:30 – 08:30, por 6 dias consecutivos. A dexametasona na dose e período utilizado foi aplicada com o intuito de desafiar o metabolismo e revelar possíveis vulnerabilidades metabólicas.

4.5 PARÂMETROS MOTORES

4.5.1. Campo aberto

No campo aberto (Figura 4) avaliamos a locomoção do animal. Os animais foram posicionados em uma arena (100 por 100 cm), sempre no quadrante inferior esquerdo do aparelho, onde permaneciam e exploravam o aparato durante 5 minutos. A arena apresentava paredes laterais lisas, medindo 40 cm, formada por metal pintado na cor branca e a base era constituída de superfície de concreto revestido com papel contact preto. Além disso, esta base possuía divisões em quadrantes 5x5,

onde cada quadrado apresentava 400 cm² (20 cm x 20 cm). Os animais do primeiro lote (n=18) foram expostos ao aparelho no 7º e 35º dias pós-cirurgia, enquanto que os animais do segundo lote (n=19) foram expostos somente no 35º dia, a fim de evitar dados enviesados devido ao condicionamento dos animais. O teste foi filmado e os seguintes parâmetros foram analisados posteriormente: 1) número de quadrados percorridos pelo animal, que representa a atividade locomotora; 2) número de *rearings* de cada animal, que representa a atividade exploratória. Tal comportamento exploratório é típico de roedores, sendo verificado quando o rato eleva seu corpo e patas dianteiras, apoiando somente sobre as patas traseiras; 3) número de quadrantes percorridos lateralmente ou centralmente, que permite identificar padrão de maior ou menor emocionalidade.

O experimento foi realizado em ambiente com iluminação vermelha (15 lux).



Figura 4. Imagem da arena onde foi realizado o teste Campo aberto.

Fonte: do autor.

4.5.2. Rotarod

Para avaliação da coordenação motora dos animais foi aplicado o teste rotarod (Figura 5). O equipamento está equipado com três velocidades: 12, 20 e 24 rotações por minuto. A troca de velocidade é manual implicando em desligamento do equipamento para cada troca. Sendo

assim, houve breve interrupção do teste entre as trocas de rotações. Todos os animais foram submetidos aos três diferentes níveis de velocidade.

Os animais foram submetidos a um protocolo de avaliação basal com 3 tentativas com velocidade constante de 12 rotações por minuto (rpm). Ao final, os animais que permaneceram no rotarod por 1 min foram incluídos no estudo e submetidos à cirurgia estereotáxica. Este protocolo se iniciou 5 dias antes da cirurgia estereotáxica, estendendo-se por 3 dias.

No 7º, 21º e 35º dias pós-operatório, período de realização dos testes motores, os animais foram posicionados no cilindro, com o tempo máximo de permanência de 2 minutos em cada velocidade. Após os diferentes níveis de velocidade, anotou-se o tempo de permanência do animal em cada estágio.

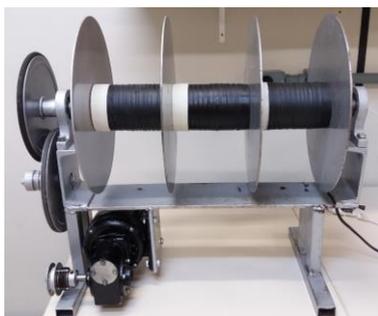


Figura 5. Imagem do rotarod utilizado para realização dos testes motores.

Fonte: do autor.

4.6 PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS E METABÓLICOS

4.6.1 Massa corporal

A verificação do peso corpóreo foi realizada semanalmente desde o início do protocolo experimental até a eutanásia em balança eletrônica digital (TECNAL; Piracicaba, SP, Brasil).

4.6.2 Consumo de ração

O consumo de ração foi acompanhado semanalmente como descrito para o peso corpóreo. A determinação da ingestão alimentar foi realizada pela pesagem da ração remanescente (não ingerida) descontada do total daquela depositada no dia anterior. A diferença representa a quantidade ingerida por gaiola diariamente. A quantidade média de ração ingerida por animal foi obtida através da divisão da massa total de ração ingerida pelo número de animais por gaiola. Os resultados foram expressos em gramas (g) de ração ingeridos por 100 g de peso corpóreo para se obter a normalização destes parâmetros.

4.6.3. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipgtt):

O teste de tolerância à glicose foi realizado no 8º, 22º e 36º dias do protocolo experimental, em animais jejuados (12-14 h) e acordados. Os animais tiveram a extremidade da cauda seccionada (0,5 mm) para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente, foi administrada uma solução de glicose 50% (2 g/kg de peso corpóreo, i.p.) e foram coletadas amostras de sangue da ponta da cauda dos ratos aos 30, 60 e 120 minutos para determinação das concentrações de glicose sanguínea como descrito (RAFACHO *et al.*, 2008). A área abaixo da curva foi calculada a partir dos valores de glicose sanguínea após normalização pelo valor de partida no minuto 0.

4.6.4. Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipitt):

O teste de tolerância à insulina foi realizado no 9º, 23º e 37º dias em animais alimentados e acordados. A coleta de sangue no minuto 0 ocorreu como para o ipGTT. Em seguida, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de insulina humana recombinante (Biohulin®) equivalente a 1 IU/Kg de peso corpóreo. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem das concentrações de glicose sanguínea nos tempos 10, 20 e 40 min (RAFACHO *et al.*, 2008). A área abaixo da curva

foi calculada a partir dos valores de glicose sanguínea após normalização pelo valor de partida no minuto 0.

4.6.5. Eutanásia, perfusão e coleta de órgãos

No 38º dia os animais receberam uma superdose de Halotano 1 mL/mL (Tanohalo®, Cristália, Curitiba, PR, Brasil). Imediatamente após a constatação de ausência de reflexos, amostras de sangue foram coletadas com seringas contendo anticoagulante NaF (Glistab – Labtest; Lagoa Santa, MG, Brasil) por meio de punção cardíaca e conduzido à centrifugação a 400x g por 10 minutos a 21°C (eppendorf 5810R). O plasma foi alíquotado e armazenado a -80°C para posterior quantificação da insulina, colesterol e triacilglicerol de acordo com instruções dos fabricantes e publicações prévias (RAFACHO *et al.*, 2008; RAFACHO *et al.*, 2010). Em seguida, os animais foram submetidos ao processo de perfusão com uma infusão no ventrículo esquerdo de 20 ml de solução salina 0,9% contendo heparina (200 µL de heparina), seguida pela perfusão de 200 ml de paraformaldeído (PFA) 4% (pH 7,4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após, os órgãos de interesse (gordura epididimária, gordura retroperitoneal, gordura omental, fígado, adrenais e pâncreas) foram cuidadosamente removidos e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL). O peso relativo dos órgãos foi determinado através da normalização pelo peso corpóreo de cada animal.

4.6.6. Glicogênio hepático

Para determinação do glicogênio hepático foi coletado 300-400 mg de fígado em tubos de ensaio contendo solução de KOH 30% e fervidos por 1 h para completa digestão. Em seguida, foi acrescido Na₂SO₄ e etanol. As amostras foram homogeneizadas, submetidas ao banho-maria fervente por 15 segundos e centrifugadas a 800 x g por 10 minutos a 21°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em água destilada quente. Posteriormente, etanol foi adicionado e novamente o material foi homogeneizado, rapidamente aquecido e centrifugado. Após diluição do precipitado em H₂O destilada, o conteúdo de glicogênio

foi quantificado por espectrofotometria (490 nm) em reação com reagente fenol (LO; RUSSEL; TAYLOR 1970).

4.6.7 Gordura hepática

Para quantificação do conteúdo de triacilglicerol (TG) hepático, aproximadamente 100 mg de fígado foram coletados em tubo de ensaio contendo NaCl (1M) e homogeneizados (UltraTurrax, IKA®, Staufen, Alemanha). Em seguida, foi adicionado solução de clorofórmio/metanol (2:1) e o material foi centrifugado a 5000 x g por 5 minutos a 21°C. Após centrifugação, foi coletada a fase inferior (metanólica) para posterior secagem em banho-maria fervente. Em seguida, a amostra foi ressuspendida em Triton X100/Metanol (2:1) e foi feito a dosagem do TG através do ensaio enzimático colorimétrico (Biotécnica® - Varginha, MG, Brasil) (RAFACHO *et al.*, 2008).

4.7. PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

4.7.1. Morfologia hepática:

Após a perfusão, fragmentos de fígado foram coletados e fixados em formalina tamponada, pH 7.4, por 24 horas, desidratadas e incluídas em parafina. Secções (5 µm) do fígado de cada grupo experimental foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica) e aderidas em lâminas de vidro. Em seguida, uma secção representativa de cada animal foi submetida ao procedimento de coloração de Hematoxilina e Eosina para posterior avaliação morfológica com intuito de verificar a presença de lipídeos e glicogênio.

4.7.2. Massa relativa de pâncreas endócrino

Após a perfusão, o pâncreas foi coletado e o fragmento esplênico foi fixado em paraformaldeído 4% por 24 horas, desidratadas e incluídas em parafina. Secções (5 µm) do pâncreas de cada grupo experimental foram

obtidas em micrótomo rotativo (Leica) e aderidas em lâminas de vidro. Em seguida uma seção representando a maior área do fragmento foi submetida ao procedimento de coloração Hematoxilina e Eosina e posteriormente digitalizadas pelo digitalizador de lâminas automático AxioScan (ZEISS, Oberkochen, Alemanha) para quantificação da massa relativa de pâncreas endócrino e da densidade das ilhotas pancreáticas. Para obtenção dos dados da massa relativa, foi verificada a medida total do pâncreas e das ilhotas pancreáticas em μm^2 com o uso do software ZEN (ZEISS, Oberkochen, Alemanha) (Figura 6). Após, a somatória das áreas correspondentes às ilhotas pancreáticas foi dividida pela medida total do pâncreas e multiplicado por 100 para obter a porcentagem de área de pâncreas endócrino. A massa absoluta de ilhotas pancreáticas (massa relativa x massa do pâncreas) não foi possível de ser obtida, pois o pâncreas perfundido tem sua massa modificada pela perfusão. Para obtenção da densidade de ilhotas pancreáticas (número de ilhotas por 1000 μm^2 área de secção) foi utilizada a seguinte relação: densidade de ilhotas = (número total de ilhotas na seção vezes 1000) dividido pela área total do pâncreas analisado. O resultado é expresso pelo número de ilhotas por 1000 μm^2 de secção.

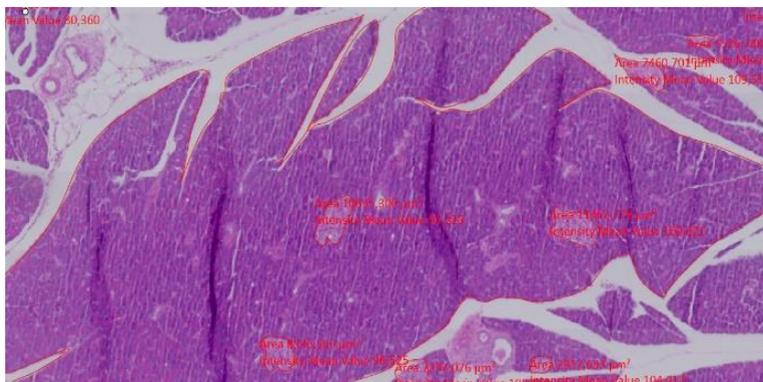


Figura 6. Imagem ilustrativa da marcação do perímetro do tecido pancreático e das ilhotas pancreáticas.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS:

A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico Graphpad Prism versão 6.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA). Os

resultados foram descritos como média \pm desvio padrão (DP) ou média \pm erro padrão da média (EPM) quando realizados testes paramétricos e mediana e intervalo interquartil quando foram aplicados testes não paramétricos. Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*, *Shapiro-wilk* ou *D'Agostin and Pearson* sendo considerado simétrico se aprovado por ao menos um dos testes. Para os dados contínuos que apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste t de *Student* ou a análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguido de post test de Tukey. Para dados contínuos que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado *Mann-Whitney* ou *Kruskal-Wallis*. Para verificação de *outliers* foi utilizado o programa GraphPad QuickCalcs. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO 6-OHDA

5.1.1. Animais responsivos ao rotarod

Após a realização do teste nos dois lotes experimentais, totalizando 40 animais, 92,5% deles responderam de forma positiva ao parâmetro analisado, enquanto que 7,5% não permaneceram o tempo estipulado pelo protocolo de avaliação basal (1 minuto) e, portanto, não seguiram para o procedimento cirúrgico (Figura 7).

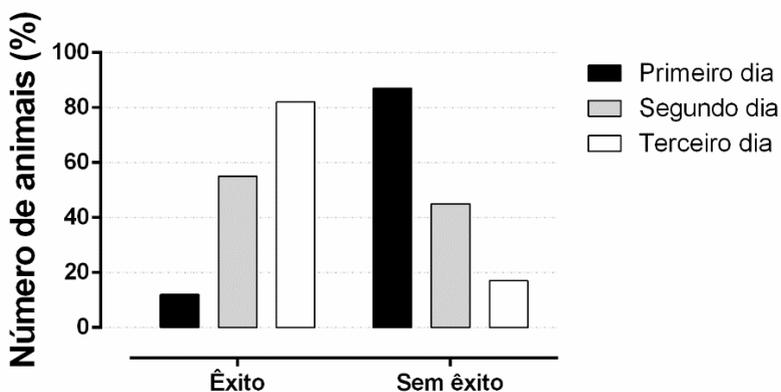


Figura 7. Porcentagem de animais responsivos ao protocolo de avaliação motora basal.

5.2. PARÂMETROS MOTORES

5.2.1. Campo aberto

Neste parâmetro, foi possível observar que 20 μg de 6-OHDA, introduzida bilateralmente no estriado dorso lateral foi capaz de promover um prejuízo motor nos animais no 7º dia após a cirurgia estereotáxica. Neste período, os animais do grupo 6-OHDA apresentaram uma redução de 43,4% no número de cruzamentos laterais (Figura 8A) e 43% de redução no número de cruzamentos totais, quando comparados ao grupo

Controle (Figura 8C). Não foi observada nenhuma alteração no número de cruzamentos centrais (Figura 8B) e apenas uma tendência de redução na frequência de evocação do comportamento *rearing* (Figura 8D).

7º dia

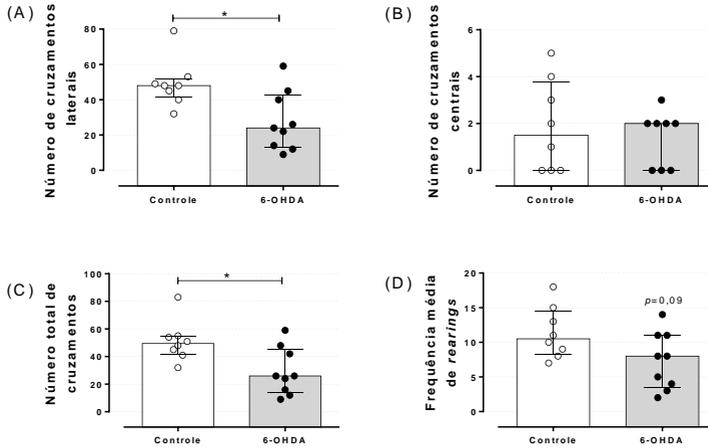


Figura 8. Efeito da injeção de 6-OHDA, no 7º dia do protocolo experimental, em parâmetros motores de ratos avaliados no teste do campo aberto. (A) número de cruzamentos laterais; (B) número de cruzamentos centrais; (C) número total de cruzamentos. (centrais + laterais); (D) frequência média de *rearing*s. Dados são mediana e intervalo interquartil. (A-D) *Mann Whitney*. $p < 0,05$. (A-D) $n = 8-9$.

No 35º dia após a cirurgia estereotáxica (terceiro dia de tratamento com GC), foi possível observar que a manutenção do prejuízo motor por ação da administração da 6-OHDA, como pode ser observado pela redução de 62% no número de cruzamentos laterais e 67% do número de cruzamentos totais do grupo 6-OHDA quando comparado com o controle (Figura 9A,C). Não foi observado diferença quando avaliado o número de cruzamentos centrais e a evocação do comportamento *rearing* em ambos os grupos 6-OHDA e 6-OHDA+Dexa em relação aos seus respectivos grupos controles (Figura 9B,D).

35º dia

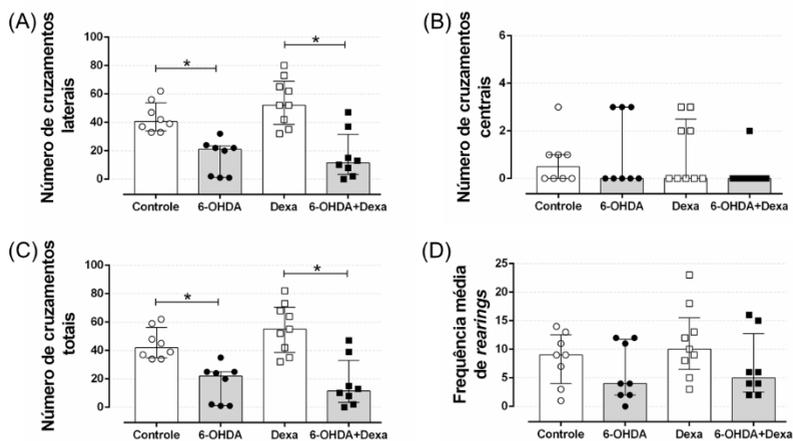


Figura 9. Efeito da injeção de 6-OHDA, no 35º dia do protocolo experimental, em parâmetros motores de ratos avaliados no teste do campo aberto. (A) número de cruzamentos laterais; (B) número de cruzamentos centrais; (C) número total de cruzamentos (centrais + laterais); (D) frequência média de *rearings*. Dados são mediana e intervalo interquartil. *Kruskal-Wallis* com *post hoc* de *Dunn*. $n=8-9$.

5.2.2. Rotarod

A administração bilateral de 6-OHDA no estriado dorso lateral foi capaz de promover prejuízo na coordenação motora e na locomoção dos animais. Na velocidade de 12 rpm, o grupo 6-OHDA apresentou uma redução no tempo de permanência no aparato de 39% ao 7º dia pós-operatório, quando comparado ao grupo Controle (Figura 10). Além disso, o grupo 6-OHDA também apresentou uma redução de 63% e 60% na velocidade de 20 e 24 rpm, respectivamente (Figura 10).

7º dia

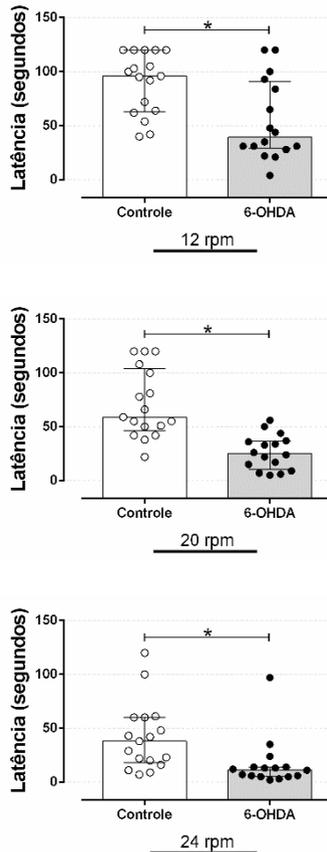


Figura 10. Efeito da injeção de 6-OHDA, no 7º dia do protocolo experimental, em parâmetro motor de ratos avaliado no rotarod. Latência para queda em segundos nas velocidades de 12, 20 e 24 rpm. Dados são mediana e intervalo interquartil. *Mann Whitney*. $p < 0,05$. $n = 16-17$.

No 21º dia, foi possível observar que o grupo 6-OHDA manteve uma redução no tempo de permanência no equipamento de 40%, 62% e 68% nas velocidades de 12, 20 e 24 rpm, respectivamente, comprovando a persistência do prejuízo motor (Figura 11).

21º dia

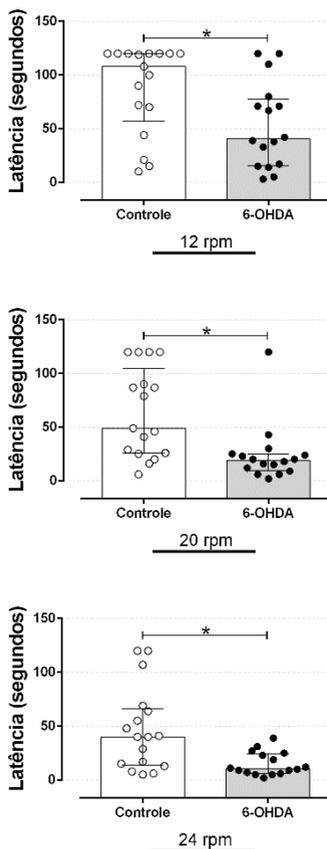


Figura 11. Efeito da injeção de 6-OHDA, no 21º dia do protocolo experimental, em parâmetro motor de ratos avaliado no rotarod. Latência para queda em segundos nas velocidades de 12, 20 e 24 rpm. Dados são mediana e intervalo interquartil. *Mann Whitney*. $p < 0,05$. $n = 16-17$.

O mesmo padrão de resposta foi observado ao 35º do protocolo experimental (terceiro dia de tratamento com GC), onde os animais 6-OHDA apresentaram uma redução na permanência do rotarod de 46% na

velocidade de 12 rpm, 59% em 20 rpm e 54% em 24 rpm, comparado ao respectivo grupo controle.

35º dia

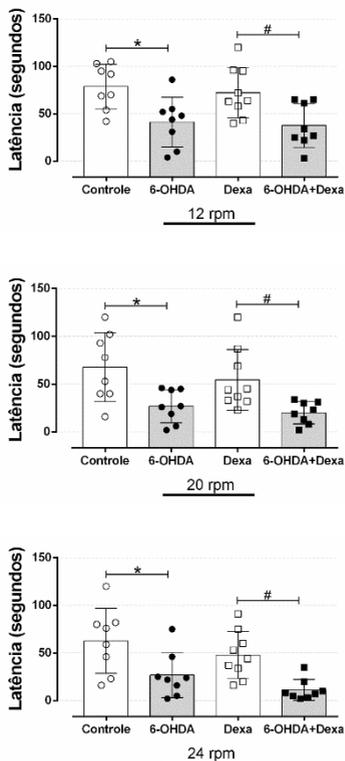


Figura 12. Efeito da injeção de 6-OHDA, no 35º dia do protocolo experimental, em parâmetro motor de ratos avaliado no teste rotarod. (A) latência para a queda (em segundos) em protocolo de aceleração crescente sem a distinção do tratamento com dexametasona; (B) latência para a queda (em segundos) na velocidade de 12 rpm; (C) latência para a queda (em segundos) na velocidade de 20 rpm; (D) latência para a queda (em segundos) na velocidade de 24 rpm. Dados são mediana e intervalo interquartil. *Kruskal-Wallis* com *post hoc* de *Dunn*. $n=8-9$.

5.3. PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS E METABÓLICOS

5.3.1. Peso corpóreo e ingestão alimentar

Nas 10 primeiras semanas do protocolo experimental, não foi possível observar diferença na evolução da massa corporal entre os 2 grupos experimentais analisados (Figura 13A). Na décima semana iniciou-se o desafio metabólico por meio do tratamento com a dexametasona. A partir deste momento o parâmetro foi analisado em 4 grupos experimentais. O grupo Dexa apresentou uma redução de 11,45% do peso corpóreo (Δ 44,66 g) ao fim do tratamento, enquanto que o grupo 6-OHDA+dexa apresentou uma redução de 10,62% no peso corporal (Δ 38,87 g) ao final do tratamento (Figura 13B).

O consumo alimentar foi semelhante entre os 2 grupos analisados, nas 10 primeiras semanas do protocolo experimental, exceto por uma redução transitória no consumo na primeira semana do protocolo experimental, quando comparado ao grupo Controle (Figura 13C). Na décima semana iniciou-se o desafio metabólico com dexametasona, a partir deste momento, o parâmetro foi analisado em 4 grupos experimentais. Nesta análise os grupos Dexa e 6-OHDA+Dexa, apresentaram uma redução de 25% e 32% em comparação aos seus respectivos grupos controles.

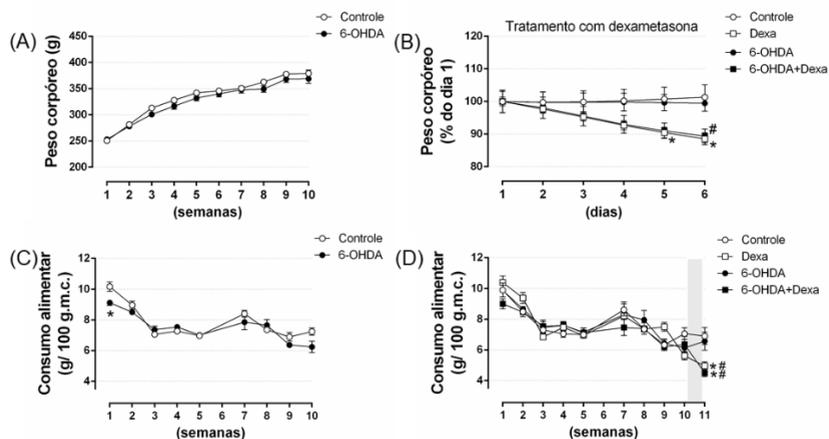


Figura 13. Peso corpóreo e ingestão alimentar ao longo de 11 semanas. (A) Massa corporal dos grupos Controle e 6-OHDA nas 10 primeiras semanas. (B) Massa corporal normalizada (a partir do 1º dia de tratamento) dos grupos

Controle, Dexa, 6-OHDA e 6-OHDA+dexa durante os 6 dias de tratamento com dexametasona. (C) Consumo alimentar dos grupos Controle e 6-OHDA durante as 10 primeiras semanas. (D) Consumo alimentar dos grupos Controle, Dexa, 6-OHDA e 6-OHDA+dexa durante todo o protocolo experimental. Dados são média \pm EPM. O símbolo “*” indica diferença em relação ao grupo Controle, enquanto que “#” indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA. (A,C) teste t de *Student*, $p < 0,05$, $n = 16-17$. (B,D) utilizado ANOVA de duas vias com medidas repetidas, $p < 0,05$, $n = 8-9$.

5.3.2. Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

Considerando que o prejuízo motor foi constatado, prosseguimos com as análises de parâmetros metabólicos a fim de identificar possíveis alterações causadas pelo desfecho neuromotor. No 7º dia do protocolo experimental foi realizado o ipGTT e foi possível observar que o grupo 6-OHDA apresentou um aumento significativo na glicemia apenas no minuto 30 após infusão intraperitoneal de glicose, em comparação com o grupo Controle (Figura 14A). A análise da área-sob-a-curva não revelou alteração na tolerância (Figura 14B). Para confirmar se esta alteração pontual na glicemia do minuto 30 pode estar acompanhada por uma redução na sensibilidade à insulina, realizamos o ipITT no 8º dia do protocolo experimental. O grupo 6-OHDA não apresentou alteração na sensibilidade à insulina em comparação ao grupo Controle (Figura 14C-D).

7º e 8º dia

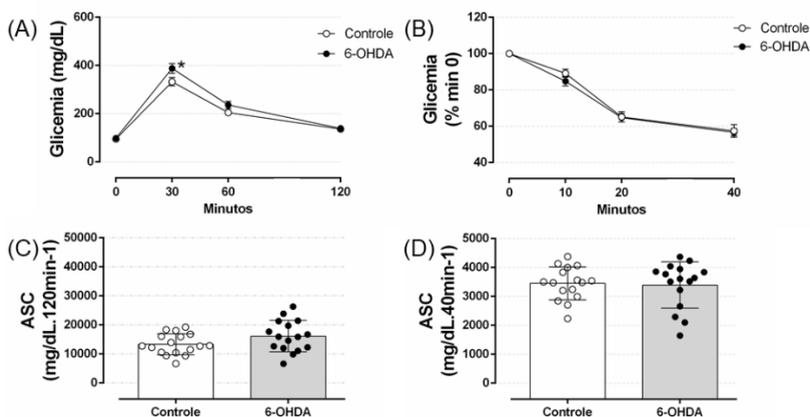


Figura 14. Valores de glicemia durante o teste intraperitoneal de tolerância à glicose e à insulina no 7º e 8º dia do protocolo experimental, respectivamente. (A) GTT no 7º dia. (B) ITT no 8º dia. (C) Área-sob-a-curva do GTT no 7º dia. (D) Área-sob-a-curva do ITT no 8º dia. (A, C) Dados são média \pm EPM. (B, D) Dados são média \pm DP. O símbolo “*” indica diferença em relação ao grupo Controle. (A,B) ANOVA de duas vias com medidas repetidas. (C,D) Teste t de Student. $p < 0,05$, $n = 16-17$.

No ipGTT realizado no 22º pós-operatório, o grupo 6-OHDA não apresentou diferenças significantes nos valores glicêmicos, nos minutos 30, 60 e 120, quando comparados com o grupo Controle, após infusão intraperitoneal de glicose (Figura 10A,C). Além disso, o grupo 6-OHDA também não apresentou alterações na sensibilidade à insulina, quando comparado ao grupo Controle (Figura 10B,D).

22º e 23º dia

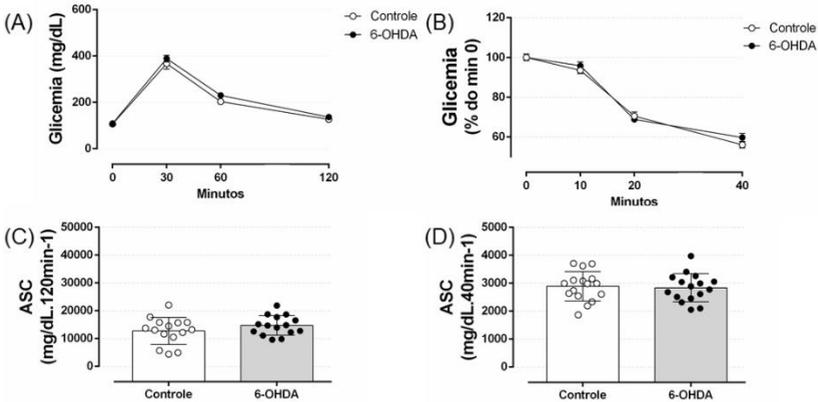


Figura 15. Valores de glicemia durante o teste intraperitoneal de tolerância à glicose e à insulina no 22º e 23º dia do protocolo experimental, respectivamente. (A) GTT no 22º dia. (B) ITT no 23º dia. (C) Área-sob-a-curva do GTT no 22º dia. (D) Área-sob-a-curva do ITT no 23º dia. (A, B) Dados são média \pm EPM. (C, D) Dados são média \pm DP. (A,B) ANOVA de duas vias com medidas repetidas. (C,D) Teste t de *Student*. $p < 0,05$, $n = 16-17$.

No 36º dia do protocolo experimental (5º dia do tratamento com dexametasona), o tratamento com dexametasona resultou em intolerância à glicose nos grupos Dexa e 6-OHDA+Dexa, quando comparados com os respectivos grupos Controle e 6-OHDA, como observados nos minutos 30, 60 e 120 (Figura 16A) e na área-sob-a-curva (Figura 16C). Para confirmar se esta intolerância à glicose foi acompanhada de uma redução na sensibilidade à insulina, no 37º dia do protocolo experimental foi realizado o ipITT. Foi possível verificar redução da sensibilidade à insulina a julgar pelos dados da área-sob-a-curva nos grupos Dexa e 6-OHDA+Dexa, quando comparados aos grupos Controle e 6-OHDA (Figura 16D).

36º e 37º dia

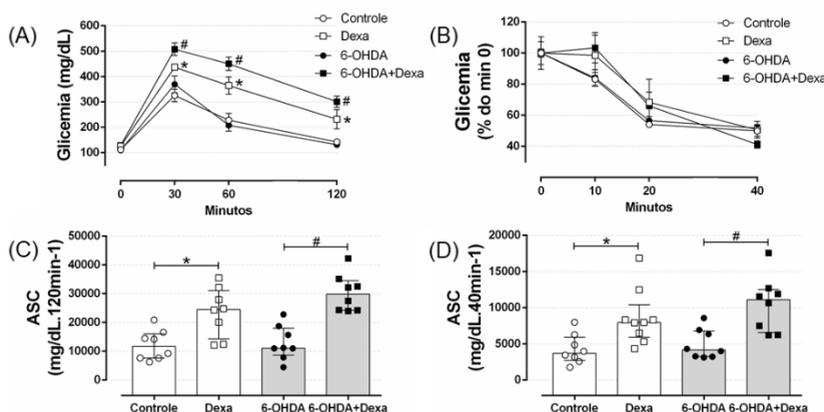


Figura 16. Valores de glicemia durante o teste intraperitoneal de tolerância à glicose e à insulina no 36º e 37º dia do protocolo experimental, respectivamente. (A) GTT no 36º dia. (B) ITT no 37º dia. (C) Área-sob-a-curva do GTT no 36º dia. (D) Área-sob-a-curva do ITT no 37º dia. (A, B) Dados são média \pm EPM. (C, D) Dados são mediana e intervalo interquartil. O símbolo “*” indica diferença em relação ao grupo Controle, enquanto que “#” indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA. (A,B) ANOVA de duas vias com medidas repetidas. (C,D) *Kruskal-Wallis* com *post hoc* de *Dunn*. $p < 0,05$, $n = 8$.

5.3.3 parâmetros circulantes

Foi possível observar que ao fim do protocolo experimental os grupos Dexa e 6-OHDA+Dexa apresentaram aumento das concentrações de insulina plasmática quando comparados aos grupos Controle e 6-OHDA por efeito do GC. O parkinsonismo induzido por 6-OHDA não resultou em alterações na insulinemia quando comparado ao grupo controle (Figura 17B). Também foi possível observar que os grupos tratados com dexametasona, Dexa e 6-OHDA+Dexa, apresentaram aumento das concentrações de triglicerídeos plasmáticos, quando comparados ao grupo Controle e 6-OHDA, respectivamente (Figura 17A). Além disso, os 4 grupos experimentais avaliados não apresentaram diferenças em relação aos níveis plasmáticos de colesterol (118, 108, 110 e 105 mg/dL,

para os grupos Controle, Dexa, 6-OHDA e 6-OHDA+Dexa, respectivamente).

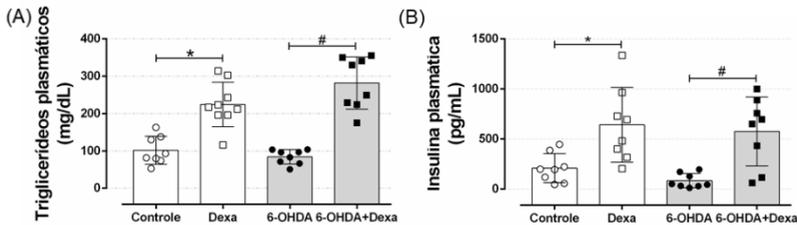


Figura 17. Parâmetros circulantes. (A) Concentração de triglicerídeos plasmáticos. (B) Concentração plasmática de insulina, após a eutanásia, no 38º dia do protocolo experimental. Dados são média \pm DP. O símbolo “*” indica diferença significativa em relação ao grupo Controle, enquanto que “#” diferença em relação ao grupo 6-OHDA. Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn, $p < 0,05$, $n = 8-9$.

5.3.4 parâmetros hepáticos

O acúmulo de glicogênio e gordura hepático estão entre os desfechos mais comuns nos contextos de doenças metabólicas (e.g., obesidade, diabetes). Assim, com o intuito de verificar se o tratamento com 6-OHDA afetou tais parâmetros, os mesmos foram investigados bioquimicamente e histologicamente. Os grupos tratados com dexametasona, Dexa e 6-OHDA+dexa, apresentaram maior conteúdo de glicogênio e triacilglicerol hepático, quando comparados ao grupo Controle e 6-OHDA, respectivamente (Figura 18A,B, respectivamente). Como observado, a toxina 6-OHDA não foi capaz de promover diferenças nos parâmetros hepáticos analisados.

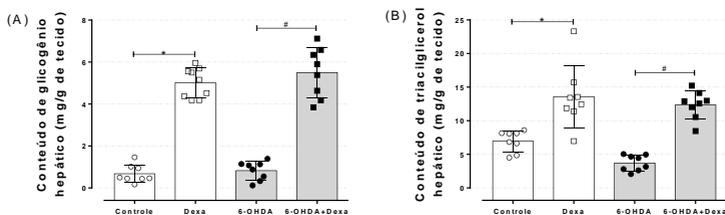


Figura 18. Parâmetros hepáticos. (A) Conteúdo de glicogênio hepático. (B) Conteúdo de triacilglicerol hepático. Dados são média \pm DP. O símbolo “*” indica diferença significativa em relação ao grupo Controle, enquanto que “#” diferença em relação ao grupo 6-OHDA. Utilizado ANOVA de duas vias com *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 8-9$.

Na avaliação histológica qualitativa (Figura 19), 88,8% das lâminas do grupo Dexa e 100% das lâminas do grupo 6-OHDA+dexa tiveram acúmulo de glicogênio e triacilglicerol hepático, como apresentado nas imagens a seguir pelos vacúolos em branco.

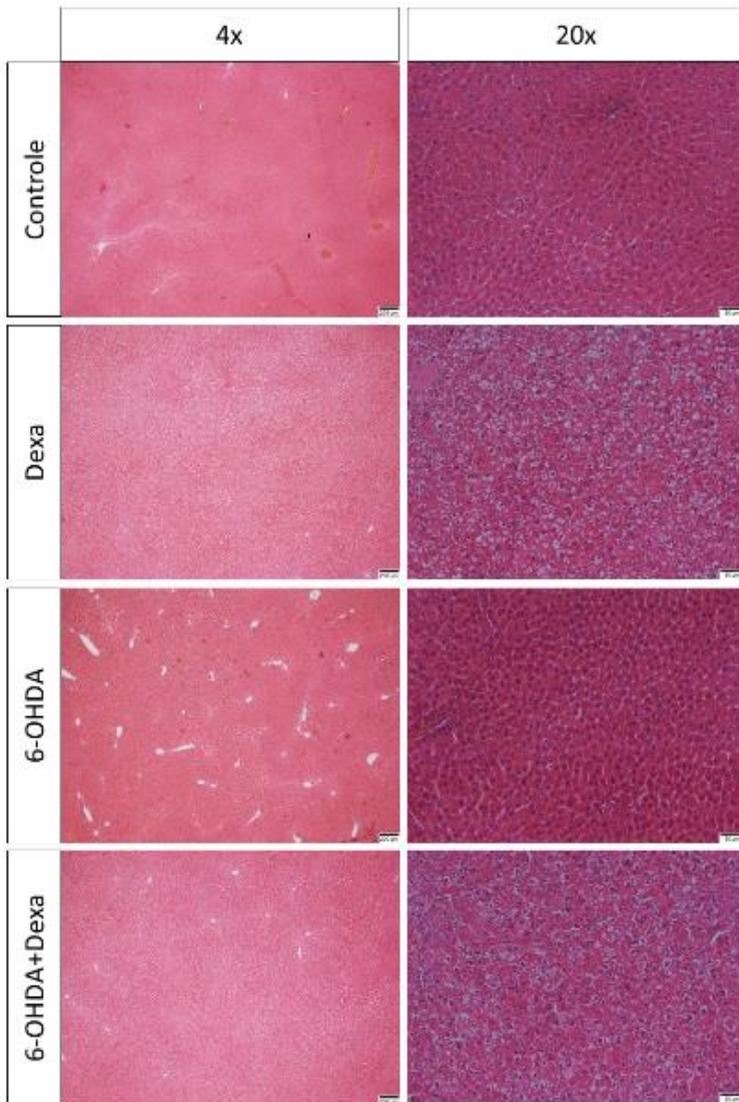


Figura 19. Imagens representativas do fígado nos grupos experimentais Controle, Dexa, 6-OHDA e 6-OHDA+dexa. Hematoxilina & Eosina, escala em 4x representa 200 μm , enquanto a escala em 20x representa 50 μm .

No grupo 6-OHDA foi observado acúmulo de glicogênio e triacilglicerol em 12,5% das secções analisadas e como esperado nenhum fígado do

grupo Controle teve acúmulo de glicogênio e triacilglicerol (Figura 20 e Tabela 1).

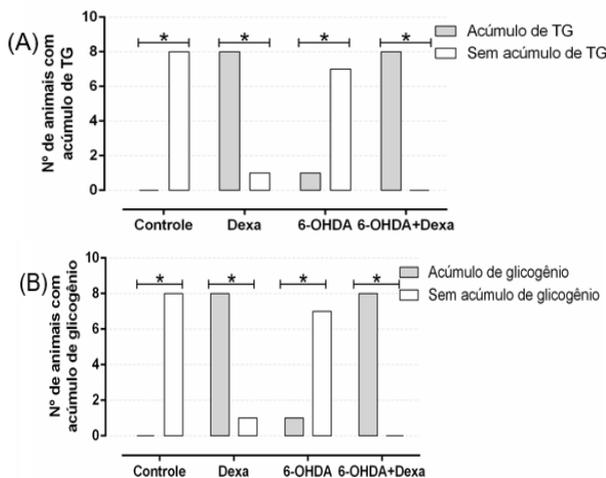


Figura 20. Acúmulo de triacilglicerol e glicogênio hepáticos nos 4 grupos experimentais analisados. $p < 0,05$, $n = 8-9$. Utilizado Qui-quadrado, $p < 0,05$, $n = 8-9$.

5.3.5. Adiposidade e órgão metabólicos

Após a perfusão e conseqüente eutanásia dos animais, a massa relativa das gorduras e dos órgãos metabólicos foi quantificada. Não foi possível observar diferença na adiposidade nos 3 tecidos adiposos analisados: gordura omental (Figura 21A), epididimal (Figura 21B) e retroperitoneal (Figura 21C). No entanto, os animais tratados com dexametasona, grupo Dexa e 6-OHDA+dexa, apresentaram uma tendência de aumento da massa relativa do fígado, quando comparados ao grupo Controle e 6-OHDA, respectivamente (Figura 21D). Além disso, foi possível observar que a massa das glândulas adrenais também foi menor no grupo 6-OHDA+Dexa em comparação com o grupo 6-OHDA (Figura 21F). Por fim, não foi possível observar diferenças entre a massa relativa do baço nos 4 grupos analisados (Figura 21E).

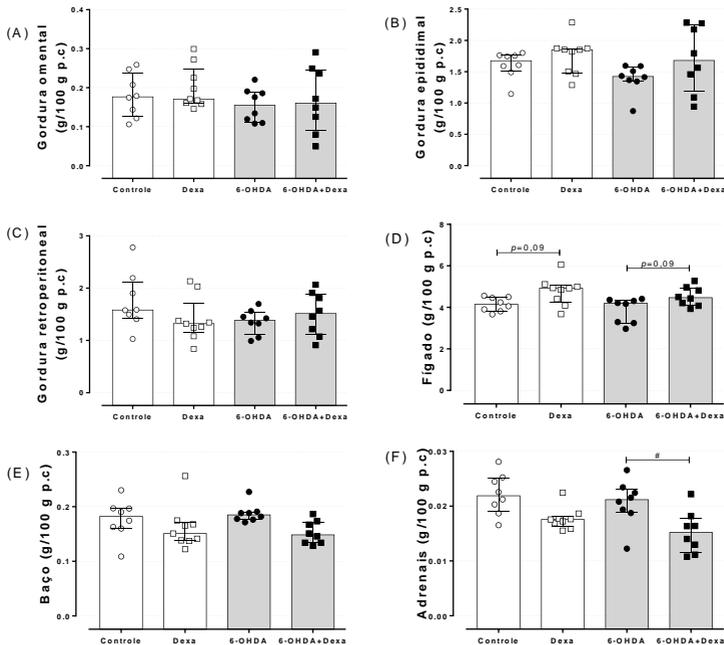


Figura 21. Massa relativa dos órgãos coletados. (A) gordura omental. (B) gordura epididimal. (C) gordura retroperitoneal. (D) Fígado. (E) Baço. (F) Adrenais. (A-F) Dados mediana e intervalo interquartil. O símbolo “*” indica diferença em relação ao grupo Controle, enquanto que “#” indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA. (A-F) *Kruskal-Wallis* com *post hoc* de *Dunn*, $p < 0,05$, $n = 8$.

5.3.6 Massa de pâncreas endócrino

Não existiu diferença na massa relativa do pâncreas dos 4 grupos experimentais analisados (Figura 22A). A partir das secções pancreáticas (Figura 23) foi possível demonstrar o aumento da massa relativa das ilhotas pancreáticas nos grupos tratados com a dexametasona (Dexa e 6-OHDA+dexa) (Fig. 22B). O tratamento com 6-OHDA não teve nenhum efeito *per se*. O aumento da massa relativa não esteve acompanhado do aumento da densidade de ilhotas pancreáticas nos 4 grupos experimentais,

implicando em hiperplasia e/ou hipertrofia das células β e não em formação de novas ilhotas.

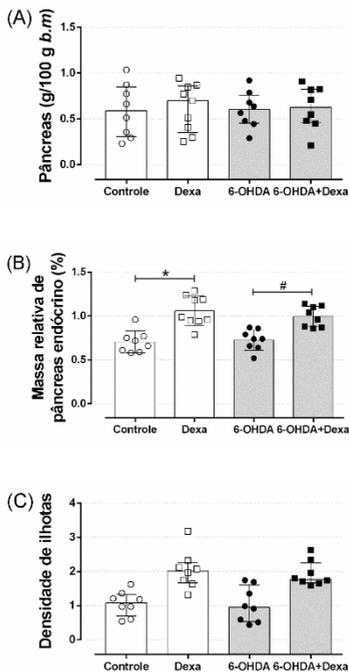


Figura 22. Massa de pâncreas endócrino. (A) Massa relativa do pâncreas. (B) Massa de pâncreas endócrino. (C) Densidade de ilhotas pancreáticas. Dados são média \pm DP. O símbolo “*” indica diferença em relação ao grupo Controle, enquanto que “#” indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA. Utilizado ANOVA de duas vias com *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$, $n = 8-9$.

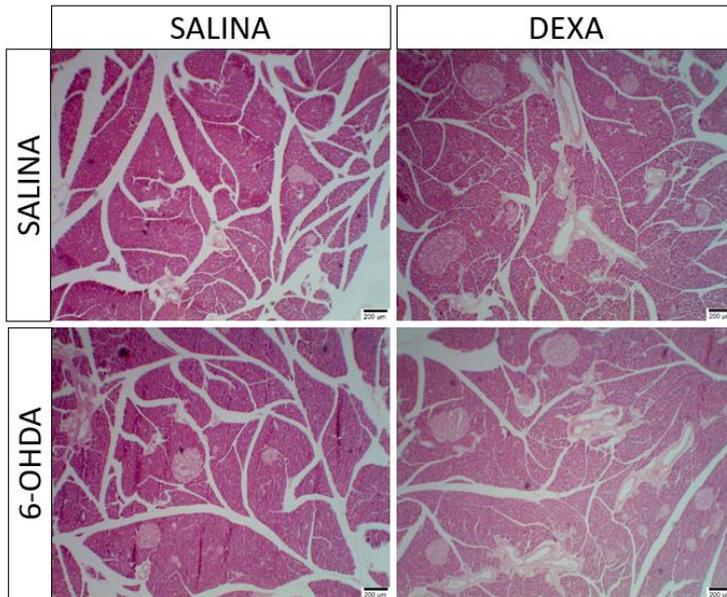


Figura 23. Imagens representativas do pâncreas nos grupos experimentais Controle, Dexa, 6-OHDA e 6-OHDA+dexa. Coloração: Hematoxilina & Eosina. Escala em objetiva de 4x representa 200 µm.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi investigado o impacto da administração bilateral da 6-OHDA no estriado de ratos, sobre possíveis desfechos metabólicos. O modelo de administração bilateral foi utilizado com o objetivo de promover um prejuízo motor mais robusto e consistente, o que facilita a detecção de possíveis problemas na homeostase glicêmica ou lipídica. Nessa abordagem, a administração da 6-OHDA no estriado é capaz de promover uma lesão que evolui gradualmente da via nigrostriatal, 1 dia após a realização do procedimento estereotáxico, até as células nigrais, 1 semana pós-injeção, atingindo a degeneração máxima entre 2–3 semanas (SAUER, OERTEL, 1994; PRZEDBORSKI *et al.*, 1995; BLANDINI *et al.*, 2007). Somado a isso, a dose de 20 µg administrada no estriado é capaz de promover uma perda de 20% a 85% das células dopaminérgicas da SNpc e 60–90% no estriado, 2 semanas após a realização do procedimento cirúrgico (PRZEDBORSKI *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1996; KIRIK *et al.*, 1998; BLANDINI *et al.*, 2007).

Na PD há extensa perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc, resultando em um declínio nas concentrações de dopamina do estriado, gerando uma série de deficiências motoras tais como rigidez, tremor e perda do reflexo postural (BEAL, 2005; RIEDERER, WUKETICH, 1976). Em estudos *in vivo*, a perda dopaminérgica, resultante da ação da 6-OHDA, e a confirmação dos prejuízos motores podem ser realizadas através da análise de comportamentos motores supramencionados. Em nosso estudo, demonstramos que a infusão de 6-OHDA no estriado dorsolateral em ratos promoveu prejuízos motores tais como diminuição da atividade exploratória aos 7 e 35 dias após a administração de 6-OHDA. Matheus e colaboradores (2015) mostraram que a administração bilateral de 20 µg no estriado dorsolateral de ratos promove prejuízos na locomoção espontânea, visualizados pelo teste do campo aberto, 21 dias após a inoculação da toxina. Além disso, Hegazy e colaboradores (2017) mostraram que a administração intraestriatal unilateral de 10 µg de 6-OHDA também foi capaz de produzir diminuição na locomoção e no comportamento exploratório de ratos Wistar machos, observados 3 semanas após o tratamento com a toxina. Outros estudos também mostraram que a administração unilateral de 20 µg e bilateral de 15 µg no estriado, promove déficit na locomoção e no comportamento exploratório de ratos (ARAÚJO *et al.*, 2013; RAMPERSAUD *et al.*, 2012). Além do prejuízo locomotor e exploratório, a coordenação motora também foi

comprometida em nossos ratos 6-OHDA. Tal impacto também foi demonstrado em ratos 1 semana após a administração unilateral de 28 µg ou bilateral de 20 µg de 6-OHDA (MONVILLE, TORRES & DUNNETT, 2006; KUMAR *et al.*, 2012). Assim, os dados motores obtidos em nosso estudo com os ratos 6-OHDA estão em acordo com os estudos supracitados demonstrando a validade de nosso modelo. Além disso, nossos dados também são corroborados por dados da literatura a respeito da manutenção do déficit motor (RAMPERSAUD *et al.*, 2012; MATHEUS *et al.*, 2016), observado nos 35 dias do protocolo experimental.

Evidências sugerem que 7 dias de tratamento com dexametasona (1 mg/kg) em camundongos pode inibir parcialmente a ativação microglial, através da atenuação da produção de citocinas pró-inflamatórias, protegendo contra a degeneração de neurônios dopaminérgicos em modelos *in vivo* da doença de Parkinson, o que poderia resultar em uma melhora do quadro motor (CASTANO *et al.*, 2002; KURKOWSKA-JASTRZEBSKA *et al.*, 2004). No entanto, não observamos diferenças nos testes comportamentais realizados no 35º dia do protocolo experimental (4º dia de exposição ao glicocorticoide) nos animais tratados com dexametasona e seus respectivos controles. Isso pode ser explicado, pois nosso delineamento experimental não introduziu o glicocorticoide de maneira preventiva, ou seja, anteriormente a lesão dopaminérgica, como observado nos trabalhos supracitados (CASTANO *et al.*, 2002; KURKOWSKA-JASTRZEBSKA *et al.*, 2004).

Os dados murinométricos obtidos em nosso estudo não revelaram qualquer impacto da administração de 6-OHDA na massa corporal e na ingestão alimentar. O sistema dopaminérgico nigrostriatal desempenha um papel essencial na regulação do apetite e do peso corporal (UNGERSTEDT, 1971; FIBIGER, ZIS & MCGEER, 1973; LÉNÁRD, 1977). Estudos demonstraram que pacientes com PD tendem a perder peso com a progressão da doença, apresentando um peso corporal menor quando comparados com a população controle de idade correspondente (BEYER *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 2003; LOREFÄLT *et al.*, 2006). Além disso, evidências em modelos animais sugerem que lesões dopaminérgicas superiores a 95% promovem adipsia e hipofagia (UNGERSTEDT, 1971; SAKAI, GASH, 1994). No entanto, as coordenadas utilizadas na cirurgia estereotáxica, favorecem a lesão

estriatal, sendo assim, de menor intensidade e com desenvolvimento mais lento o que pode ter impossibilitado a observação dessas alterações.

Já por efeito do glicocorticoide, os grupos tratados com dexametasona apresentaram redução de peso corpóreo ao final do tratamento. Essa perda de peso causada pelo tratamento com dexametasona já é bastante demonstrada. De vos e colaboradores (1995), mostraram que ratos tratados uma vez ao dia, durante 20 dias, com uma dose subcutânea de hidrocortisona (1, 10 e 100 $\mu\text{g/g/dia}$) apresentaram uma diminuição no peso corporal e na ingestão alimentar. Outros trabalhos mostraram que a administração subcutânea de dexametasona nas doses de 0,1, 0,5 e 1 mg/kg/dia, durante 5 dias, foi capaz de promover uma redução da ingesta alimentar e do peso corpóreo (RAFACHO *et al.*, 2008). Tais eventos são observados, pois os glicocorticóides podem promover: i) a redução do peso corpóreo, através da supressão da osteoblastogênese, assim como pela apoptose de osteoblastos, diminuindo a densidade óssea (MANOLAGAS, WEINSTEIN 1999; TACK *et al.*, 2016), ii) aumento da lipólise no tecido adiposo e do efeito catabólico sobre o tecido muscular, o que pode auxiliar na diminuição do peso corporal (FRANCO-COLIN *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2012), iii) diminuição da expressão dos neuropeptídeos orexígenos NPY e AGRP, o que explica, em partes, a diminuição da ingestão alimentar e do peso corporal (LIU *et al.*, 2011); iv) aumento das concentrações de insulina e leptina plasmáticas que atuam em sinergia no núcleo arqueado promovendo a saciedade (RAFACHO *et al.*, 2008; CALDEFIE-CHÉZET *et al.*, 2001) e v) balanço hídrico negativo (THUNHORST, BELTZ & JOHNSON 2007).

A administração da 6-OHDA também não afetou de forma significativa a tolerância à glicose nem a sensibilidade à insulina. Exceto pelo incremento da glicemia nos minutos 30 após sobrecarga de glicose no 7º dia em ratos 6-OHDA, quando comparados ao grupo Controle. No entanto, essa diferença não persistiu ao longo do tempo, como observado no segundo ipGTT realizado aos 22 dias após a cirurgia estereotáxica. Além disso, não foi possível observar alterações nos dados de área-sob-a-curva, tanto no primeiro quanto no segundo ipGTT. No que tange à interpretação dos dados obtidos com os ITTs, não foi possível observar diferenças na sensibilidade à insulina no grupo 6-OHDA, quando comparado ao grupo Controle. Sendo assim, é possível afirmar que essa elevação transitória na glicemia ao minuto 30 do primeiro ipGTT não

indica uma redução da tolerância à glicose e tal fato não foi observado nos dois momentos subsequentes (22º e 35º dia do protocolo experimental).

Alguns estudos tentaram apresentar alguma associação entre PD e prejuízos na homeostase glicêmica, no entanto, são raras as evidências em modelo de experimentação animal. Já foi observado um aumento na fosforilação em serina do substrato do receptor de insulina 2 (IRS2), após a depleção de dopamina induzida pela administração unilateral de 12 µg de 6-OHDA na SNpc de ratos, resultando em um prejuízo da sinalização da insulina no estriado (WHITE, 2002; MORRIS *et al.*, 2008,2011). No entanto, os pesquisadores não observaram alterações na tolerância periférica à glicose, corroborando os dados relatados em nosso estudo.

Na última semana do protocolo experimental foi realizado o terceiro ipGTT e ipITT. Neste momento, os grupos dexametasona, Dexa e 6-OHDA+Dexa, estavam no 5º e 6º dia do tratamento com glicocorticoide, respectivamente. O tratamento com a 6-OHDA não causou nenhuma modificação nestes parâmetros, não exacerbando a intolerância à glicose e a resistência à insulina causada pelo tratamento com o GC. Como já mencionado anteriormente, o efeito do GC sobre a tolerância à glicose e atenuação da sensibilidade à insulina já foi descrito em diversos trabalhos experimentais (SCHNEITER, TAPPY 1998; KIMURA *et al.*, 2000; VAN RAALTE *et al.*, 2010; RAFACHO *et al.*, 2008). Diversos mecanismos medeiam essa alteração na homeostase glicêmica, dentre eles a supra regulação hepática da gliconeogênese, através da estimulação da expressão do gene PEPCK e G6Pase, desempenha um papel importante nas condições de resistência à insulina relacionada com o excesso de GC (PASIEKA, RAFACHO, 2016).

A diminuição da sensibilidade à insulina, após o tratamento com dexametasona, esteve acompanhada de um aumento das concentrações plasmáticas de insulina e de aumento da massa relativa das ilhotas pancreáticas em ambos os grupos tratados com dexametasona. Isso ocorre como resultado de uma resposta compensatória das células β-pancreáticas, diante deste contexto de resistência à insulina causada pelo excesso de GC, que mantém normoglicemia como observado no minuto 0 do ipGTT (RAFACHO *et al.*, 2011; RAFACHO, BOSCHERO, & ORTSÁTER, 2012). No entanto, a hiperinsulinemia não foi suficiente para prevenir a intolerância à glicose visualizada após a sobrecarga de

glicose durante o ipGTT e isso encontra respaldo em estudos anteriores onde mesmo à uma dada hiperinsulinemia não foi possível evitar a intolerância à glicose (RAFACHO *et al.*, 2008, ANGELINI *et al.*, 2010, GIOZZET *et al.*, 2008).

Como um prejuízo na homeostase glicêmica pode ser seguido por um desequilíbrio na homeostase lipídica, foram avaliados alguns componentes do metabolismo lipídico (NOVELLI *et al.*, 1999; RAFACHO *et al.*, 2008). O tratamento com GC resultou em aumento dos níveis circulantes de triacilglicerol, com paralelo aumento no conteúdo de gordura hepática, corroborando dados presentes na literatura. Estudos mostraram que os GCs podem aumentar os níveis séricos de TG, por meio da inibição da lipoproteína lipase no tecido adiposo (BAGDADE, ALBERS & PYKALISTO, 1976; FRANCO-COLIN *et al.*, 2000). No entanto, o aumento das concentrações séricas de insulina não foi suficiente para evitar a hipertrigliceridemia. É importante salientar que a presença dos déficits motores evocados pela administração bilateral de 6-OHDA não afetaram os parâmetros lipídicos nem exacerbaram os desfechos dos GCs. Além disso, dados da literatura sugerem que os GCs promovem lipogênese e adipogênese em tecido adiposo visceral e redução do tecido adiposo periférico, devida à sua ação lipolítica (RAFACHO *et al.*, 2014). Porém, não foi possível observar alterações dos compartimentos de gordura analisados (gordura omental, epididimal e retroperitoneal). O processo de perfusão, pode ter mascarado a visualização destas alterações, uma vez que os tecidos menos sólidos, como as gorduras, foram capazes de reter a solução utilizada para o procedimento de perfusão. Também foi possível observar que a toxina 6-OHDA, não promoveu alterações nos componentes lipídicos circulantes, assim como na massa relativa dos depósitos de gordura.

A relação entre neurodegeneração e desfechos metabólicos é complexa e influenciada por inúmeros fatores, que tornam difícil definir com precisão o(s) fator(es) causal(is). Por exemplo, existe evidência ligando a gravidade da neurodegeneração causada por 6-OHDA com um prejuízo metabólico prévio (isto é, obesidade induzida por dieta) em ratos (MORRIS *et al.*, 2010). Da mesma forma, há também evidências ligando a inflamação do hipotálamo, desencadeada pela infusão de oligômeros A β , com a posterior disfunção na homeostase metabólica (CLARKE *et al.* 2015), sugerindo uma relação entre componentes centrais e periféricos.

Com nosso desenho experimental atual, definimos o fator independente (tratamento com 6-OHDA) e, em seguida, consideramos todos os desfechos metabólicos como variáveis dependentes e, ao fazer isso, tentamos isolar o máximo possível o fator causal. Evidências recentes demonstraram a relação entre distúrbios metabólicos e consequente prognóstico negativo para PD. Por exemplo, a coexistência de DM2 com PD leva a uma progressão motora mais rápida e declínio cognitivo (PAGANO *et al.*, 2018), bem como à redução da disponibilidade de transporte de dopamina no estriado caudado e ventral que estão associados à desempenhos cognitivos reduzidos (CHUNG *et al.*, 2018) quando comparado ao paciente com apenas PD. Além disso, o conteúdo da tau e da α -sinucleína no líquido cefalorraquidiano é maior em pacientes com PD e DM2 em relação aos pacientes apenas com PD, e esses marcadores já são supra regulados em pacientes com DM2 em comparação à controles saudáveis (PAGANO *et al.*, 2018), indicando uma relação entre os marcadores da PD e DM2. Essa relação mútua é reforçada quando se considera os benefícios de alguns antidiabéticos (isto é, agonistas do peptídeo semelhante a glucagon-1 e inibidores da dipeptidil peptidase-4) no processo neurodegenerativo em pacientes com DP (ASHRAGUI *et al.*, 2016).

Um estudo recente conduzido por ter Horst *et al.* (2018) revelou que a estimulação cerebral bilateral visando o núcleo accumbens (NAc) melhora alguns aspectos metabólicos de pacientes com diabetes (isto é, melhora a sensibilidade à insulina periférica). Este estudo também demonstrou que a depleção farmacológica da dopamina diminui a sensibilidade à insulina, enquanto a ativação optogenética dos neurônios do receptor dopaminérgico-1 do NAc melhora a tolerância à glicose em camundongos, sugerindo que a sinalização da dopamina do estriado desempenha um papel no metabolismo da glicose.

7. CONCLUSÃO

Assim, concluímos que a lesão bilateral no estriado dorsolateral com 6-OHDA causa déficits motores persistentes e não promove qualquer impacto sobre a homeostase glicêmica e lipídica bem como não exacerba qualquer efeito adverso causado pelo excesso de GC no metabolismo glicêmico e lipídico. Essas observações sugerem que a neurodegeneração dos circuitos dopaminérgicos não promove prejuízos metabólicos.

8. PERSPECTIVAS

Para pesquisas futuras, algumas abordagens são sugeridas com o intuito de refinar o modelo: I) seria a administração bilateral de 6-OHDA em regiões que são capazes de promover maior neurodegeneração dopaminérgica capaz de revelar possíveis desfechos na homeostase metabólica; II) ou seria a utilização de modelo animal genético uma alternativa para a visualização de possíveis alterações na homeostase glicêmica e lipídica? Haja vista que podem mimetizar melhor a PD, quando comparados à modelos que utilizam toxinas e; III) poderiam as alterações periféricas preceder as alterações centrais?

9. DESAFIOS ENCONTRADOS

Durante esses dois anos de muito trabalho, alguns desafios apareceram durante a execução do projeto. Logo no início do protocolo experimental, foi realizado o procedimento estereotáxico, o qual requer um certo grau de conhecimento sobre neuroanatomia e intensa prática para a correta execução, pois a inoculação da toxina em áreas cerebrais não correspondentes à área de estudo, impossibilitaria a visualização dos desfechos motores, inviabilizando o modelo experimental. Além disso, o tempo investido na padronização dos testes comportamentais e montagem da sala para realização dos experimentos motores, visto que o nosso laboratório não possuía um ambiente padronizado para a execução das metodologias de avaliação motora.

Podemos citar também as imuno-histoquímicas dos encéfalos, para a avaliação da perda dopaminérgica, e do pâncreas, para marcação e quantificação das células β pancreáticas, que estavam presentes, inicialmente, no cronograma experimental. Tais metodologias foram realizadas, no entanto, sem sucesso, devido à inexperiência na realização dos protocolos ou em etapas anteriores, como a utilização do criostato para realização de cortes na substância negra.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, K.G.; ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; International atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. **Circulation**. v. 120, p.1640-1645, 2009.

ALONSO-MAGDALENA, P.; QUESADA, I.; NADAL, A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, v.7, p.346-353, 2011.

ALVES, G.; LARSEN, J.P.; EMRE, M. et al. Changes in motor subtype and risk for incident dementia in parkinson's disease. **Mov Disord**, v.21, p.1123– 1130, 2006.

ANGELINI, N.; RAFACHO, A.; BOSCHERO A.C. et al. Involvement of the cholinergic pathway in glucocorticoid-induced hyperinsulinemia in rats. **Diabetes Res Clin Pract**, v87, p.184–191, 2010.

ARAÚJO, D.P.; de SOUSA, C.N.S.; ARAÚJO, P.V.P. et al. Behavioral and Neurochemical Effects of Alpha-Lipoic Acid in the Model of Parkinson's Disease Induced by Unilateral Stereotaxic Injection of 6-OHda in Rat. **Evid. Based Complement**, 2013.

ARNALDI, G.; SCANDALI, V.M.; TREMENTINO, L. et al. Pathophysiology of Dyslipidemia in Cushing's Syndrome. **Neuroendocrinology**, v.92, p.86–90, 2010.

BACKER, J.M.; MYERS, M.G.; SHOELSON, S.E. et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **Embo J**, v.11, p.3469-3479, 1992.

BAGDADE, J.D.; ALBERS, E.Y.J.; PYKALISTO, O.J. Glucocorticoids and triglycerides transport: effects on triglyceride secretion rates, lipoprotein lipase, and plasma lipoproteins in the rat. **Metabolism**, v.25, p.533-542, 1976.

BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D.P. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community- based survey in Brazil (the Bambuí study). **Mov Disord**, v.21, p.800-808, 2006.

BEAL, M.F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. **Ann Neurol**, v.58, p.495-505, 2005.

BECKER, C.; BROBERT, G.P.; JOHANSSON, S. et al. Diabetes in patients with idiopathic Parkinson's disease. **Diabetes Care**, v.31, p.1808–1812, 2008.

BEYER, P.L. et al. Weight change and body composition in patients with Parkinson's disease. **J Am Diet Assoc**, v.95, p.979–983, 1995.

BLANDINI, F.; LEVANDIS, G.; BAZZINI, E. et al. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. **Eur J Neurosci**, v.25, p.397–405, 2007.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. **Parkinsonism Relat Disord Suppl**, v.2, p.124-129, 2008.

BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Front Neuroanat**, v.8, 2014.

BOLAM, J. P.; PISSADAKI, E. K. Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. **Mov Disord**, v. 27, p.1478–1483, 2012.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RÜB, U. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, v.24, p.197–211, 2003.

BURÉN, J.; LAI, Y.C.; LUNDGREN, M. et al. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v.474, p.91-101, 2008.

CHEN, H.; ZHANG, S.M.; HERNÁN, M.A. et al. Weight loss in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v.53, p.676–9, 2003.

DE VOS P.; SALADIN, R.; AUWERX, J. et al. Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. **J Biol Chem**, v.270, p.15958-15961, 1995.

CHIUEH, C.C.; MARKEY, S.P.; BURNS R.S. et al. Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) in rat, guinea pig, and monkey. **Psychopharmacol Bull**, v.20, p.548–553, 1984.

JOHNSON, C. C. et al. Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease. **Int J Epidemiol**, v.28, p.1102–1109, 1999.

CALDEFIE-CHÉZET, F.; MOINARD, C.; MINET-QUINARD, R. et al. Dexamethasone Treatment Induces Long-Lasting Hyperleptinemia and Anorexia in Old Rats. **Metabolism**, v.50, p.1054-1058, 2001.

CANI, P.D.; GEURTS L.; MATAMOROS S. et al. Glucose metabolism: Focus on gut microbiota, the endocannabinoid system and beyond. **Diabetes Metab**, v.40, p.246–257, 2014.

CHAUDHURI, K.R.; HEALY, D.G.; SCHAPIRA, A.H. National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, v.5, p.235-245, 2006.

CLARKE, J.R.; LYRA, E.; SILVA, N.M. et al. Alzheimer-associated Ab oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. **EMBO Molecular Medicine**, v.7, p.190–210, 2015.

RANGEL-BARAJAS, C.; CORONEL, I.; FLORÁN, B. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. **Aging and Disease**, v.6, p.349-368, 2015.

CRAFT, S. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. **Curr Alzheimer Res**, v.4, p.147–152, 2007.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v.39, p.889–909, 2003.

DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; ELEWAUT, D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. **Current Opinion in Pharmacology**, v.10, p.497–504, 2010.

DE LAU, L.M.L.; BRETELER, M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v.5, p.525-535, 2006.

DE MIRANDA, B.R.; VAN, HOUTEN B., SANDERS, L.H. Mitochondrial Mechanisms of Degeneration and Repair in Parkinson's Disease. Springer International Publishing, 2016.

DEARBORN, J.L. The metabolic syndrome and cognitive decline in the Atherosclerosis Risk in Communities study (ARIC). **Dement Geriatr Cogn Disord**, v.38, p.337–46, 2014.

DEHAY, B.; BOVÉ, J.; RODRÍGUEZ-MUELA, N. et al. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. **J. Neurosci**, V.30, p.12535–12544, 2010.

DIMITRIADIS, G.; LEIGHTON, B.; PARRY-BILLINGS, M. et al. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. **Biochem J**, v.321, p.707–712, 1997.

DORSEY, E.R. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v.68, p.384–386, 2006.

CAIN, D.W.; CIDLOWSKI, J.A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nat Rev Immunol**, v.17, p.233-247, 2017.

DAYAN, E.; SKLEROV, M.; BROWNER, N. Disrupted hypothalamic functional connectivity in patients with PD and autonomic dysfunction. **Neurology**, v.0, p.1-8, 2018.

NUNES, E.A.; RAFACHO, A. Implications of Palmitoleic Acid (Palmitoleate) On Glucose Homeostasis, Insulin Resistance and Diabetes. **Current Drug Targets**, v.17, p. 619-628, 2016.

FAIN, J.N.; MADAN, A.K.; HILER, M.L. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v.145, p.2273-2282, 2004.

FEARNLEY, J. M.; LEES, A. J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain**, v.114, p.2283-2301, 1991.

FERREIRA, S.T.; KLEIN, W.L. The Abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiol Learn Mem**, v.96: 529-543, 2011.

FIBIGER, H. C.; ZIS, A. P.; MCGEER, E. G. Feeding and drinking deficits after 6-hydroxydopamine administration in the rat: similarities to the lateral hypothalamic syndrome. **Brain Res**, v.55, p.135-148; 1973.

FRANCO-COLIN, M.; TELLEZ-LOPEZ, A.M.; QUEVEDO-CORONA, L. et al. Effects of long-term high-sucrose and dexamethasone on fat depots, liver fat, and lipid fuel fluxes through the retroperitoneal adipose tissue splanchnic area in rats. **Metabolism**, v.49, p.1289-1294, 2000.

GAO, H.M.; LIU, B.; ZHANG, W. et al. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **Trends Pharmacol. Sci**, v.24, p.395-401, 2003.

GAO, H. M. et al. Neuroinflammation and oxidation/ nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. **J. Neurosci**, v.28, p.7687-7698, 2008.

GERICH, J.E.; KOTZBAUER, P.T.; URYU, K. et al. Characterization of the glucagon response to hypoglycemia in man. **J Clin Endocrinol Metab**, v.38, p.77-82, 1974.

GOLDMAN, S.M.; QUINLAN, P.J.; ROSS, G.W. et al. Solvent exposures and parkinson disease risk in twins. **Ann Neurol**. 2011.

GOLDMAN, S.M. Trichloroethylene and Parkinson's disease: dissolving the puzzle. **Expert Rev Neurother**, v.10, p.835–837, 2010.

GONZALEZ-HERNANDEZ, T.; BARROSO-CHINEA, P.; DE LA CRUZ MUROS I. et al. Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. **J Comp Neurol**, v.479, p.198–215, 2004.

GORELL, J.M.; JOHNSON, C.C.; RYBICKI, B.A. et al. Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. **Neurology**, v.48, p.650–658, 1997.

GORELL J. et al. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**. v.20, p.239–247, 1999.

GRAVENA, C.; MATHIAS, P.C.; ASHCROFT, S.J. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. **J Endocrinol**, v.173, p.73-80, 2002.

HAJJAR, I.; JOHNSON, C.C.; RYBICKI, B.A. et al. Hypertension, white matter hyperintensities, and concurrent impairments in mobility, cognition, and mood: the Cardiovascular Health Study. **Circulation** v.123, p.858–865, 2011.

HALBAN, P.A.; POLONSKY, K.S.; BOWDEN, D.W. et al. Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. **Diabetes Care**, v.37, p.1751-1758, 2014.

HALBERG, N.; WERNSTEDT-ASTERHOLM; SCHERER, P.E. The adipocyte as an endocrine cell. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.37, p.753-768, 2008.

HEGAZYA, M.A.; MAKLAD, H.M.; SAMY, D.M. et al. Cerium oxide nanoparticles could ameliorate behavioral and neurochemical impairments in 6-hydroxydopamine induced Parkinson's disease in rats. **Neurochem Int**, v.108, p.361-371, 2017.

HIRSCH, E.C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **Lancet Neurol**, v.8, p.382–397, 2009.

HO, L.; QIN, W.; POMPL, P.N. et al. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **FASEB J**, v.18, p.902–904, 2004.

HORST, K.W; LAMMERS, N.M; TRINKO, R. et al. Striatal dopamine regulates systemic glucose metabolism in humans and mice. **Sci Transl Med**, v.10, I.442

HU, G.; JOUSILAHTI, P.; BIDEL, S. et al. Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. **Diabetes Care** v.30, p.842–847, 2007.

HU, M.T.; SZEWCZYK-KRÓLIKOWSKI, K.; TOMLINSON, P. et al. Predictors of cognitive impairment in an early stage Parkinson's disease cohort. **Mov Disord** v.29, p.351–359, 2014.

HUANG, S.; CZECH, M.P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metab**, v.5, p.237-52, 2007.

HUNOT S, HIRSCH EC. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Ann. Neurol** v.53, p.49–58, 2003.

HUNTER, S.J.; GARVEY, W.T. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. **Am J Med**, v.105, p.331-345, 1998.

MOKUDA, O.; SAKAMOTO, Y.; IKEDA, T. et al. Sensitivity and Responsiveness of Glucose Output to Insulin in Isolated Perfused Liver from Dexamethasone-Treated Rats. **Horm. Metab**, v.23, p.53–55, 1991.

JACKSON-LEWIS, V.; BLESÁ, J.; PRZEDBORSKI, S. Animal models of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v.18, p.183–185, 2012.

JANESICK A, BLUMBERG B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v.93, p.34-50, 2011.

KAHN, S.E.; HULL, R.L.; UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature** v.444, p.840-846, 2006.

KAHN, S.E.; PRIGEON, R.L.; MCCULLOCH, D.K. et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. **Diabetes**, v.42 p.1663-1672, 1993.

KANETY, H. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. **J Biol Chem**, v.270, p.23780-23784, 1995.

KARLSSON, S.; OSTLUND, B.; MYRSÉN-AXCRONA, U. et al. Beta cell adaptation to dexamethasone-induced insulin resistance in rats involves increased glucose responsiveness but not glucose effectiveness. **Pancreas**, v.22, p.148–156, 2001.

KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. Proteostasis and aging. **Nat. Med**, V.21, p.1406–1415 2015.

KELLETT, G.L. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. **Annu Rev Nutr** v.28, p.35-54, 2008.

KELLEY, D.E.; HE, J.; MENSHIKOVA, E.V. et al.: Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes** v.51, p.2944–2950, 2002.

KIDO, Y.; NAKAE, J.; ACCILI, D. The insulin receptor and its cellular targets. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.972-979, 2001.

KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BJORKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Exp Neurol**, v.152, p.259–277, 1998.

- KIMURA, M.; DAIMON, M.; TOMINAGA, M. et al. Thiazolidinediones exert different effects on insulin resistance between dexamethasone-treated rats and wistar fatty rats. **Endocr. J**, v.47, p.21–28, 2000.
- KLEGERIS, A.; MCGEER, E.G.; MCGEER, P.L. Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease. **Curr. Opin. Neurol**, v.20, p.351–357, 2007.
- KLIMEK P.; KAUTZKY-WILLER, A.; CHMIEL, A. et al. Quantification of diabetes comorbidity risks across life using nationwide big claims data. **PLoS Comput Biol**, v11, 2015.
- KOTAGAL, V.; Albin, R.L.; Müller, M.L.T.M. et al. Diabetes is associated with postural instability and gait difficulty in Parkinson disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v.19, p.522–526, 2013.
- KUMAR, R.; AGARWAL, A. K.; SETH, P. K. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. **J. Neurochem**, v.64, p.1703–1707, 1995.
- KUMAR, A.; SHARMA, N.; GUPTA, A. et al. Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. **Brain Res**, v.1471, p.13-22, 2012.
- KUPSCH, A.; SCHMIDT, W.; GIZATULLINA, Z. 6-Hydroxydopamine impairs mitochondrial function in the rat model of Parkinson's disease: respirometric, histological, and behavioral analyses. **J Neural Transm** v.121, p.1245-1257, 2014.
- KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I.; LITWIN, T.; JONIEC, I. et al. Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease. *Int Immunopharmacol*, v.4, p.1307-1318, 2004.

LANGSTON, J.W.; BALLARD, P.; TETRUD, J.W. et al. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v.219, p.979–980, 1983.

LAU, L.M.; BRETELER, M.M. Epidemiology of Parkinson's disease, **Lancet Neurol** v.5, p.525–535, 2006.

LEE, C.S.; SAUER, H.; BJORKLUND, A. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Neuroscience**, v.72, p.641–53, 1996.

LÉNÁRD, L. Sex-dependent body weight loss after bilateral 6-hydroxydopamine injection into the globus pallidus. **Brain Res**, v.128, p.559-568; 1977.

LIU, X.Y.; SHI, J.H.; DU, W.H. et al. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rat. **Experimental And Therapeutic Medicine**, v.2, p.977-984, 2011.

LIX, L. M.; HOBSON, D.E.; AZIMAE, M. et al. Socioeconomic variations in the prevalence and incidence of Parkinson's disease: a population-based analysis. **J. Epidemiol Community Health**, v.64, p.335–340, 2010.

LOREFÄLT, B.; GANOWIAK, W.; WISSING, U. et al. Food habits and intake of nutrients in elderly patients with Parkinson's disease. **Gerontology**, v.52, p.160–168, 2006.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nat Rev Neurosci**, v.3, p.932–942, 2002.

Luthman J., Fredriksson A., Sundstrom E., Jonsson G. and Archer T.
Luthman J., Fredriksson A., Sundstrom E., Jonsson G. and Archer T.
Luthman J., Fredriksson A., Sundstrom E., Jonsson G. and Archer T.

LUTHMAN, J. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. **Behav Brain Res**, v.33, p.267-277, 1989.

MAITRA A, ABBAS AK. Endocrine system. In: Kumar V, Fausto N, Abbas AK (eds). Robbins and Cotran Pathologic basis of disease (7th ed). Philadelphia, Saunders; p.1156-1226, 2005.

MARCHETTI, B.; ABBRACCHIO, M.P. To be or not to be (inflamed) is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? **Trends Pharmacol Sci**, v.26, p.517–525, 2005.

MARCHETTI, B.; SERRA, P.A.; L'EPISCOPO, F. Hormones are key actors in gene x environment interactions programming the vulnerability to Parkinson's disease: glia as a common final pathway. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.1057, p.296–318, 2005.

MARCHETTI, B. Glucocorticoid receptor-nitric oxide crosstalk and vulnerability to experimental parkinsonism: pivotal role for glianeuron interactions. **Brain Res. Brain Res. Rev.** v.48, p.302–321, 2005.

MARTTILA R.; ARSTILA, P.; NIKOSKELAINEN, J. et al. Viral antibodies in the sera from patients with Parkinson disease. **Eur Neurol**, v.15, p.25-33, 1977.

MARTTILA, R.J.; RINNE, U.K. Herpes simplex virus antibodies in patients with Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v.35, p.375-379, 1978.

MATHEUS FC.; AGUIAR-JUNIOR, A.S.; CASTRO, A.A. et al. Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Behav Brain Res**, v.235, p.263-272, 2012.

MATHEUS, F.C. Dissociando anedonia e depressão na doença de Parkinson: papel do estriado dorsolateral e do córtex pré-frontal em um modelo experimental em ratos. **Dissertação de Doutorado (Farmacologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis**, 2015.

MATHEUS, F.C.; RIAL, D.; REAL, J.I. et al. Decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory

- deficits in 6-OHDA-lesioned rats. **Behav Brain Res**, v.301, p.43–54, 2016.
- MATTSON, M. P. Will caloric restriction and folate protect against AD and PD? **Neurology**, v.60, p.690–695, 2003.
- MATSCHINSKY, F.M. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v.45, p.223-241, 1996.
- MCGEER PL, ITAGAKI S, BOYES BE. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v.38, p.1285–1291, 1988.
- MCGEER, P.L.; MCGEER, E.G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord**, v.10, p.3–7, 2004.
- MCMAHON, M.; GERICH, J.; RIZZAT, R. - Effects of Glucocorticoids on Carbohydrate Metabolism. **Diabetes Metab. Rev**, v.4, p.17-30, 1988.
- MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocr. Rev**, v.32, p.81–151, 2011.
- MOKUDA, O.; SAKAMOTO, Y.; IKEDA, T. et al. Sensitivity and responsiveness of glucose output to insulin in isolated perfused liver from dexamethasone-treated rats. **Horm Metab Res**, v.23, p.53–55, 1991.
- MOLONEY, A.M.; GRIFFIN, R.J.; TIMMONS, S. et al. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. **Neurobiol Aging**, v.31, p.224–243, 2010.
- MORRIS, J.K.; BOMHOFF, G.L.; STANFORD, J.A. et al. Neurodegeneration in an animal model of Parkinson's disease is exacerbated by a high-fat diet. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.299, p.1082-1090, 2010.

MORRIS, J.K.; ZHANG, H.; GUPTE, A.A. et al. Measures of striatal insulin resistance in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Brain Res.** V.1240, p.185-195, 2008.

MUCKE, L.; SELKOE, D.J. Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2012.

MUNHOZ, R.P.; MORO, A.; SILVEIRA-MORIYAMA, L. Non-motor signs in Parkinson's disease: a review. **Arq. Neuropsiquiatr**, v.73, p.454-462, 2015.

NESHER, R.; ANTEBY, E.; YEDOVIZKY, M. et al. Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. **Diabetes**, v.51, p.68-73, 2002.

NOVELLI, M.; DE TATA, V.; BOMBARA, M. et al. Insufficient adaptive capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. **J Endocrinol**, v.162, p.425-432, 1999.

NUNES, E.A.; GONÇALVES-NETO, L.M.; FERREIRA, F.B. et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with β -hydroxy- β -methylbutyrate in rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.38, p.1137-1146, 2013.

neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine
neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine
neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine

OH, K.J.; HAN H.S.; KIM, M.J. et al. Transcriptional regulators of hepatic gluconeogenesis. **Arch Pharm Res**, v.36, p.189-200, 2013.

OLANOW C.W.; SCHAPIRA, A.H.; AGID, Y. Neuroprotection for Parkinson's disease: prospects and promises. **Ann. Neurol**, v.53, p1-2, 2003.

OLEFSKY, J.M.; GLASS, C.K.; Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annu Rev Physiol**, v.72, p.219-246, 2010.

PAGANO, G; POLYCHRONIS, S; WILSON, H. et al. Diabetes mellitus and Parkinson disease. **Neurology**. v.90, p.1654-1662, 2018.

PARKINSON J. An essay on the shaking palsy. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**. V.14, p.223-236, 2002.

PASIEKA, A.M.; RAFACHO, A. Impact of glucocorticoid excess on glucose tolerance: clinical and preclinical evidence. **Metabolites**, v.6, p.1-24, 2016.

PEARCE, J.M. Aspects of the history of Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, p.6–10, 1989.

PETERSEN, K.F. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. **Science**, v.300, p.1140–1142, 2003.

PINTER, B.; DIEM-ZANGERL, A., WENNING, G.K. et al. Mortality in Parkinson's disease: a 38-year follow-up study. **Mov Disord**, v.30, p.266–269, 2015.

PISSADAKI, E. K.; BOLAM, J. P. The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease. **Front Comput Neurosci**, v.7, p.1-17, 2013.

POST, B.; MERKUS, M.P.; DE HAAN, R.J. et al. Prognostic factors for the progression of Parkinson's disease: a systematic review. **Mov Disord**, v.22, p.1839–1851, 2007.

PRESSLEY, J.C.; LOUIS, E.D.; TANG, M.X. et al.: The impact of comorbid disease and injuries on resource use and expenditures in parkinsonism. **Neurology** v.60, p.87–93, 2003.

PRZEDBORSKI, S.; LEVIVIER, M.; JIANG, H. et al. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, v.67, p.631–647, 1995.

RAFACHO, A.; ORTSÄTER, H.; NADAL, A. et al. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: Implications for glucose

homeostasis, insulin resistance and diabetes. **J. Endocrinol**, v.223, p49–62, 2014.

RAFACHO, A.; BOSCHERO, A.C.; ORTSÄTER, H. Functional and Molecular Aspects of Glucocorticoids in the Endocrine Pancreas and Glucose Homeostasis. **State of the Art of Therapeutic Endocrinology**, p.121–152, 2012.

RAFACHO, A.; ABRANTES, J.L.; RIBEIRO, D.L.; et al. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats. **Horm Metab Res**, v.43, p.275–281, 2011.

RAFACHO, A.; GIOZZET, V.A.; BOSCHERO, A.C. et al. Functional Alterations in Endocrine Pancreas of Rats With Different Degrees of Dexamethasone-Induced Insulin Resistance. **Pancreas**, v.36, p.284–293, 2008.

RAMPERSAUD N.; HARKAVYI, A.; GIORDANO, G. et al. Exendin-4 reverses biochemical and behavioral deficits in a pre-motor 5 rodent model of Parkinson's disease with combined noradrenergic and serotonergic 6 lesions. **Neuropeptides** v.46, p.183–193, 2012.

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v.353, p.777–783, 2016.

REAVEN G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.33, p.283–303, 2004.

REBUFFE-SCRIVE M.; KROTKIEWSKI, M.; ELFVERSON, J. et al. Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v.67, p.1122–1128, 1988.

REBUFFE-SCRIVE M.; WALSH, U.A.; MCEWEN, B. et al. Effect of chronic stress and exogenous glucocorticoids on regional fat distribution and metabolism. **Physiol Behav**, v.52, p.583–590, 1992.

RIEDERER, P.; WUKETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential

factors in human brain amine analysis. **J Neural Transm** v.38, p.277–301, 1976.

RUZZIN, J.; WAGMAN, A.S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: Defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. **Diabetologia**, v.48, p.2119–2130, 2005.

SAAD, M.J.A.; FOLLI, F.; KAHN, J.A. et al. Modulation of Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Liver and Muscle of Dexamethasone-treated Rats. **Clin. Invest**, v.92, p.2065-2072, 1993.

SACHS, C.; JONSSON, G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. **Biochem. Pharmacol**, V.24, p.1–8, 1975.

SAKAI, K.; GASH, D.M. Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. **Brain Research**, v.633, p.144-150, 1994.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, **Insight review articles**, v.414, p.799-806, 2001.

SANTIAGO R.M.; BARBIERO, J.; GRADOWSKI, R.W. et al. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. **Behav Brain Res**, v.259, p.70-77, 2014.

SANTIAGO, J.A.; POTASHKIN, J.A.; Network-based metaanalysis identifies HNF4A and PTBP1 as longitudinally dynamic biomarkers for Parkinson's disease. **PNAS**, v.112, p.2257–2262, 2015.

DOS SANTOS C.; FERREIRA, F.B.; GONÇALVES-NETO, L.M. et al. Age- and gender-related changes in glucose homeostasis in glucocorticoid-treated rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v.92, p.867-878, 2014.

SARBASSOV, D.; ALI, S.M.; SABATINI, D.M. Growing roles for the mTOR pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, v.17, p.596-603, 2005.

SAUER, H.; OERTEL, W.H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. **Neuroscience**, v.59, p.401-415, 1994.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W.D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v.96, p.23-43, 2002.

SCHAPIRA, A.H. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. **Trends Pharmacol Sci**, v.30, p.41-47, 2009.

SCHAPIRA, A. H. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Cell Death Differ**, V.14, p.1261-1266, 2007.

SCHNEITER, P.; TAPPY, L. Kinetics of dexamethasone-induced alterations of glucose metabolism in healthy humans. **Am J of Physiology**, v.275, p.806-813, 1998.

SCHRODER, D. ZUHLKE, H. Gene technology, characterization of insulin gene and the relationship to diabetes research. **Endokrinologie**, v.79, p.197-209, 1982.

SCIGLIANO G.; MUSICCO, M.; SOLIVERI, P. et al. Reduced risk factors for vascular disorders in Parkinson disease patients: a casecontrol study. **Stroke**, v.37, p.1184-1188, 2006.

SELKOE, D.J. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. **Nat Med**, v.17, p.1060-1065, 2011.

SIMON, K.C.; CHEN, H., SCHWARZSCHILD, M. et al. Hypertension, hypercholesterolemia, diabetes, and the risk of Parkinson disease. **Neurology**, 69:1688-1695, 2007.

SKURK, T.; ALBERTI-HUBER, C.; HERDER, C. et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, v.92, p.1023-1033, 2007.

SORIA, B.; QUESADA, I.; ROPERO, A.B. et al. Novel players in pancreatic islet signaling: from membrane receptors to nuclear channels. **Diabetes**, v.53, p.86-91, 2004.

SOTO-OTERO R.; MÉNDEZ-ALVAREZ, E.; HERMIDA-AMEIJEIRAS, A. et al. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. **J. Neurochem**, v.74, p.1605-1612, 2000.

SOUSA, N.; ALMEIDA, O.F.; WOTJAK, C.T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. **Genes Brain Behav**, v.5, p.5-24, 2006.

STEENLAND K.; HEIN, M.J.; CASSINELLI, R.T. et al. Polychlorinated biphenyls and neurodegenerative disease mortality in an occupational cohort. **Epidemiology**, v.17, p.8-13, 2006.

STEPHEN A.L.; BERKOWITZ, B.; SHREINER, B. et al. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. **Diabetes Spectrum**, v.17, p.183-190, 2004.

STERN, M. B.; A. LANG, W. POEWE. Toward a redefinition of Parkinson's disease. **Mov Disord**, v.27, p.54-60, 2012.

TACK, L.J.W.; TATSI, C.; STRATAKIS, C.A. et al. Effects of Glucocorticoids on Bone: What we can Learn from Pediatric Endogenous Cushing's Syndrome. **Horm Metab Res**, v.48, p.764-770, 2016.

TADAIESKY, M.T. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v.156, p.830-840, 2008.

TAKEDA, S.; SATO, N.; UCHIO-YAMADA, K. et al. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and

Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.107, p.7036–7041, 2010.

TALABER, G.; JONDAL, M.; OKRET, S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis. **Mol. Cell. Endocrinol**, v.380, p.89–98, 2013.

TANIGUCHI, C.M.; EMANUELLI, B; KAHN, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature**, v.7, p.85-96, 2006.

TANSEY, M.G.; MCCOY, M.K.; FRANK-CANNON, T.C. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. **Exp. Neurol**. v.208, p.1–25, 2007.

THOMAS, T.P. The complications of systemic corticosteroid therapy in the elderly. A retrospective study. **Gerontology**, v.30, p.60-65, 1984.

THUNHORST, R.L.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A.K. Glucocorticoids increase salt appetite by promoting water and sodium excretion. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.293, p.1444-1451, 2007.

TUNCMAN, G.; HIROSUMI, J.; SOLINAS, G. et al. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. **PNAS**, v.103, p.10741-10746, 2006.

UNGERSTEDT, U. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopaminergic system. **Acta Physiol Stand Suppl**, v.367, p.95-122: 1971.

VAN DEN EEDEN, E. K.; TANNER, C.M.; BERNSTEIN, A.L. et al. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by age, gender and Race / Ethnicity. **Am J Epidemiology**, v.157, p.1015-1022, 2003.

VAN RAALTE, D.H.; NOFRATE, V.; BUNCK, M.C. et al. Acute and 2-week exposure to prednisolone impair different aspects of beta-cell function in healthy men. **Eur J Endocrinol**, v.162, p.729-735, 2010.

VENKATESAN, N.; LIM, J.; BOUCH, C. et al. Dexamethasone-induced impairment in skeletal muscle glucose transport is not reversed by inhibition of free fatty acid oxidation. **Metabolism**, v.45, p.92–100, 1996.

VERDELHO A.; MADUREIRA, S.; FERRO, J.M. et al. Differential impact of cerebral white matter changes, diabetes, hypertension and stroke on cognitive performance among non-disabled elderly. The LADIS study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.78, p.1325–1330, 2007.

VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome-an allostatic perspective. **Biochim Biophys Acta**, v.1801, p.338-49, 2010.

VOGT, M.C.; BRÜNING, J.C. CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. **Trends Endocrinol Metab**, v24, p.76-84, 2013.

WARDLAW, J.M.; VALDES-HERNANDEZ, M.C.; MUNOZ-MANIEGA S. What are white matter hyperintensities made of? Relevance to vascular cognitive impairment. **Am Heart J**, 2015. doi: 10.1161/JAHA.114.001140.

WEIR, GC.; BONNER-WEIR S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. **Diabetes**, v.53, p.16-21, 2004.

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v.112, p.1796-1808, 2003.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**, v.115, p.1111-1119, 2005.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. **Clin Biochem Rev**, v.26, p.19-39, 2005.

WHITE, M.F.; KAHN, C.R. Insulin signaling system. **J Biol Chem**, v.269, p.1-4, 1994.

WHITE, M.F. IRS proteins and the common path to diabetes, **Am J of Physiology**, v.283, p.413–422, 2002.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H.O.; COLE, P. et al. Epidemiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol**, v.26, p.1-58, 2011.

WOLEVER, T.M. The glycemic index. **World Rev Nutr Diet**, v.62, p.120-85, 1990.

WOOD, I.S.; de HEREDIA F.P., WANG, B. et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. **Proc Nutr Soc**, v.68, p.370-377, 2009.

XU, Q. Diabetes and risk of Parkinson's disease. **Diabetes Care**, v.34, p.910–915, 2011.

YANG, Q.; GRAHAM, T.E.; MODY, N. et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature**, v.436, p.356-362, 2005.

ZHANG, X.; EGELAND, M.; SVENNINGSSON, P. Antidepressant-like properties of sarizotan in experimental Parkinsonism. **Psychopharmacology**, 218:621–634, 2011.

ZHANG Y.; ZHOU, B.; ZHANG, F. et al. Amyloid-beta induces hepatic insulin resistance by activating JAK2/STAT3/SOCS-1 signaling pathway. **Diabetes**, v.61, p.1434–1443, 2012.

ZHENG, B.; LIAO, Z.; LOCASCIO, J.J. et al. PGC-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. **Sci Transl Med**, v2, p.52-73, 2010.

ZHOU, Y.P.; GRILL, V.E. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. **J Clin Invest**, v.93, p.870-876, 1994.