

Universidade Federal de  
Santa Catarina

Programa de Pós-  
Graduação em  
Bioquímica

<http://ppgbqa.ufsc.br>

Campus Universitário -  
Corrêgo Grande

Florianópolis- SC

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Bioquímica, Departamento de  
Bioquímica, do Centro de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito para obtenção do Título de  
Doutor em Bioquímica

Orientador: Carla Inês Tasca

Coorientador: Rui Daniel S. Prediger

Florianópolis, 2013

ESTRATÉGIAS DE NEUROPROTEÇÃO EM MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON:  
AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E COMPORTAMENTAL  
Adalberto Alves de Castro

## ESTRATÉGIAS DE NEUROPROTEÇÃO EM MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E COMPORTAMENTAL

Adalberto Alves de Castro

Este estudo objetivou estudar o efeito neuroprotetor de alguns fármacos em relação às alterações bioquímicas e comportamentais induzidas pela administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e também de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) utilizados como modelos experimentais da DP.

Orientador: Carla Inês Tasca

Co-orientador: Rui Daniel S. Prediger



Adalberto Alves de Castro

**ESTRATÉGIAS DE NEUROPROTEÇÃO EM MODELOS ANIMAIS  
DA DOENÇA DE PARKINSON: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E  
COMPORTAMENTAL**

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Bioquímica

Orientador: Prof (a). Dr (a). Carla Inês  
Tasca  
Coorientador: Prof. Dr. Rui Daniel S.  
Prediger

Florianópolis  
2013

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

Castro, Adalberto Alves de  
ESTRATÉGIAS DE NEUROPROTEÇÃO EM MODELOS ANIMAIS DA  
DOENÇA DE PARKINSON: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E COMPORTAMENTAL  
[tese] / Adalberto Alves de Castro ; orientadora, Carla  
Inês Tasca ; co-orientadora, Rui Daniel S. Prediger. -  
Florianópolis, SC, 2013.  
160 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Doença de Parkinson. 3. MPTP. 4.  
Neuroproteção. 5. Atorvastatina, Lítio, Valproato. I. Tasca,  
Carla Inês. II. Prediger, Rui Daniel S.. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. IV. Título.

**“Estratégias de neuroproteção em modelos animais da doença de parkinson: avaliação de efeitos bioquímicos e comportamentais”**

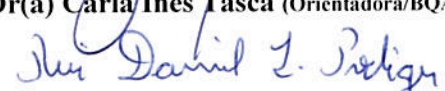
por


**ADALBERTO ALVES DE CASTRO**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 06/PPGBQA/2013) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

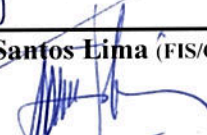
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Carla Inês Tasca** (Orientadora/BQA/CCB/UFSC)


  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Rui Daniel S. Prediger** (Coorientador/FMC/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Mariela Fernanda Perez** (CQ/CQ/UNC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Marcelo Meira Santos Lima** (FIS/CCB/UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Alexandra Susana Latini** (BQA/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Marcelo Farina** (BQA/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof(a) Dr(a) Aderbal S. Aguiar Junior** (BQA/CCB/UFSC)

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2013

Este trabalho é dedicado aos meus pais  
Airto e Gorete, e a minha irmã  
Katiuce.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Carla Inês Tasca, por ter me aceito como membro do seu laboratório de pesquisa, além de sempre estar disponível nos momentos em que precisei de sua orientação. E por sempre ter mantido um caráter de muito respeito e sinceridade comigo e demais colegas durante todos os dias.

Ao professor Dr. Rui D. S. Prediger, por ter aberto inicialmente as portas de seu laboratório para que eu pudesse dar início aos experimentos do doutorado, além de muito outros em colaboração com o seu grupo de pesquisa. E por sempre estar disponível para discussões a respeito de projetos, artigos entre outros. E pelas parcerias estabelecidas no futebol, tênis, surf, churrascos, cervejas entre outros esportes que apreciávamos fazer.

Ao professor Dr. Rodrigo A. Cunha, por ter aceito em colaboração com os meus orientadores a realização do estágio de doutorado sanduíche em seu laboratório de pesquisa. E por sempre estar inspirando principalmente em jovens pesquisadores a busca pelo conhecimento de uma forma admirável, com muito respeito e dedicação ao trabalho.

Aos membros externos da banca, os professores doutores Marcelo Meira Santos Lima da Universidade Federal do Paraná, e Mariela Perez da Universidade de Córdoba/ Argentina. E aos membros internos, os professores doutores Marcelo Farina, Alexandra Suzana Latini, Aderbal S. de Aguiar Jr., Giordano Gubert Viola, todos da Universidade Federal de Santa Catarina, por terem aceito o convite afim de elevarem o nível do trabalho com os seus comentários e sugestões.

Ao colegas do laboratório de Neuroquímica 4, (Fabiana Kalyne, Tharine Dal-Cim, Leandra Celso Constantino, Karen Oliveira, Bárbara Paula Wiemes, Charlise Reginato, Cláudia Beatriz Nedel, Wagner Carbolin Martins, Samuel Vandresen-Filho) dos departamentos de Bioquímica e Neurociências e aos membros do LEXDON (Aderbal S. de Aguiar Jr – “Meu Mano”, Daniel Rial, Eduardo Luiz Moreira, Filipe Carvalho Matheus, Sandro Wopereis, Paulo Alexandre) do Departamento de Farmacologia da UFSC, além é claro dos colegas Gianni Mancini e Paulo César S. Lock, por terem dividido durante todo esse tempo experiências boas e ruins, o que me fizeram aprender muito.

Aos membros do grupo das Purinas – Portugal, (Caroline Veloso,

Paula Canas, Daniela Pochmann, Paula Agostinho, Samira, Attila Koffalvi, Henrique Silva, Angelo Tomé, Francisco Queiroz, Pedro Garção, Nuno Machado) por terem me transmitido bons ensinamentos, respeito e carinho durante todo o meu estágio de doutorado sanduíche em Coimbra.

À família Alves de Castro na presença do meu pai Sr. Aírto Antonio de Castro, da minha mãe Sra. Maria Gorete Alves de Castro e da minha irmã Katiuce Alves de Castro por sempre terem me apoiado em tudo, e serem exatamente tudo para mim.

A CAPES, CNPq, FAPESC, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda mais prevalente doença neurodegenerativa, afetando aproximadamente 1% da população acima dos 60 anos, e um aumento na incidência desta doença é esperado nos próximos anos em virtude do envelhecimento populacional. Nos estágios iniciais da DP, um comprometimento de outras áreas cerebrais e vias de neurotransmissão além da dopaminérgica, que parecem ser responsáveis por prejuízos sensoriais (olfação), emocionais (depressão e ansiedade) e cognitivos (memórias operacionais e de procedimento). Este estudo objetivou estudar o efeito neuroprotetor de alguns fármacos em relação às alterações bioquímicas e comportamentais induzidas pela administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e também de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) *in vitro*, utilizados como modelos experimentais da DP. Utilizamos fármacos estabilizadores do humor, lítio (Li) e valproato (VPA), bem como o inibidor da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-COA) redutase da síntese do colesterol, a Atorvastatina (ATOR) e um antagonista dos receptores A<sub>2A</sub> para adenosina (SCH58261), além de camundongos com deleção gênica do receptor A<sub>2A</sub> para adenosina. O pré-tratamento com Li (47,5 mg/kg) ou VPA (200 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) durante 7 dias consecutivos previniu os prejuízos olfatórios induzidos pela administração intranasal (i.n.) do MPTP em camundongos no teste de discriminação olfatória e também nos déficits de memórias de curto prazo, avaliadas pelos testes de reconhecimento social e esquivas inibitórias. Apesar da ausência de respostas do tipo depressiva na dose de MPTP (0,1 mg/narina), o tratamento com Li e VPA demonstrou um perfil característico de antidepressivos, reduzindo o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Além disso, Li e VPA impediram a depleção de dopamina no estriado e bulbo olfatório de ratos após a infusão i.n. de MPTP. Ao avaliar o possível efeito protetor da ATOR, observou-se que o tratamento via oral com ATOR (10 mg/kg por 7 dias) previniu os prejuízos na memória social e comportamentos do tipo depressivo induzidos pela administração i.n. de MPTP (1 mg/narina). Além disso, o tratamento com ATOR foi capaz de proteger os camundongos contra os prejuízos motores e degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra observados 21 dias após a infusão do MPTP. Nenhuma alteração significativa em memórias espaciais de longo prazo e marcadores neuroinflamatórios foi observada 21 dias após a infusão i.n. do MPTP. Adicionalmente, padronizamos um modelo *in vitro* de toxicidade induzida por 6-OHDA em fatias do hipocampo, estriado e córtex cerebral, e o efeito neuroprotetor da ATOR também foi avaliado. A incubação com 6-OHDA reduziu a viabilidade celular nas regiões cerebrais do hipocampo, estriado e córtex. A incubação com ATOR ou MK-801 (antagonista dos receptores para



glutamato do tipo NMDA) *per se* não alterou a viabilidade celular. Observou-se uma prevenção na redução de viabilidade celular após incubação de ATOR + 6-OHDA no hipocampo, estriado e córtex. Observou-se ainda um efeito sinérgico na incubação de ATOR + MK-801 frente à toxicidade induzida por 6-OHDA. Por fim, o envolvimento dos receptores  $A_{2A}$  ( $A_{2A}R$ ) nas alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela administração i.n. de MPTP foi avaliado. Demonstramos que o bloqueio farmacológico e/ou gênico dos  $A_{2A}R$  pode atenuar prejuízos comportamentais relacionados a memórias de curto prazo e de procedimento, bem como a degeneração de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal de camundongos induzidos pela administração i.n. de MPTP. Em conjunto, os resultados do presente estudo contribuem com o avanço no conhecimento acerca dos mecanismos bioquímicos associados ao processo neurodegenerativo da DP, além de sugerirem o Li, VPA, ATOR e antagonistas de  $A_{2A}R$  como potenciais agentes neuroprotetores, sendo úteis no tratamento dos sintomas motores e não-motores da DP.

**Palavras chaves:** doença de Parkinson, MPTP, 6-OHDA, tirosina hidroxilase, estresse oxidativo, viabilidade celular, estabilizadores do humor, lítio, valproato, atorvastatina, adenosina, receptores  $A_{2A}$ , SCH58261, glutamato, MK-801.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease affecting approximately 1% of the population above 60 years and an increase in the incidence of this disease is expected in the next year because of population aging. In earlier stages of PD suggest the commitment of other brain areas and neurotransmitters, that seem to be responsible for sensory (olfactory), emotional (depression and anxiety) and cognitive (working and procedural memories) impairments. In this study, we evaluated the neuroprotective potential of some drugs on biochemical and behavioral changes induced by administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) and also 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) *in vitro*, used as animal models of PD. We investigated whether the mood-stabilizers drugs lithium (Li) and valproate (VPA), as well as the inhibitor of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase in the cholesterol synthesis pathway, atorvastatin (ATOR), and the adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist (SCH58261) can act as putative neuroprotective agents in PD. Our findings indicate that pretreatment with Li (47.5 mg/kg) or VPA (200 mg/kg) by intraperitoneal (i.p.) route during 7 consecutive days was able to prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments evaluated, respectively, in the social recognition and step-down inhibitory avoidance tasks in rats infused with a single intranasal (i.n.) administration of MPTP (0.1 mg/nosril). Despite the absence of clear depressive-like responses following the current MPTP dose, Li and VPA treatment presented an antidepressant profile reducing the immobility time in the forced swimming test. Importantly, at this time no significant alterations on locomotor activity of the animals were observed. Li and VPA prevented the depletion of dopamine in the striatum and olfactory bulb of rats after the infusion of MPTP. The oral atorvastatin treatment (10 mg/kg for 7 days) prevented MPTP-induced short-term social memory deficits and depressive-like behavior observed at 7 and 14 days, respectively, after MPTP administration. Moreover, at later periods (21 days) after i.n. MPTP infusion, a significant decrease of locomotor activity of rats in the activity chambers were accompanied by a marked decrease of tyrosine hydroxylase immunostaining in the substantia nigra pars compacta which were also attenuated by atorvastatin treatment. Additionally, in the present study an *in vitro* model of 6-OHDA-induced toxicity in slices from hippocampus, striatum and cerebral cortex was established, and the neuroprotective effects of ATOR were confirmed. 6-OHDA (100  $\mu$ M) induced a significant reduction of cell viability in striatum, hippocampus and cortex slices of rats. The incubation with ATOR or MK-801 *per se* did not alter the cellular viability and ATOR prevents the reduction of cell viability and reactive oxygen species production after incubation with 6-

OHDA in the hippocampus, striatum and cortex. Finally, the involvement of adenosine  $A_{2A}$  receptors ( $A_{2A}R$ ) in behavioral and biochemical changes induced by i.n. MPTP administration was also analyzed. The genetic or pharmacological blockade of  $A_{2A}R$  prevented the behavioral deficits related to short-term and procedural memories, as well as the reduction of the expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the striatum and substantia nigra of mice infused with MPTP. Altogether, the results of the present study contribute towards a better knowledge of the biochemical mechanisms associated with the neurodegenerative process in PD. Moreover, our findings suggest Li, VPA, ATOR and adenosine  $A_{2A}R$  antagonists as potential neuroprotective agents, being valuable tools for the treatment of motor and non-motor symptoms of PD.

**Key-words:** Parkinson's disease, MPTP, 6-OHDA, tyrosine hydroxylase, cytokines, oxidative stress, cell viability, mood stabilizers, lithium, valproate, atorvastatin, adenosine,  $A_{2A}R$ , SCH58261, glutamate, MK-801.

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA - 6-hidróxi-dopamina

5-HT - 5-hidroxitriptamina

HMG-COA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A

A<sub>1</sub> - Receptor A<sub>1</sub> para adenosina

A<sub>2A</sub>R - Receptor A<sub>2A</sub> para adenosina

A<sub>2B</sub>R - Receptor A<sub>2B</sub> para adenosina

A<sub>3</sub>R – Receptor A<sub>3</sub> para adenosina

AD - Alzheimer's disease

ADO - Adenosina

AMPA - Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AMPC - Adenosina monofosfato-cíclico

ANOVA - Análise de variância

ATOR - Atorvastatina

ATP – Adenosina - trifosfato

AVC - Acidente vascular cerebral

BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo

DAT - Transportador de dopamina

DOPAC - Dihidroxifenilacético

DA - Dopamina

DP - Doença de parkinson

DCFH-DA - Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

DMEN - Meio de cultura

FST - Teste do nado forçado

GLAST - Transportador glial de glutamato

GLT-1 - Transportador glial de glutamato 1

GLU - Glutamato

HVA - Ácido homovanílico

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão

i.n. - Via intranasal

i.p. - Via intraperitoneal

IL-1 $\beta$  - Interleucina1 $\beta$

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Li - Lítio

LPS - Lipopolisacarídeo

LTM - Memória de longo prazo

MK-801 - Antagonista do receptor NMDA

MAO-B - Monoamino-oxidase - B

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

MPP<sup>+</sup> - 1-metil-4-fenil piperidínio

MTT - 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo

NMDA - N-metil-D-aspartato

NA - Noradrenalina

SCH58261 – Antagonista seletivo do A<sub>2A</sub>R

SNpc - Substância negra parte compacta

SNC - Sistema nervoso central

STM - Memória de curto prazo

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral

TH - Tirosina hidroxilase

VPA - Valproato

## **Lista de publicações durante o desenvolvimento da tese:**

**The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease.**

Prediger RD, Aguiar AS Jr, Moreira EL, Matheus FC, **Castro AA**, Walz R, De Bem AF, Latini A, Tasca CI, Farina M, Raisman-Vozari R. *Curr Pharm Des.* 2011;17(5):489-507. *Review.*

**Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling.**

Aguiar AS Jr, **Castro AA**, Moreira EL, Glaser V, Santos AR, Tasca CI, Latini A, Prediger RD. *Mech Ageing Dev.* 2011 Nov-Dec; 132 (11-12): 560-7.

**Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP).**

Matheus FC, Aguiar AS Jr, **Castro AA**, Villarinho JG, Ferreira J, Figueiredo CP, Walz R, Santos AR, Tasca CI, Prediger RD. *Behav Brain Res.* 2012 Dec 1;235(2):263-72.

**Functional interaction between presynaptic  $\alpha 6\beta 2^*$  nicotinic and adenosine A2A receptors in the control of dopamine release in the rat striatum.**

Garção, Pedro; Wopereis, Sandro; **Castro, Adalberto**; Prediger, Rui; Cunha, Rodrigo; Agostinho, Paula; Köfalvi, Attila. *Submitted for publication in British Journal of Pharmacology, 2013.*

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Doença de Parkinson: sintomas, diagnóstico e alterações neuropatológicas.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Etiologia da doença de Parkinson.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Modelos animais da doença de Parkinson.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Estratégias de Neuroproteção.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Estabilizadores do Humor.....</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Atorvastatina.....</b>	<b>11</b>
<b>1.7 Modulação dos receptores adenosinérgicos .....</b>	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Capítulo I: <i>Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Capítulo II: <i>Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Capítulo III: <i>Atorvastatina atenua a toxicidade induzida por 6-OHDA em fatias de estriado, hipocampo e córtex cerebral in vitro através da interação com os receptores NMDA</i>.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4 Capítulo IV: <i>Estudo do envolvimento dos receptores A<sub>2A</sub> para adenosina em um modelo experimental da doença de Parkinson: infusão intranasal de MPTP em camundongos</i>.....</b>	<b>81</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>101</b>



<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>112</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>113</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>114</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Parkinson: sintomas, diagnóstico e alterações neuropatológicas

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que apresenta uma prevalência de aproximadamente 0,3% da população total mundial, e aumenta para 1% em pessoas com mais de 60 anos de idade (Mayeux, 2003). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000), existem aproximadamente 222 mil parkinsonianos no Brasil, sendo que 2% dos brasileiros acima dos 60 anos são acometidos por este distúrbio.

A DP tem como principal característica neuropatológica a lesão de neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra parte compacta (SNpc), que enviam projeções para os núcleos da base, e cuja degeneração provoca uma redução nos níveis quantitativos de dopamina no estriado (Hirsch et al., 1988). A segunda característica neuropatológica da DP é o aparecimento de inclusões eosinófilas citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy, compostas principalmente pelo acúmulo das proteínas  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina (Blandini et al., 2000). A DP afeta severamente diversas regiões do encéfalo, incluindo o núcleo pigmentado no mesencéfalo e tronco cerebral, tubérculo olfatório, córtex cerebral e elementos do sistema nervoso periférico (Braak et al., 2006).

Desde a sua descrição inicial, por James Parkinson (1817) no estudo “*Essay on the shaking palsy*”, a DP vem sendo caracterizada como um distúrbio motor, e o seu diagnóstico clínico é baseado pela presença de dois ou mais sinais motores: rigidez muscular (Yamonouchi e Nagura, 1997), bradicinesia (Cutsuridis e Perantonis, 2006), tremor (Hirsch et al., 1992) e instabilidade postural (Van Der Burg et al., 2006). Entretanto, os pacientes parkinsonianos somente desenvolvem estas alterações motoras quando aproximadamente, entre 60 e 70% dos neurônios da SNpc encontram-se degenerados, e os níveis de dopamina são reduzidos em 70 e 80% no estriado (Braak et al., 2004). O fato do processo neurodegenerativo já se encontrar num estágio muito avançado quando o diagnóstico é estabelecido pode ser responsável pela baixa efetividade clínica de diversos fármacos e agentes neuroprotetores testados no tratamento desta doença.

Por outro lado, os sintomas cognitivos, embora comumente presentes na DP, continuam sendo pouco estudados em relação ao seu diagnóstico e tratamento (Colloca, 2004). Existem evidências de distúrbios de caráter emocional, cognitivo e psicossocial, destacando-se: depressão (Richard, 2007), ansiedade (Meara e Hobson, 1998), prejuízos cognitivos (Williams-Gray et al., 2007) e olfatórios (Albers et al., 2006), e em particular a demência na DP (Emre, 2004). O fato dos pacientes

parkinsonianos apresentarem uma depleção quantitativa de dopamina nos gânglios da base (Gerlach e Riederer, 1996; Barrio et al., 1997; Lindner et al., 1999) e em outras áreas cerebrais, como o córtex pré-frontal (Stebbins et al., 1999; Marié et al., 1999), seria esperado um prejuízo específico nas memórias implícitas e operacionais, respectivamente. Apesar de existirem divergências na literatura quanto aos tipos de memória que estariam comprometidos na DP, a hipótese mencionada acima parece ser verdadeira. Desta forma, tanto as memórias implícitas (Ferraro et al., 1993; Roncacci et al., 1996) quanto às memórias operacionais (Dubois e Pillon, 1997; Stebbins et al., 1999; Costa et al., 2003; Crucian e Okun, 2003) mostram-se prejudicadas em pacientes parkinsonianos. Por outro lado, tem sido demonstrado que as memórias declarativas, normalmente associadas ao hipocampo e o córtex entorrinal, encontram-se mais preservadas na DP (Flowers et al., 1984; Knowlton et al., 1996; Dubois e Pillon, 1997).

Além dos prejuízos nos processos de aprendizagem e memória já descritos, outra função que é comprometida em pacientes com a DP, é a olfação. Embora já relatados há mais de 30 anos, os prejuízos apresentados por pacientes parkinsonianos na percepção, discriminação e reconhecimento de odores, o sintoma olfativo tem sido ignorado por pesquisadores e clínicos envolvidos com esta doença. A relativa escassez dos trabalhos nesta área deve-se, em parte, à falta de técnicas e procedimentos para mensurar este comprometimento olfativo em humanos, somado à inexistência de modelos experimentais que reproduzam tais prejuízos (Hawkes et al., 1999). Algumas evidências sugerem que áreas do sistema nervoso central (SNC) que processam a informação olfatória são afetadas em diferentes estágios da DP, antes mesmo do desenvolvimento dos sintomas clássicos (Muller et al., 2002; Braak et al., 2004).

## 1.2 Etiologia da doença de Parkinson

A natureza do processo neurodegenerativo na DP não está completamente esclarecida. Entretanto, sugere-se que esta poderia estar associada a um fator de estresse oxidativo desencadeado por um ou mais eventos, dentre os quais se destacam: envelhecimento cerebral, predisposição genética, anomalias mitocondriais, produção de radicais livres e toxinas ambientais (Langston, 1996; Olanow et al., 1998).

Várias evidências têm reforçado o papel do estresse oxidativo na toxicidade induzida por agentes químicos, como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Sriram et al. (1997) realizaram estudos *in vivo* e *in vitro* e demonstraram que a exposição ao MPTP aumentou as espécies reativas de oxigênio resultando no estresse oxidativo em camundongos. Adicionalmente, a toxicidade do MPTP foi significativamente reduzida em camundongos tratados com antioxidantes tais como, vitamina E,  $\beta$ -caroteno

e ácido ascórbico (Perry et al., 1985; Odunze et al., 1990). Estudos pós-mortem demonstraram um aumento na oxidação de proteínas, lipídeos e DNA em doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer (DA), Parkinson e Huntington (Mariani, et al., 2005; Cardoso, et al., 2005).

Vem crescendo as evidências em relação ao papel das vias glutamatérgicas na fisiopatologia da DP, sugerindo que estas vias podem apresentar potencial terapêutico. O excesso de glutamato na fenda sináptica causa o fenômeno conhecido como excitotoxicidade, que é um fator comum a vários distúrbios neurológicos e doenças neurodegenerativas (Obrenovitch e Urenjak, 1997). O glutamato pode ser neurotóxico agindo em receptores ionotrópicos (N-metil-D-aspartato, NMDA, alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico, AMPA) e, também em seus receptores metabotrópicos (Meldrum, 2000). A excitotoxicidade resulta do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  na célula através dos canais iônicos e pela ação suplementar da liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  dos reservatórios intracelulares, levando a um aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  (Choi, 1987). O  $\text{Ca}^{2+}$  ativa uma série de enzimas como proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintase ou endonucleases que contribuem para a morte celular (Meldrum, 2000). Assim, modelos animais com ratos e primatas não humanos da DP demonstraram que antagonistas seletivos dos receptores NMDA e AMPA podem aliviar sintomas motores e não-motores da DP (Grennamyre et al., 1992; Klockgether et al., 1991; Starr, 1995). O tratamento com agonistas dos receptores metabotrópicos para glutamato (mGluR 2/3) também demonstraram atenuação da neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos induzidos pelo MPTP em ratos (Battaglia et al., 2003; Corti et al., 2007). Os prejuízos motores e a morte de neurônios dopaminérgicos também foram aliviados em animais parkinsonianos após o tratamento com antagonistas dos receptores mGluR1 e mGluR5 (Battaglia et al., 2004; Breyse et al., 2002; Prediger et al., 2011). Considerando um desequilíbrio nos níveis glutamatérgicos, investigamos a captação de glutamato por seus transportadores de alta afinidade após a administração intranasal de MPTP, a fim de correlacioná-la com as alterações comportamentais observadas neste modelo animal para o estudo da DP. Observamos uma redução na captação de glutamato em fatias estriatais 14 dias após a infusão de MPTP, porém não foram observadas alterações significativas na captação de glutamato em fatias hipocâmpais no mesmo período (Prediger et al., 2011).

Além da prevalência da DP ser influenciada pelo avanço da idade (Hagan et al., 1997), a presença de um componente genético tem sido sugerida por diversos estudos. Levantamentos epidemiológicos verificaram uma taxa de concordância correlacionada a DP de 45% entre gêmeos monozigóticos e de 29% entre gêmeos dizigóticos (Duvoisan, 1987; Burn et al., 1992; Tanner et al., 1997). Verificou-se também que 15 a 20% dos pacientes parkinsonianos apresentam histórico familiar da doença

(Bandmann, 1998). Na avaliação de genes envolvidos na DP foram identificadas diferentes mutações em pacientes com histórico familiar da DP, nos genes da  $\alpha$ -sinucleína (Polymeropoulos et al., 1997; Kruger et al., 1998; Singleton et al., 2003; Zarranz et al., 2004), parkina (Kitada et al., 1998) e DJ1, proteínas essas que estão envolvidas com a disfunção mitocondrial (Bonifati et al., 2003). Por outro lado, tem crescido nos últimos anos o número de estudos (clínicos e básicos) buscando identificar os diferentes fatores ambientais que podem estar envolvidos na etiologia da DP. Neste sentido, diferentes linhas de evidência sugerem que a exposição a certos agentes ambientais, como: metais (Tanner, 1989; Hirsch et al., 1991; Good et al., 1992; Yasui et al., 1992; Hertzman et al., 1994; Altschuler, 1999; Gorell et al., 1999), solventes (Uitti et al. 1994; Pezzoli et al., 1996; Seidler et al., 1996; Davis e Adair, 1999; Hageman et al., 1999), monóxido de carbono (Kla w Ans et al., 1982), e MPTP (Langston e Ballard, 1983 e Langston et al., 1983); pode induzir lesões nigrostriatais e estar associada ao desenvolvimento da DP, além disso, estudos epidemiológicos têm destacado alguns fatores ambientais que podem estar associados a um aumento nos riscos do desenvolvimento da DP, tais como: a residência em áreas rurais (Semchuk et al., 1993; Liou et al., 1997; Gorell et al., 1998; Marder et al., 1998; Fall et al., 1999), beber água de poço (Morano et al., 1994; Marder et al., 1998), e exposição a alguns tipos de herbicidas e pesticidas (Semchuk et al., 1993; Liou et al., 1997; Gorell et al., 1998; Fall et al., 1999; Vanacore et al., 2002). A exposição repetida ou prolongada à determinadas toxinas ambientais parece não ser suficiente para causar a DP, uma vez que a doença em indivíduos que vivem em uma mesma área durante longos períodos é baixo. Por outro lado, um agente ambiental poderia influenciar decisivamente no desenvolvimento da DP em indivíduos geneticamente suscetíveis (Meneses e Teive, 1996).

### **1.3 Modelos animais da doença de Parkinson**

O aumento do conhecimento acerca da fisiopatologia da DP, suas causas e o desenvolvimento de novas terapias eficazes no alívio dos seus sintomas dependem da existência de modelos animais representativos, que permitam a avaliação de novos agentes farmacológicos e estratégias terapêuticas antes que estes sejam aplicados em testes clínicos. A DP é uma das várias doenças humanas que parece não ocorrer espontaneamente em outros animais. Entretanto, as características desta doença podem ser mimetizadas, em maior ou menor escala, em animais de laboratório (como roedores) através da administração de diferentes compostos: reserpina, 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), paraquat, manebe, rotenona e ferro (para revisão ver Gerlach e Riederer, 1996; Dawson, 2000; Beal, 2001; Shimohama et al., 2003).

Embora não exista um modelo animal ideal da DP que apresente todas as características associadas à condição clínica, como: (I) detecção das alterações motoras associadas ao parkinsonismo; (II) perda seletiva e gradual dos neurônios dopaminérgicos com o avanço da idade; (III) produção de inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy) eles têm sido de grande valia na elucidação dos mecanismos moleculares relacionados à neurodegeneração verificada na DP e na avaliação de novos agentes terapêuticos (Shimohama et al., 2003).

Por outro lado, grande parte dos estudos realizados até o presente momento utilizando estes modelos animais (MPTP e 6-OHDA) da DP tem sido focada em seus efeitos sobre a via dopaminérgica nigroestriatal e a indução de comprometimentos motores nos animais. Como a DP está associada com alterações em uma variedade de funções, incluindo alterações afetivas (Santamaria et al., 1986; Cummings, 1992); cognitivas (Owen et al., 1995; Dubois e Pilon, 1997) e olfatórias (Doty et al., 1988,1995; Hawkes et al., 1998, 1999), torna-se importante avaliar se estes modelos animais são também capazes de reproduzir algumas destas alterações.

A capacidade da droga MPTP de lesar seletivamente neurônios dopaminérgicos foi descoberta de maneira acidental em 1976 na Califórnia, quando um grupo de jovens dependentes de heroína começou a apresentar sintomas típicos da DP. A análise da “heroína” utilizada revelou a existência do MPTP como resíduo contaminante (Davis et al., 1979; Langston et al., 1983; Ballard et al., 1985). A partir deste momento, a administração do MPTP a animais de laboratório (principalmente roedores e primatas) passou a ser utilizado como um modelo para o estudo da DP (para revisão ver Gerlach e Riederer, 1996; Dawson, 2000; Beal, 2001; Dauer e Przedborski, 2003; Shimohama et al., 2003). O mecanismo da neurotoxicidade induzida pelo MPTP envolve também a sua fácil passagem pela barreira hematoencefálica em virtude da sua elevada lipossolubilidade (Markley et al., 1984). No cérebro, o MPTP é convertido ao íon 1-metil-4-fenil piperidínio (MPP<sup>+</sup>) pela ação da enzima monoamina oxidase B (MAO-B), sendo esta conversão realizada principalmente nas células da glia. O MPP<sup>+</sup> é posteriormente captado pelos transportadores para dopamina nos terminais dopaminérgicos nigroestriatais, sendo este o fator determinante para a relativa seletividade do MPTP sobre neurônios dopaminérgicos. No neurônio dopaminérgico, o MPP<sup>+</sup> poderá seguir três caminhos distintos: (I) ser captado por transportadores vesiculares de monoaminas e acumular-se em vesículas, o que inibe temporariamente o seu efeito neurotóxico (Takahashi et al., 1997); (II) concentrar-se na mitocôndria, onde o MPP<sup>+</sup> inibe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, o que acarreta uma redução na produção de adenosina-5'-trifosfato (ATP) e aumento na formação de radicais livres (Langston et al., 1984;

Ramsay e Singer, 1986; Tipton e Singer, 1993; Beal, 2001); (III) e interação com enzimas citosólicas, principalmente aquelas contendo cargas negativas (Klaidman et al., 1993).

O grau de degeneração dopaminérgica e os sintomas apresentados pelos animais após a administração do MPTP é bastante variável, dependendo da espécie estudada e o regime de tratamento.

Em primatas (homens, macacos e babuínos), o MPTP induz sintomas que são praticamente indistinguíveis da DP, como degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, aparecimento de agregados da proteína  $\alpha$ -sinucleína (embora não existam corpos de Lewy característicos), além de distúrbios motores clássicos da DP, como tremores, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural (Langston et al., 1983; Burns et al., 1983; Kopin e Markey, 1988; Forno et al., 1993; Varastet et al., 1994; Beal, 2001). De maneira similar ao observado na DP, a neurotoxicidade e os sintomas induzidos pelo MPTP aumentam com o avanço da idade em primatas (Ovadia et al., 1995), podendo estes serem revertidos quando tratados com levodopa e agonistas dopaminérgicos (Langston e Irwin, 1986; Kopin e Markey, 1988).

Os roedores (ratos e camundongos) parecem ser menos sensíveis à neurotoxicidade induzida pelo MPTP quando comparados aos primatas, além de não apresentarem toda a sintomatologia característica da DP. Em camundongos, os efeitos da administração sistêmica do MPTP são dependentes do regime do tratamento, da linhagem estudada e da idade dos animais (Irwin et al., 1992, 1993; Sedelis et al., 2000, 2001; Schmidt e Ferger, 2001; Prediger et al., 2009). Tem sido demonstrado que a linhagem C57BL6 apresenta uma maior sensibilidade aos efeitos do MPTP quando comparada às demais linhagens de camundongos (Sedelis et al., 2000, 2001). Além disso, a exemplo do ocorrido com primatas, os efeitos do MPTP aumentam com o avanço da idade nestes animais (Irwin et al., 1992, 1993). Por razões de praticidade e logística, a administração sistêmica de MPTP em camundongos tem sido um dos modelos animais mais empregados no estudo dos mecanismos de neurotoxicidade associados à DP, bem como para o teste de novos agentes terapêuticos para esta doença (Heikkila et al., 1984; Arai et al., 1990; Araki et al., 2001; Schmidt e Ferger, 2001). Por outro lado, tem sido demonstrado que ratos são particularmente resistentes aos efeitos do MPTP quanto este é administrado sistemicamente (Chiueh et al., 1984; Kalaria et al., 1987). Embora as razões para esta resistência não estejam totalmente esclarecidas, alguns autores sugerem que isto poderia ser decorrente de diferenças no metabolismo do MPTP, na retenção ou distribuição do seu metabólito MPP<sup>+</sup> (Langston, 1985), ou ainda da presença de altos níveis da enzima MAO-B nos capilares cerebrais de ratos, o que constituiria uma espécie de barreira “enzimática” hematoencefálica (Kalaria et al., 1987). Esta resistência aos efeitos

neurotóxicos da administração sistêmica do MPTP exibida por ratos é o principal fator responsável pelo limitado número de trabalhos destinados a investigar as ações desta neurotoxina em ratos, chegando ao extremo de alguns autores desaconselharem o emprego do modelo do MPTP nesta espécie (Schmidt e Ferger, 2001).

Em 2006, dois grupos de pesquisa independentes, um do Brasil (Prediger e colaboradores) e outro da Espanha (Rojo e colaboradores), publicaram quase que simultaneamente os primeiros trabalhos descrevendo o uso da infusão intranasal (i.n.) do MPTP em ratos e camundongos como um modelo animal da DP. A principal idéia era conseguir associar possíveis fatores e riscos ambientais induzidos por neurotoxinas (ex: MPTP) com as alterações associadas com a DP. No estudo de Rojo et al. (2006), após 30 dias consecutivos da administração de MPTP (60 mg/kg/dia) pela via i.n., os camundongos apresentaram prejuízos motores, os quais foram correlacionados com uma redução de 80% nos níveis de dopamina no estriado e uma redução na imunoreatividade da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado e SNpc (Rojo et al., 2006). O mesmo grupo também investigou os efeitos da administração crônica (30 dias) das neurotoxinas rotenona e paraquat em camundongos. No entanto, em contraste com os resultados obtidos com o MPTP, os camundongos e ratos tratados com rotenona foram assintomáticos, enquanto que a administração do paraquat induziu hipocinesia e dano vestibular, mas não alterou o sistema nigroestriatal (Rojo et al., 2007).

Por outro lado, os estudos realizados pelo grupo brasileiro vêm buscando compreender melhor os sintomas não motores em roedores após a administração i.n. de MPTP. Estas alterações comportamentais vêm sendo investigadas em ratos adultos da linhagem Wistar (3 meses) e camundongos adultos da linhagem C57BL/6 (5-6 meses de idade) ao longo do período de um mês após uma única administração bilateral do MPTP (1 mg/narina) (Prediger et al., 2006, 2009, 2010, 2011; Franco et al., 2007; Moreira et al., 2010; Matheus et al., 2012). Roedores tratados com MPTP i.n. sofreram ao longo do tempo prejuízos em funções olfatórias, cognitivas, emocionais e motoras (Prediger et al., 2006, 2009, 2010, 2011; Franco et al., 2007; Moreira et al., 2010; Matheus et al., 2012) o que parece ser correlacionado com diferentes estágios da DP em humanos, de acordo com a hipótese de Braak (2004).

Os prejuízos olfatórios podem ser explicados levando-se em consideração que uma toxina ou agente químico causador da DP (ex: MPTP) poderia usar a cavidade nasal como porta de entrada no organismo (Roberts, 1986; Harrison e Person, 1989; Hawkes et al., 1999). Assim, sabendo que o epitélio olfativo encontrar-se diretamente exposto ao meio ambiente, este poderia ser o primeiro alvo para um suposto agente causador externo, sendo afetado antes mesmo que as alterações nos núcleos da base



se desenvolvessem (Hawkes et al., 1999).

Segundo esta hipótese, estudos clínicos existentes nesta área descrevem que os prejuízos olfativos apresentados por pacientes parkinsonianos podem ser detectados antes mesmo do aparecimento dos sintomas clássicos motores (Daniel e Hawkes, 1992; Doty et al., 1995; Berendse et al., 2001). Braak e colaboradores (2004) propuseram o progresso temporal/espacial do processo neurodegenerativo na DP, demonstrando que áreas olfativas, juntamente com o tronco cerebral, são as primeiras áreas acometidas, sendo consideradas uma fase pré-sintomáticos (estágio 1-2) na DP. O processo avança para a SNpc e outros núcleos do mesencéfalo e prosencéfalo, dando início a fase sintomática clássica com os prejuízos motores (estágio 3-4) da DP. O processo neurodegenerativo (estágio 5-6) alcança o neocórtex, fazendo com que a DP se manifeste clinicamente em toda a sua dimensão (Braak et al., 2004). Portanto, o desenvolvimento de novas técnicas mais precisas, que permitam mensurar este prejuízo olfativo precocemente, pode vir a representar uma importante ferramenta para o diagnóstico da DP em seus estágios iniciais, melhorando a eficácia do tratamento (Doty et al., 1984, 1995; Daniel e Hawkes, 1992; Becker et al., 2002).

Transtornos depressivos ocorrem geralmente na DP (Cummings et al., 1999), afetando cerca de 40% dos pacientes durante as fases iniciais da doença (Tolosa, Compta, Gaig, 2007). Vários estudos sugerem que a fisiopatologia de transtornos de humor na DP pode ser diferente dos mecanismos que são observados na população em geral (Lieberman, 2006). Embora a fisiopatologia dos sintomas psiquiátricos na DP não esteja totalmente compreendida, o acometimento de vias dopaminérgicas, colinérgicas, serotoninérgicas, noradrenérgicas e gabaérgicas pode estar envolvido na sua gênese (Scharg et al., 2004). Deve ser destacado que a infusão i.n. de MPTP promoveu um comportamento do “tipo-depressivo” em ratos (Moreira et al., 2010), refletido por um tempo maior de imobilidade no teste de natação forçada (Porsolt, et al., 1978).

Portanto, apesar da existência de algumas limitações, o uso de MPTP i.n. em ratos e camundongos mimetiza o desenvolvimento de características da DP (incluindo sintomas motores e não-motores), morte de células na SNpc e depleção dos níveis de dopamina em diferentes áreas do cérebro) (Prediger et al., 2006, 2009, 2010; Moreira et al., 2010). Desta forma, a sequência de alterações olfativas, cognitivas, emocionais, motoras e neuroquímicas observadas com a infusão i.n. de MPTP tornam este um modelo animal útil para o estudo de estratégias de neuroproteção frente à DP.

A neurotoxina 6-OHDA também é uma das substâncias muito utilizada como modelo animal para o estudo da DP (Gomez-Lazaro et al. , 2008, Ikeda et al. , 2008, Mu et al. , 2009). Essa substância possui uma

estrutura química similar a da dopamina, demonstrando assim uma alta afinidade pelos transportadores de dopamina e acarretando na morte de neurônios dopaminérgicos e catecolinérgicos (Lehmensiek et al., 2006). Por ser incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Garver et al., 1975), a 6-OHDA é administrada diretamente no estriado, SNpc ou no feixe prosencefálico medial (FPM), para induzir o parkinsonismo. A administração intraestriatal de 6-OHDA em ratos induz neurotoxicidade nos terminais dopaminérgicos 24 horas após a injeção, seguido de uma perda de neurônios dopaminérgicos localizados na SNpc no hemisfério ipsilateral (Berger et al., 1991; Cadet et al., 1991; Ichitani et al., 1991; Kirik et al., 1998; Lee et al., 1996; Przedborski et al., 1995; Sauer e Oertel, 1994). No interior dos neurônios, o acúmulo de 6-OHDA e a auto-oxidação não enzimática promovem a formação de radicais livres (Bladini et al., 2008). O efeito inibitório sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial pode ser responsável pelo mecanismo de formação de espécies reativas do oxigênio (ERO) dessa neurotoxina (Lehmensiek et al., 2006; Inden et al., 2006; Chin et al., 2008).

#### **1.4 Estratégias de neuroproteção**

Nos últimos anos, vêm crescendo o número de trabalhos epidemiológicos, clínicos e pré-clínicos que visam melhorar as limitações dos fármacos utilizados atualmente no tratamento da DP. Atualmente existem diferentes tratamentos farmacológicos para a DP, como fármacos precursores de dopamina (ex: levodopa - L-DOPA), inibidores das enzimas de degradação de dopamina (ex: selegelina e rasagilina – inibidores da monoamino-oxidase-B - MAO-B; e inibidores da catechol-o-methyltransferase – COMT: tolcapone e a entacapone) e agonistas dopaminérgicos (ex: bromocriptina e pramipexol). Porém, esses medicamentos representam uma alternativa meramente paliativa à DP, uma vez que atuam restabelecendo temporariamente a função dopaminérgica no SNC, sem demonstrar, uma ação neuroprotetora comprovada sobre o processo de neurodegeneração. Diante do cenário atual do tratamento farmacológico para a DP, há uma grande procura por novos agentes não dopaminérgicos (ex: estabilizadores do humor, estatinas, antagonistas seletivos e não-seletivos de adenosina, antagonistas de receptores metabotrópicos e ionotrópicos de glutamato, entre outros) que poderiam representar tratamentos alternativos ou adjuvantes para o alívio dos sintomas motores e não-motores da DP, com reduzidos efeitos colaterais e, principalmente, que pudessem impedir ou retardar o avanço do processo neurodegenerativo.

## 1.5 Estabilizadores do humor

Os fármacos estabilizadores do humor, como o Li e VPA, são utilizados para controlar as flutuações de humor características do transtorno bipolar (Rang et al., 2004). Apesar de serem usados amplamente na clínica, os mecanismos pelos quais o Li e o VPA exercem seus efeitos ainda não estão completamente esclarecidos (Rowe e Chuang, 2004). Sabe-se que o lítio atua em uma série de sistemas de neurotransmissores e de mecanismos de transmissão de sinais, tais como a hidrólise de fosfoinositol, adenilato ciclase, proteínas G, a proteína cinase da glicogênio sintase na sua isoforma  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ) e a proteína cinase C (PKC) (Wang et al., 2003). A GSK- $3\beta$  está envolvida no processo de disfunção colinérgica e morte celular associadas à doença de Alzheimer (Bijur et al., 2000). Por meio de seus efeitos na GSK- $3\beta$  e PKC, o lítio pode alterar também a fosforilação de proteínas do citoesqueleto, o que leva a mudanças de neuroplasticidade (Lenox e Hahn, 2000).

Os efeitos neuroprotetores característicos dos estabilizadores do humor (lítio e valproato) podem ser observados em diversas condições, tais como o tratamento agudo e crônico com anfetamina (Frey et al., 2006a,b), na excitotoxicidade glutamatérgica (Wang et al., 2003; Hashimoto et al., 2002) e na neurotoxicidade causada pelo acúmulo do peptídeo  $\beta$ -amilóide (Alvarez et al., 1999). Estudos demonstraram que o lítio e o valproato possuem a capacidade de atenuar determinadas ações neurodegenerativas, como a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas induzidas por glutamato (Jakopec et al., 2008; Shao et al., 2005), o estresse oxidativo induzido por cloreto de ferro (Wang et al., 2003), o dano cerebral induzido por isquemia (Bian et al., 2007). Além disso, o tratamento com lítio antagoniza a ativação de proteínas cinases ativadas por mitógenos, as MAPK, JNK e p38MAPK (Rowe e Chuang, 2004). Por fim, foi demonstrado que o tratamento crônico com lítio induz a expressão de neurotrofinas, como o BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) em cultura de neurônios corticais de ratos (Chuang, 2004; Vajda, 2002).

O VPA apresenta ações semelhantes as do lítio no que diz respeito à neuroproteção. Por exemplo, ambos aumentam a atividade de ligação do DNA e a atividade dos fatores de transcrição da família 1 de proteínas ativadoras por meio da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK). A ERK modula os efeitos de diversas neurotrofinas, incluindo a diferenciação neuronal, sobrevivência neuronal, neuroplasticidade de longa duração e aprendizado e memória (Yuan et al., 2001). O ácido valpróico aumenta a expressão de genes relacionados à via da ERK e de proteínas antiapoptóticas da família das Bcl-2. Além disso, promove crescimento de neuritos, sobrevivência celular e aumento de captação e liberação de noradrenalina (Yuan et al., 2001). Da mesma forma que o lítio, o ácido

valpróico, em doses terapêuticas, tem efeito inibitório sobre a GSK-3 $\beta$ . A associação do ácido valpróico com o lítio tem efeitos somatórios nessa inibição (Chen et al. 1999; Stambolic et al., 1996).

## 1.6 Atorvastatina

Os inibidores da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase, são potentes redutores dos níveis séricos de colesterol. A enzima HMG-CoA redutase é a enzima limitante da síntese do colesterol, catalizando a redução da HMG-CoA a mevalonato (Nelson e Cox, 2000). Evidências sugerem um efeito neuroprotetor das estatinas independente da redução dos níveis de colesterol em diversas doenças neurológicas incluindo isquemia cerebral, hemorragia intracerebral, DP, encefalomielite alérgicas experimentais, e doença de Alzheimer (Jung et al., 2004; DeKosky, 2005; Stepien et al., 2005; Weber et al., 2005; Li et al., 2006).

Os isoprenóides são derivados de metabólitos intermediários da síntese de colesterol. Esses derivados servem como importantes moléculas lipídicas de adesão para a modificação pós-traducional de muitas proteínas, incluindo as proteínas-G heterotriméricas e as monoméricas, como Ras e Rho. A isoprenilação é um passo crítico para a atividade de diversas proteínas, permitindo ligações covalentes, localização subcelular e tráfego de proteínas para a membrana celular. Por exemplo, a translocação de Rho para a membrana celular é criticamente dependente da geranylgeranilação. Além de reduzir os níveis intracelulares de esteróides, as estatinas também reduzem a formação desses compostos intermediários da via de biossíntese do colesterol (Vaughan, 2003; Takemoto e Liao, 2001). Efeitos anti-inflamatórios das estatinas podem ser atribuídos à redução da isoprenilação de proteínas envolvidas na inflamação e sinalização intracelular.

O papel das estatinas na prevenção de eventos coronarianos relacionados à aterosclerose é bastante conhecido, e por isso tornaram-se os medicamentos de primeira escolha para pacientes com doenças ateroscleróticas (Daimon et al, 2004) entre outras. A hipercolesterolemia é classicamente reconhecida como fator de risco para doença coronariana, mas poucas evidências apontam para uma relação com risco de AVC.

Apesar disso, alguns estudos clínicos claramente indicam que o tratamento com estatinas reduz significativamente o risco de AVC entre pacientes com doença vascular já estabelecida (Vaughan, 2003). Estudos retrospectivos também sugerem que a prevalência da doença de Alzheimer e da demência vascular é menor em pacientes com uso regular de estatinas (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). Esses resultados sugerem que as estatinas podem exercer um amplo efeito neuroprotetor.

Alguns estudos sugerem que as estatinas podem ter efeito direto na redução dos danos causados por radicais livres e oxidação de lipoproteínas.

Elas reduzem a oxidação do LDL induzida pela ativação de leucócitos, além de terem efeitos mais amplos, como a preservação da atividade da enzima superóxido dismutase (Chen et al., 1997). Um efeito neuroprotetor da atorvastatina foi demonstrado em modelo animal de trauma crânio-encefálico, reduzindo o déficit neurológico e aumentando a sinaptogênese, angiogênese e sobrevivência neuronal nos animais tratados por sete dias após o trauma (Lu et al., 2004).

Além dos efeitos em modelos de isquemia e trauma, as ações neuroprotetoras das estatinas também foram observadas em modelo de toxicidade glutamatérgica, protegendo neurônios em cultura da excitotoxicidade induzida por NMDA (Zacco et al., 2003). Evidências clínicas indicam que alguns dos efeitos das estatinas, independentes da redução dos níveis de colesterol, ou efeitos pleiotrópicos, envolvem a melhora ou restauração da função endotelial e redução do estresse oxidativo e inflamação vascular (Takemoto e Liao, 2001). Em nosso laboratório, camundongos pré-tratados por via oral com atorvastatina (1 e 10 mg/kg/dia) durante 7 dias antes da infusão de ácido quinolínico (um agonista de receptores NMDA) intracerebroventricular (i.c.v.) apresentaram neuroproteção contra a morte celular e a indução de convulsões, sendo a concentração de 10 mg/kg/dia mais eficaz (Piermartiri et al., 2009). O pré-tratamento com atorvastatina (10 mg/kg/dia) também atenuou a astrogliose, a peroxidação lipídica, e o aumento da expressão da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e redução da expressão de transportadores glutamatérgicos no hipocampo de camundongos após a neurodegeneração induzida pela administração i.c.v. do peptídeo  $\beta$ -amilóide (1-40) (Piermatiri et al., 2010). Portanto o pré-tratamento com atorvastatina 10 mg/kg/dia (7 dias) pode ser uma possível estratégia de neuroproteção contra o dano cerebral observado em diferentes modelos experimentais.

Atualmente, diferentes estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado potencial papel neuroprotetor no uso de estatinas na DP. A incidência de DP diminuiu em usuários com estatinas. Baseado em dados de um sistema de saúde, Wolozin e colaboradores (2007) constataram que a sinvastatina e a atorvastatina estão ligadas a uma redução na incidência da DP. Além disso, Vuletic e colaboradores (2006) demonstraram que as estatinas atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, tornando assim a eficácia do seu potencial neuroprotetor mais vulnerável em relação a doenças no SNC.

Recentemente, Kumar e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento via oral com atorvastatina (10 e 20 mg/kg) ou sinvastatina (15 e 30 mg/kg) por 14 dias apresentou uma série de efeitos neuroprotetores em relação a alterações no peso corporal, atividade locomotora, desempenho no rota-rod, atividade do complexo I mitocondrial e das defesas oxidativas, além da redução nos níveis das citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ ; IL-6) induzidas pela injeção intraestriatal unilateral da neurotoxina 6-OHDA em

ratos. Esses efeitos estão ligados a uma possível ação do tipo antioxidante e anti-inflamatória, bem como, o restabelecimento da atividade de enzimas do complexo mitocondrial.

Em 2008, Hernández-Romero e colaboradores demonstraram que a sinvastatina preveniu a morte de neurônios dopaminérgicos e a perda de astrócitos, em um modelo que utilizou a administração de LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) na substância negra de ratos. Esses efeitos de neuroproteção podem estar ligados à redução de processos inflamatórios induzidos pelo LPS através da ativação e proliferação de células microgliais, e também a alterações de fosforilação da MAPKs. Uma outra sugestão do estudo é que o efeito neuroprotetor da sinvastatina pode estar associado ao aumento do níveis de BDNF após sofrer um dano com LPS. Segundo Gosh e colaboradores (2009) a sinvastatina apresentou um forte efeito de inibição da ativação da proteína p21<sup>ras</sup>, e da expressão de moléculas pró-inflamatórias na SNpc, após a intoxicação de camundongos com MPTP. Em 2007 esse efeito neuroprotetor da sinvastatina foi também demonstrado por Gosh e colaboradores, através da supressão da proteína p21<sup>ras</sup> e de NFK-B, dessa vez induzidos por MPP<sup>+</sup>. Além desses efeitos descritos, a sinvastatina tem demonstrado efeitos na prevenção da depleção de dopamina no estriado e na nitração de proteínas TH induzidas por MPTP (Selley, et al., 2005), além de inibirem a perda de neurônios dopaminérgicos em modelo crônico de intoxicação com MPTP (Meredith et al., 2008).

### 1.7 Modulação dos receptores adenosinérgicos

Um número crescente de evidências tem demonstrado que a adenosina (ADO) apresenta efeitos opostos aos da dopamina no SNC. A ativação motora induzida por antagonistas dos receptores da adenosina é inibida pela depleção de dopamina ou pelo bloqueio dos receptores da dopamina. Além disso, agonistas de receptores adenosinérgicos inibem, enquanto antagonistas adenosinérgicos potencializam, a estimulação motora induzida por agonistas de receptores dopaminérgicos (ver Ferre et al., 1997, 2001; Franco et al., 2000). Uma descoberta recente neste processo é a colocalização dos receptores D1/A1 e D2/A<sub>2A</sub> no estriado, observado inicialmente em ratos (Ferre et al., 1991) e posteriormente também descrito em humanos (Díaz-Cabiale et al., 2001). Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o mecanismo desta interação entre os receptores de dopamina e adenosina pode envolver a formação de heterodímeros, levando a alterações alostéricas que afetam a afinidade e o acoplamento com as proteínas-G, modulando a eficácia da ativação do receptor A<sub>2A</sub>. Desta forma, a estimulação dos receptores da adenosina diminui a afinidade de ligação de agonistas dopaminérgicos com os receptores da dopamina (Fenández-Dueñas et al., 2012). Ou seja, de maneira geral, os agonistas da adenosina

produzem efeitos similares aos dos antagonistas da dopamina, enquanto que os efeitos dos antagonistas da adenosina assemelham-se aqueles induzidos por agonistas dopaminérgicos (Fuxe et al., 1998). Além disto, a ADO, através de sua interação com os receptores A1 e A<sub>2A</sub>, é responsável por modular a liberação de glutamato, desta forma, controlando a excitotoxicidade (Ciruela et al., 2006).

Dentre os quatro subtipos de receptores para a ADO (A1, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A3), o receptor A<sub>2A</sub> é aquele que tem atraído maior atenção como possível alvo para o tratamento da DP (Mally e Stone, 1998; Ferre et al., 2001; Morelli e Pinna, 2001; Morelli, 2003). O potencial terapêutico da cafeína e de antagonistas seletivos do receptor A<sub>2A</sub> para ADO no tratamento da DP tem sido confirmado em diversos estudos utilizando modelos animais desta doença. A cafeína e antagonistas seletivos do receptor A<sub>2A</sub> para ADO promovem rotação contralateral em ratos que sofreram lesão unilateral da SNC por 6-OHDA (Svenningsson et al., 1999), reduzem a catalepsia induzida por antagonistas do receptor D2 para dopamina (Hauber et al., 2001), além de atenuarem a perda de neurônios dopaminérgicos estriatais induzidas pelo tratamento com MPTP em camundongos (Chen et al., 2001). Além disso, a cafeína reverte os prejuízos cognitivos induzidos pela administração intranigral de MPTP em ratos (Gevaerd et al., 2001). Os efeitos da cafeína e de antagonistas seletivos dos receptores de adenosina do subtipo A<sub>2A</sub>R (ex: KW6002, SCH58261 e ZM241385) têm sido avaliados em pacientes parkinsonianos e em diferentes modelos experimentais da DP (para revisão ver Prediger et al., 2010). Estudos pré-clínicos com roedores demonstram que a cafeína e o bloqueio dos A<sub>2A</sub>R conferem neuroproteção contra a neurodegeneração dopaminérgica (Chen et al., 2001; Kalda et al., 2006) e melhoram os prejuízos motores (Jenner, 2003) em diferentes modelos experimentais da DP. Em adição, achados do nosso grupo de pesquisa e de outros sugerem o potencial da cafeína e de antagonistas do receptor A<sub>2A</sub> no tratamento dos sintomas não motores da DP (ex: disfunções olfatórias e cognitivas) (Prediger et al., 2005; Takahashi et al., 2008; Prediger et al., 2010).

Os mecanismos moleculares pelo qual o bloqueio dos A<sub>2A</sub>R promove neuroproteção contra a neurodegeneração dopaminérgica na DP ainda não estão totalmente elucidados. Uma das principais possibilidades é que o A<sub>2A</sub>R possa modular o processo neuroinflamatório presente em diferentes doenças neurodegenerativas, dentre elas a DP (ver Prediger et al., 2010). O processo de neurodegeneração na DP é acompanhado por uma reação inflamatória, caracterizada pela ativação de células da glia (micróglia e astrócitos) e aumento na liberação de diversos mediadores inflamatórios (ex: fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$ ) responsáveis pela produção de radicais livres (Hunot et al., 1999; McGeer e McGeer, 2004). Segundo Cunha e colaboradores (2007) existe um aumento

no número de A<sub>2A</sub>R em astrócitos e micróglia em roedores submetidos a modelos experimentais da DP, sendo que o bloqueio destes receptores é capaz de prevenir a neuroinflamação e a neurodegeneração dopaminérgica nestes animais (Cunha et al., 2007; Yu et al., 2008).

## 2. JUSTIFICATIVA

Entendemos que este estudo justifica-se pela possibilidade de compreensão das alterações comportamentais (déficits motores e não-motores) e neuroquímicas (imunoistoquímica, viabilidade celular, estresse oxidativo, níveis de monoaminas) induzidos por dois modelos experimentais da DP, a administração i.n. do MPTP e o uso de 6-OHDA *in vitro* em fatias de diversas estruturas cerebrais. Além disto, avaliamos a efetividade de novas estratégias neuroprotetoras, tratamento com estabilizadores do humor (lítio e valproato), no modelo animal *in vivo*. A abordagem proposta deverá contribuir para as pesquisas na área de investigação pré-clínica da DP, possibilitando uma maior compreensão entre a associação de respostas comportamentais com mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo neurodegenerativo desta enfermidade. Entender os mecanismos de uma doença também é fundamental para o desenvolvimento de novas modalidades preventivas e terapêuticas.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral:

Este estudo tem como objetivo avaliar novas estratégias de neuroproteção, bem como alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela administração intranasal (i.n.) de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) *in vivo* e com o uso da neurotoxina 6-hidroxdopamina (6-OHDA) *in vitro*, usados como modelos animais da DP.

### 3.2 Objetivos Específicos:

1. Avaliar o efeito do tratamento com estabilizadores do humor (Li e VPA), sobre as alterações comportamentais observadas nos testes de discriminação olfatória, memória social, esquia inibitória, nado forçado e campo aberto induzidas pela administração i.n. de MPTP em ratos adultos;
2. Avaliar o efeito do tratamento com estabilizadores do humor (Li e VPA), sobre os níveis das monoaminas dopamina e serotonina e seus



- metabólitos (DOPAC, HVA e 5-HIAA) nas regiões do budo olfatório e estriado em ratos adultos submetidos à administração i.n. de MPTP;
3. Avaliar o efeito do tratamento com a ATOR sobre as alterações comportamentais observadas nos testes de discriminação olfatória, memória social, esQUIVA inibitória, nado forçado e campo aberto, induzidas pela administração i.n. de MPTP em ratos adultos;
  4. Avaliar o efeito do tratamento com ATOR sobre alterações bioquímicas (níveis de citocinas pró-inflamatórias e da enzima tirosina hidroxilase) em diferentes áreas cerebrais (estriado e hipocampo) induzidas pela administração i.n. de MPTP.
  5. Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com atorvastatina sobre alterações de viabilidade celular e parâmetros de estresse oxidativo em fatias cerebrais de hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos, induzidas pela 6-OHDA *in vitro*.
  6. Avaliar o efeito do bloqueio farmacológico ou da deleção genética dos receptores  $A_{2A}$  para ADO nos prejuízos olfatórios, emocionais, cognitivos e motores induzidos pela administração i.n. de MPTP em camundongos através da utilização de diferentes testes comportamentais (discriminação olfatória, labirinto em cruz elevado, reconhecimento social, labirinto em Y, localização de objeto, labirinto aquático, suspensão pela cauda, rotarod, teste de agarrar, teste da plataforma e campo aberto).
  7. Avaliar o efeito do bloqueio farmacológico ou da deleção gênica dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina sobre a expressão da proteína tirosina hidroxilase (TH) em diferentes áreas cerebrais (estriado e substância negra) de camundongos tratados com MPTP i.n.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão divididos na forma de capítulos, e apresentados no formato de artigos (publicado, submetido ou em elaboração), seguindo a distribuição abaixo:

**Capítulo I** (Artigo publicado na revista *Behavioural Brain Research*): **Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease**

**Capítulo II** (Artigo submetido à revista *Brain Research*): **Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease**

**Capítulo III** (Artigo em elaboração): **Atorvastatina atenua a toxicidade induzida por 6-OHDA em fatias de estriado, hipocampo e córtex cerebral *in vitro* através da interação com os receptores NMDA**

**Capítulo IV**: (Artigo em elaboração): **Estudo do envolvimento dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina em um modelo experimental da doença de Parkinson: infusão intranasal de MPTP em camundongos**

# ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Mar 12, 2013

This is a License Agreement between Adalberto Castro ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard,Langford Lane Kidlington,Oxford,OX5 1GB,UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Adalberto Castro
Customer address	R. Esteves Junior, 14 Criciúma, Santa Catarina 88811135
License number	3106480616949
License date	Mar 12, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Behavioural Brain Research
Licensed content title	Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease
Licensed content author	Adalberto A. Castro,Karina Ghisoni,Alexandra Latini,João Quevedo,Carla I. Tasca,Rui D.S. Prediger
Licensed content date	1 April 2012
Licensed content volume number	229
Licensed content issue number	1
Number of pages	8
Start Page	208
End Page	215
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Order reference number	None
Title of your	ESTRATÉGIAS DE NEUROPROTEÇÃO EM MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE

thesis/dissertation	PARKINSON: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E COMPORTAMENTAL
Expected completion date	Mar 2013
Estimated size (number of pages)	150
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP
<b>Total</b>	<b>0.00 USD</b>
<a href="#">Terms and Conditions</a>	

### INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:  
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com))
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning

this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

#### LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. **Website:** The following terms and conditions apply to electronic reserve and author websites:

**Electronic reserve:** If licensed material is to be posted to website, the web site is to be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course if:

This license was made in connection with a course,

This permission is granted for 1 year only. You may obtain a license for future website posting,

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image,

A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com> , and

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

17. **Author website** for journals with the following additional clauses:

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image, and the permission granted is limited to the personal version of your paper. You are not allowed to download and post the published electronic version of your article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> . As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

18. **Author website** for books with the following additional clauses:

Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.

A hyper-text must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version.

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

19. **Website** (regular and for author): A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> . or for books to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>

20. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

21. **Other Conditions:**

v1.6

**If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment**

should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK500975333.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:**

Copyright Clearance Center

Dept 001

P.O. Box 843006

Boston, MA 02284-3006

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support:

[customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

---

---

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

## Behavioural Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)

## Research report

## Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease

Adalberto A. Castro<sup>a,b</sup>, Karina Ghisoni<sup>b</sup>, Alexandra Latini<sup>b</sup>, João Quevedo<sup>c</sup>,  
Carla I. Tasca<sup>b</sup>, Rui D.S. Prediger<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC, 88049-900, Brazil<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil<sup>c</sup> Laboratório de Neurociências and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, 88806-000, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 June 2011

Received in revised form 2 January 2012

Accepted 6 January 2012

Available online xxx

## Keywords:

Mood stabilizers

Lithium

Valproate

Parkinson's disease

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6

tetrahydropyridine (MPTP)

Intranasal

Non-motor symptoms

## ABSTRACT

We have recently demonstrated that rodents treated intranasally with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) display time-dependent impairments in olfactory, emotional, cognitive and motor functions associated with disruption of dopaminergic neurotransmission in different brain structures conceivably analogous to those observed during different stages of Parkinson's disease (PD). On the other hand, lithium (Li) and valproate (VPA) are two primary drugs used to treat bipolar mood disorder that have recently emerged as promising neuroprotective agents. The present data indicates that the pretreatment with Li (47.5 mg/kg) or VPA (200 mg/kg) by intraperitoneal route during 7 consecutive days was able to prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments evaluated in the social recognition and step-down inhibitory avoidance tasks in rats infused with a single intranasal (i.n.) administration of MPTP (0.1 mg/nostril). Despite the absence of clear depressive-like responses following the current MPTP dose, Li and VPA treatment presented an antidepressant profile reducing the immobility time in the forced swimming test. Importantly, at this time no significant alterations on the locomotor activity of the animals were observed in the open field test. Moreover, Li and VPA prevented dopamine depletion in the olfactory bulb and striatum of MPTP-infused rats. These results provide new insights in experimental models of PD, indicating that Li and VPA may represent new therapeutic tools for the management of olfactory and cognitive symptoms associated to early preclinical phases of PD, together with their neuroprotective potential demonstrated in previous research.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder that affects approximately 1% of the population older than 50 years [37], and it is characterized by a slow and progressive degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons [14]. Dopamine-replacement therapy has dominated the treatment of PD since the early 1960s and although the currently approved antiparkinsonian agents offer effective relief of the motor deficits, especially in the early/moderate stages of the disease, they have not been found to alleviate the underlying dopaminergic neuron degeneration and drug efficacy is gradually lost [1]. Preclinical studies in laboratory's animals have provided several candidates neuroprotective drugs; however, at this moment there is no proven

therapy to prevent cell death or to restore affected neurons to a normal state [15]. One possible explanation for this limited success on translational research in PD is that new potential agents are frequently tested when the patient already shows the cardinal motor signs (i.e. bradykinesia, rest tremor and muscular rigidity). Unfortunately, the patients only fulfill these clinical criteria when 60–70% of the neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc) are degenerated and the striatal dopamine content is reduced by 80% [59]. Therefore, it seems to be imperative to evaluate new candidate neuroprotective agents in early pre-motor stages of PD.

Nowadays there is considerable evidence showing that the neurodegenerative processes that lead to sporadic PD begin many years before the appearance of the characteristic motor symptoms and additional neuronal fields and neurotransmitter systems are also involved in PD, including the anterior olfactory structures, dorsal motor nucleus of vagus, caudal raphe nuclei, locus coeruleus, the autonomic nervous system, hippocampus and the cerebral cortex [3]. Accordingly, cholinergic, adrenergic and

\* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 9491; fax: +55 48 3337 5479.

E-mail address: [ruidsp@hotmail.com](mailto:ruidsp@hotmail.com) (R.D.S. Prediger).

serotonergic neurons are also lost which seems to be responsible for the non-motor symptoms of PD encompassing olfactory and memory impairments, sleep abnormalities, anxiety and depression, as well as gastrointestinal disturbance, which precede the classical motor symptoms [5]. Non-motor features of PD usually do not respond to dopaminergic medication and probably form the major current challenge faced in the clinical management of PD [5]. The development of new therapies in PD depends on the existence of representative animal models [26], but until recently, no well-accepted model of the early phase of PD was available in the literature. In this context, we have proposed a new experimental model of PD consisting of a single intranasal (i.n.) administration of the proneurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rodents [40,49–51,55]. Adult rodents (both Wistar rats and C57BL/6 mice) treated intranasally with MPTP suffer time-dependent impairments in olfactory, cognitive, emotional and motor functions conceivably analogous to those observed during different stages of PD. Such infusion causes loss of tyrosine hydroxylase (TH) in the olfactory bulb and SNc, resulting in significant dopamine depletion in the olfactory bulb, prefrontal cortex and striatum. We have also identified some pathogenic mechanisms possibly involved in the neurodegeneration induced by i.n. administration of MPTP including mitochondrial dysfunction, oxidative stress, activation of apoptotic cell death mechanisms and glutamatergic excitotoxicity (for review see [49]).

On the other hand, lithium (Li) and valproate (VPA) have been successfully employed therapeutically for treatment of bipolar depressive illness; however, their mechanisms of action are poorly understood. More recently, *in vitro* and *in vivo* studies have pointed the neuroprotective potential of Li and VPA against diverse insults of the central nervous system [10,29,35,36,42]. Of high importance, these two drugs have also been shown to display beneficial effects in cellular and animal models of neurodegenerative diseases such as stroke, Alzheimer's disease, PD, Huntington's disease, spinal cord injury, spinal muscular atrophy, retinal degeneration, and human immunodeficiency virus-1 infection (for review, see [10,69]). Regarding PD, relatively dated clinical studies reported no amelioration of patients treated with VPA [43,56], while Hicks et al. [30] reported recently a series of three PD patients with impulse-control disorders (ICDs) who were effectively treated with VPA. Moreover, recent experimental findings have demonstrated the protective effects of Li and VPA against the dopaminergic neurodegeneration induced by different PD-mimetic toxins, such as MPTP and its active metabolite 1-methyl-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) [6,34,77], 6-hydroxydopamine (6-OHDA) [39] and rotenone [38].

In spite of the available literature indicating the neuroprotective potential of Li and VPA, no consistent evidence for the effects of such agents in the behavioral deficits observed in animal models of PD has to date been documented. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the potential of the treatment with Li and VPA to prevent early non-motor symptoms of PD induced by a single i.n. MPTP administration in rats.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

The subjects were adult male Wistar rats (4 months old, 300–350 g) and juvenile male Wistar rats (25–30 days old) provided by the animal facility of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brazil). Juvenile rats were kept in groups of 10 per cage and served as social stimuli for the adult rats in the social recognition task.

Animals were maintained in a 12-h light–dark cycle (lights on at 6:00 a.m.) at constant room temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and were housed in groups of five animals per cage with free access to food and water. The animals were allowed to adapt to the laboratory conditions for at least 1 week before the behavioral assessment and all tests were carried out between 9:00 and 14:00 h. All procedures used in the present study complied with the guidelines on animal care of the UFSC Ethics Committee on the Use of Animals which follows the “Principles of laboratory animal care”.

### 2.2. Mood stabilizers treatment

The drugs used were Li chloride (47.5 mg/kg) (Globe Química Ltda, Cosmópolis, SP, Brazil), and VPA (200 mg/kg) (Abbott laboratories, São Paulo, Brazil) that were dissolved in saline (NaCl 0.9%). The control solution consisted of saline (vehicle). The drug doses, selected according to previous literature [24,32], were administered by intraperitoneal (i.p.) route in a volume of 1 ml/kg of body weight once daily during 7 consecutive days. Six hours after the last injection of Li or VPA, the animals were infused intranasally with a single bilateral dose of MPTP (0.1 mg/nostril).

### 2.3. Intranasal administration of MPTP

MPTP HCl (Sigma Chemical Co., USA) was administered by i.n. route according to the procedure described by Dluzen and Kefalas [16] and modified by Prediger et al. [51]. Briefly, rats were lightly anaesthetized with isoflurane 0.96% (0.75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, RJ, Brazil) using a vaporizer system (SurgiVet Inc., WI, USA) and a 10-mm piece of PE-50 tubing was inserted through the nostrils. The tubing was connected to a peristaltic pump set at a flow rate of 12.5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . The MPTP HCl was dissolved in 0.9% NaCl (saline) at a concentration of 2 mg/ml, after which it was infused for 4 min (0.1 mg/nostril). The control solution consisted of saline. Animals were given a 1-min interval to regain normal respiratory function and then this procedure was repeated with infusions administered through the contralateral nostrils.

### 2.4. Behavioral tests

During a period of 3–14 days after the i.n. administration of MPTP, independent groups of animals were submitted to a battery of behavioral paradigms that included the olfactory discrimination, social recognition, step-down inhibitory avoidance, forced swimming and open-field tasks. The time point for the performance of each behavioral task was chosen based on previous studies using the i.n. MPTP model [40,49–51,55]. The tasks were scored by the same rater in an observation room, where the rats had been habituated for at least 1 h before the beginning of the tests. Behavior was monitored through a video camera positioned above the apparatuses and the images were analyzed online, in an adjacent room, by an experienced experimenter who was unaware of the experimental group of the animals tested.

#### 2.4.1. Olfactory discrimination

The olfactory discrimination ability of rats was assessed 3 days after i.n. administration of MPTP with an olfactory discrimination task that had been previously evaluated in our laboratory [53]. This task consisted of placing each rat for 5 min in a cage, which was divided into two identical compartments (30 cm  $\times$  30 cm  $\times$  20 cm) separated by an open door, where it could choose between one compartment with fresh sawdust and another with unchanged sawdust (familiar compartment) that the same rat had occupied for 48 h before the test. Each subject was initially placed in the center of the non-familiar compartment and the time (s) spent by the rat in both compartments (familiar vs. non-familiar) was recorded. Usually, mature male rats are able to discriminate between the familiar and the non-familiar compartments, spending much more time in the familiar compartment since they significantly prefer their own odor to no odor at all [4,53].

#### 2.4.2. Social recognition

Short-term social memory was assessed 7 days after i.n. MPTP administration with the social recognition task described by Dantzer et al. [12] and previously evaluated in our laboratory [52–54]. All juveniles were isolated in individual cages for 20 min prior to the beginning of the experiment. The social recognition task consisted of two successive presentations (5 min each), separated by a short period of time, where the juvenile rat was placed in the home cage of the adult rat and the time spent by the adult in investigating the juvenile (nosing, sniffing, grooming, or pawing) was recorded. At the end of the first presentation, the juvenile was removed and kept in an individual cage during the delay period and re-exposed to the same adult rat after 30 min. In this paradigm, if the delay period is less than 40 min, the male adult rats display recognition of this juvenile, as indicated by a significant reduction in the social investigation time during the second presentation [12,52–54].

Time spent in social investigation by the adult rat was measured and then expressed for each animal as the ratio of the second exposure to the first exposure [ratio of investigation duration (RID)]. A reduction in RID reflects a decrease in investigation behavior during the second encounter, demonstrating the recognition ability of the adult rat. This transformation was chosen in order to minimize day-to-day variations on the baseline of performance and to equalize variances among different groups [12,52].

#### 2.4.3. Step-down inhibitory avoidance

The inhibitory avoidance apparatus was an acrylic box (50  $\times$  25  $\times$  25 cm<sup>3</sup>), whose floor consisted of parallel stainless-steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A platform (7-cm wide  $\times$  2.5-cm high) was placed on the floor against the left wall. The animals were placed on the platform and their latency to step down on the grid with the four paws was measured with an automatic device. The animals were submitted to the inhibitory avoidance task at 13–14 days after i.n. MPTP administration using a protocol similar to that described previously [74]. During training sessions,



immediately after stepping down on the grid, the animals received a 0.3-mA, 2.0-s scrambled foot shock. During test sessions, no foot shock was administered and the step-down latency (maximum 180 s) was used as measure of retention. The animals were submitted to a single training session. In order to evaluate short-term memory (STM) and long-term memory (LTM), test sessions were performed 1.5 and 24 h after training, respectively.

#### 2.4.4. Forced swimming

The anhedonic-depressive-like effect was assessed 14 days after i.n. MPTP administration with the forced-swimming test previously described by Porsolt et al. [47]. Rats were placed in individual glass cylinders (40 cm in height and 17 cm in diameter) containing water (water depth was 30 cm;  $25 \pm 1$  °C). Two swimming sessions were conducted (an initial 15-min pretest followed 24 h later by a 5-min test). Two behavioral parameters were scored cumulatively in the second swimming session test only: (i) immobility time (i.e. the time spent floating in the water without struggling, making only those movements necessary to keep the head above the water), and (ii) climbing time (i.e. the time spent making active movements with its forepaws in and out of the water, directed specifically to the cylinder wall).

#### 2.4.5. Open-field

To rule out effects of tested drugs on locomotor activity, the animals were placed for 5 min in an open-field arena at 14 days after i.n. MPTP administration. The apparatus, made of wood covered with impermeable Formica, had a white floor of 100 cm  $\times$  100 cm (divided by black lines into 25 squares of 20 cm  $\times$  20 cm) and white walls, 40 cm high. Each rat was placed in the center of the open field and the numbers of squares crossed and rearing were registered.

#### 2.5. Measurements of dopamine and serotonin levels by high performance liquid chromatography (HPLC)

With the purpose of determining the relationship between the behavioral alterations induced by i.n. administration of MPTP in rats and neurochemical alterations in dopaminergic and serotonergic neurotransmission, the levels of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), serotonin and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) were measured by HPLC at 7 and 14 days after i.n. administration of MPTP or vehicle. Five to six rats from each group were killed by decapitation and their brains were removed immediately and the structures olfactory bulb and striatum were dissected, weighed, and sonicated for 5 s in 10 volumes (v/w) of 0.1 N perchloric acid/0.05% disodium EDTA/0.05% sodium metabisulfite. Dopamine, serotonin and their metabolites present in the supernatants were assessed by HPLC (Alliance e2695, Waters, Milford, USA) and their concentrations were calculated in nanograms per gram of tissue [50].

#### 2.6. Statistical analysis

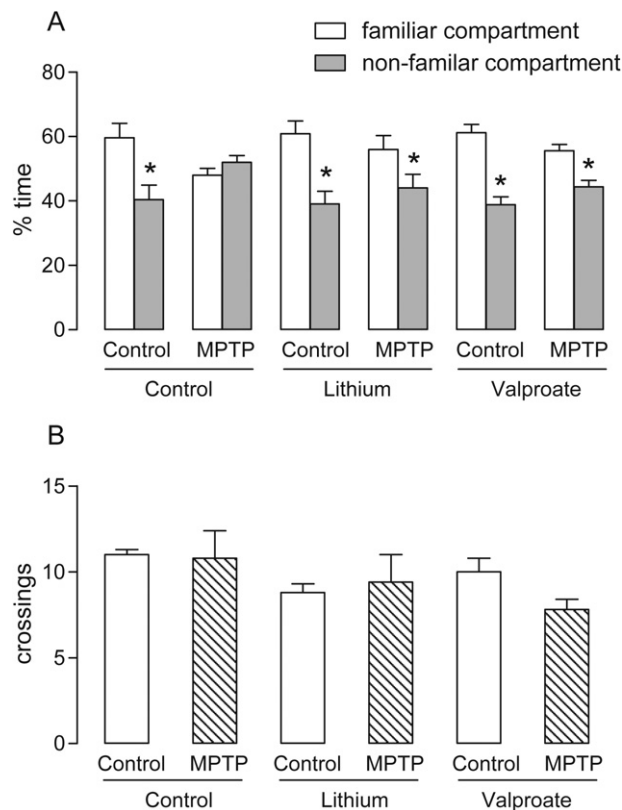
Data for inhibitory avoidance task are shown as median (interquartile range) of step down latencies. Comparisons between groups were performed by Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Dunn's multiple comparison tests using the Graph Pad Prism 4.1 (GraphPad Software Inc.). The rest of data was checked for normality of frequency distribution with the Kolmogorov–Smirnov test and expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and the statistical analysis was carried out using two-way analysis of variance (ANOVA) with pretreatment (saline vs. Li vs. VPA) and treatment (saline vs. MPTP) as independent variables. Following significant ANOVAs, multiple post hoc comparisons were performed using the Newman–Keuls test. The accepted level of significance for the tests was  $P \leq 0.05$ . Parametric tests were performed using the Statistica software package (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Olfactory discrimination

The results for the effects of i.n. administration of MPTP (0.1 mg/nostril) on the olfactory discrimination ability of rats pretreated with saline, Li (47.5 mg/kg, i.p.) or VPA (200 mg/kg) are illustrated in Fig. 1. Two-way ANOVA revealed a significant effect for the pretreatment [ $F_{2,24} = 4.14$ ;  $P \leq 0.05$ ] and treatment [ $F_{1,24} = 5.25$ ;  $P \leq 0.05$ ] factors in the time spent in the familiar compartment.

Subsequent Newman–Keuls test indicated that rats infused intranasally with vehicle solution were able to discriminate between the familiar and the non-familiar compartments, spending much more time in the familiar compartment. However, MPTP-infused rats presented an early disruption in olfactory discrimination ability verified at 3 days after treatment, spending similar time in the familiar and non-familiar compartments. More importantly,



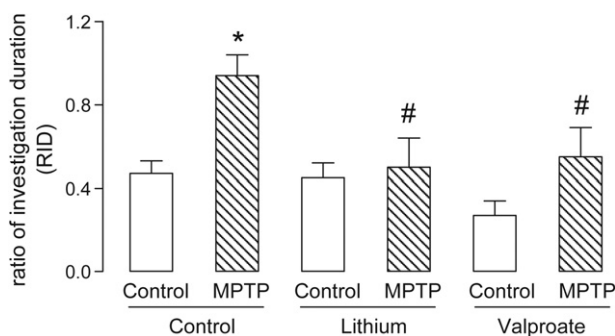
**Fig. 1.** The effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline, lithium (Li, 47.5 mg/kg, i.p.) or valproate (VPA, 200 mg/kg, i.p.) on the olfactory discrimination ability of rats evaluated 3 days after i.n. infusion of MPTP (0.1 mg/nostril). The animals were placed for 5 min in a cage, divided into two identical compartments, where it could choose between one compartment with fresh sawdust (non-familiar; gray) and another with unchanged sawdust that the same mouse had occupied for 48 h before the test (familiar; white). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of the (A) percentage of time spent in each compartment and (B) the number of crossings between both compartments ( $n = 5$  animals in each group). \* $P \leq 0.05$  compared to the percentage of time spent in the familiar compartment (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

pretreatment with Li or VPA prevented the olfactory discrimination deficits induced by i.n. MPTP administration, as indicated by a significant increase in the time spent in the familiar compartment (Fig. 1A). These effects on the olfactory discrimination task seem not related with motor alterations, since no significant effects of pretreatment [ $F_{2,24} = 2.18$ ;  $P = 0.14$ ] nor treatment [ $F_{1,24} = 2.70$ ;  $P = 0.49$ ] factors were observed in the number of crossings between familiar and non-familiar compartments (Fig. 1B).

#### 3.2. Social recognition

The results for the effects of i.n. administration of MPTP (0.1 mg/nostril) on the short-term social recognition memory of rats pretreated with saline, Li (47.5 mg/kg, i.p.) or VPA (200 mg/kg) are illustrated in Fig. 2. Two-way ANOVA revealed a significant effect for the pretreatment [ $F_{2,46} = 4.54$ ;  $P \leq 0.05$ ] and treatment [ $F_{1,46} = 10.26$ ;  $P \leq 0.01$ ] factors in the RID.

The i.n. MPTP treatment, 7 days before the social recognition test, promoted a significant increase in the RID when the same juvenile was re-exposed 30 min after the first encounter, indicating a disruption in the short-term social recognition ability of adult rats caused by i.n. MPTP infusion. Remarkably, pretreatment with Li or VPA prevented the deficit in social recognition ability induced by i.n. MPTP administration, causing a significant reduction in the RID when the familiar juvenile was re-exposed after 30 min (Fig. 2).

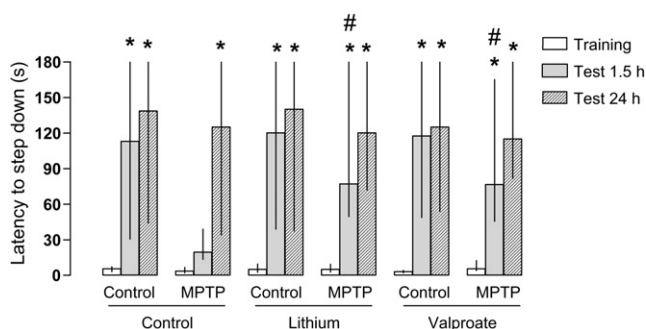


**Fig. 2.** The effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline, lithium (Li, 47.5 mg/kg, i.p.) or valproate (VPA, 200 mg/kg, i.p.) on the social recognition memory of rats evaluated in the social recognition task 7 days after i.n. infusion of MPTP (0.1 mg/nostril). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of RIDs (i.e. the ratio of the second exposure to the first exposure) when the same juvenile was exposed for 5 min with an interval of 30 min ( $n=8-10$  animals in each group). \* $P \leq 0.05$  compared to the control/control-treated group. # $P \leq 0.05$  compared to the control/MPTP-treated group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

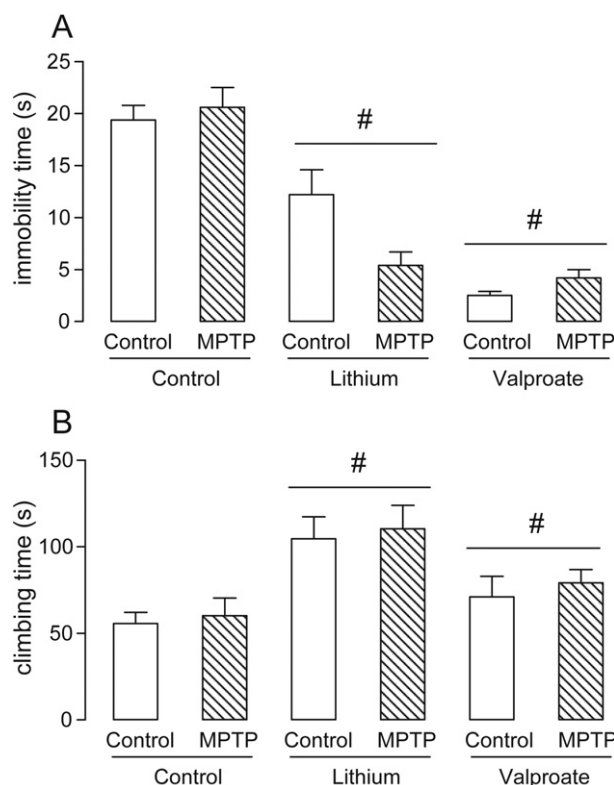
### 3.3. Step-down inhibitory avoidance

The effects of the pretreatment with saline, Li (47.5 mg/kg, i.p.) or VPA (200 mg/kg) on STM and LTM of rats evaluated in the step-down inhibitory avoidance task at 13–14 days after i.n. administration of MPTP (0.1 mg/nostril) are summarized in Fig. 3. In accordance with early findings described in mice [50], the Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Dunn’s multiple comparison tests revealed that the i.n. MPTP administration significantly decreased the step-down latencies during the short-term retention test session (performed 1.5 h after the training session), indicating a selective disruption in the STM.

More importantly, Kruskal–Wallis revealed a significant effect of pretreatment with Li [ $H=43.89$ ;  $P < 0.0001$ ] and VPA [ $H=44.48$ ;  $P < 0.0001$ ] on the step-down latencies of MPTP infused rats. Subsequent Dunn’s multiple comparison tests indicated that pretreatment with Li and VPA increased the step-down latency in MPTP-treated rats evaluated 1.5 h after training (Fig. 3). These results suggest that repeated Li and VPA administration improved short-term inhibitory avoidance memory impairments induced by i.n. MPTP administration in rats.



**Fig. 3.** The effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline, lithium (Li, 47.5 mg/kg, i.p.) or valproate (VPA, 200 mg/kg, i.p.) on short-term (1.5 h) and long-term (24 h) memory of rats evaluated in the step-down inhibitory avoidance task 13–14 days after i.n. infusion of MPTP (0.1 mg/nostril). The results are shown as median (interquartile ranges) of latencies to step-down in the training and test sessions of 10 animals per group. \* $P \leq 0.05$  compared to the training session of the same group. \*\* $P \leq 0.05$  compared to the short-term (1.5 h) test session of the control/MPTP-treated group (Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Dunn’s multiple comparison tests).



**Fig. 4.** The effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline, lithium (Li, 47.5 mg/kg, i.p.) or valproate (VPA, 200 mg/kg, i.p.) on depressive-like behavior of rats evaluated in the forced-swimming test 14 days after i.n. infusion of MPTP (0.1 mg/nostril). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of (A) immobility time and (B) climbing time ( $n=9-10$  animals in each group). # $P \leq 0.05$  compared to the control pretreated group (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

### 3.4. Forced swimming

The effects of the pretreatment with saline, Li (47.5 mg/kg, i.p.) or VPA (200 mg/kg) on the depressive-like behavior of rats evaluated in the forced swimming test at 14 days after i.n. administration of MPTP (0.1 mg/nostril) are summarized in Fig. 4. Two-way ANOVA (pretreatment vs. treatment) revealed a significant effect for the pretreatment factor in the immobility time [ $F_{2,52} = 2.86$ ;  $P \leq 0.05$ ] and climbing time [ $F_{2,52} = 6.47$ ;  $P \leq 0.01$ ]. However, it indicated no significant effects for the treatment factor in the immobility time [ $F_{1,52} = 0.28$ ;  $P = 0.60$ ] and in the climbing time [ $F_{1,52} = 1.34$ ;  $P = 0.10$ ] evaluated in the forced swimming test.

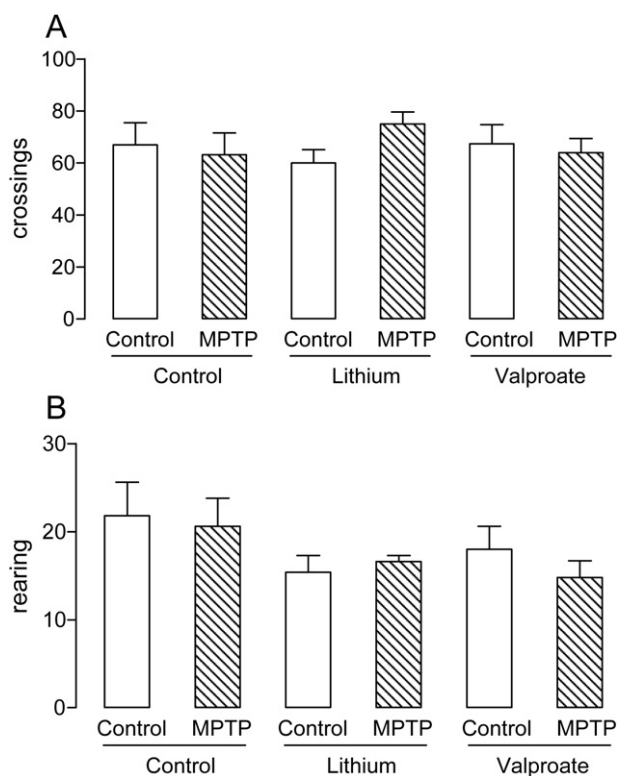
Subsequent post hoc comparisons indicated that, despite the absence of significant effects induced by the current MPTP dose (0.1 mg/nostril), the pretreatment with Li and VPA reduced the immobility time (Fig. 4A) and increased the climbing time (Fig. 4B) of the animals, consistent with an antidepressant-like profile.

### 3.5. Open field

The results of locomotor activity evaluated in the open field arena (for 5 min) 14 days after i.n. MPTP (0.1 mg/nostril) administration are summarized in Fig. 5. Two-way ANOVA (pretreatment vs. treatment) revealed no significant effects for the main factors in the number of squares crossed [pretreatment:  $F_{2,24} = 0.97$ ;  $P = 0.40$ ; treatment:  $F_{1,24} = 1.21$ ;  $P = 0.28$ ] and rearing [pretreatment:  $F_{2,24} = 1.31$ ;  $P = 0.29$ ; treatment:  $F_{1,24} = 1.20$ ;  $P = 0.28$ ].

### 3.6. Dopamine and serotonin levels

As illustrated in Fig. 6, the i.n. infusion of MPTP (0.1 mg/nostril) promoted a significant dopamine depletion in the olfactory bulb



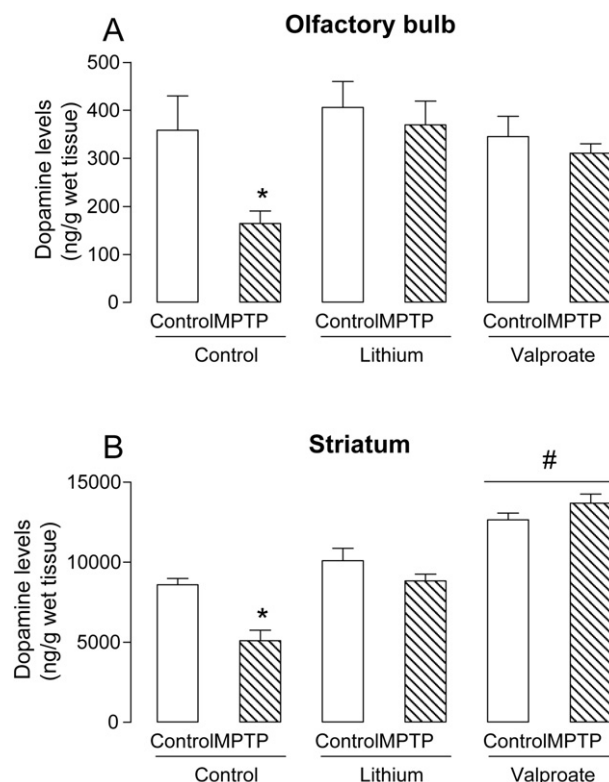
**Fig. 5.** The effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline, lithium (Li, 47.5 mg/kg, i.p.) or valproate (VPA, 200 mg/kg, i.p.) on locomotor activity of rats evaluated in the open field test 7 days after i.n. infusion of MPTP (0.1 mg/nostril). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of the number of (A) crossings and (B) rearing during 5 min ( $n = 5$  animals in each group).

[ $F_{1,24} = 5.28$ ;  $P \leq 0.05$ ] and striatum [ $F_{1,24} = 2.90$ ;  $P \leq 0.05$ ] of rats observed, respectively, at 7 and 14 days after i.n. MPTP administration. At these times, the levels of dopamine metabolites DOPAC and HVA were also significantly decreased in these brain structures ( $P \leq 0.05$ ) (data not shown). Remarkably, two-way ANOVA also indicated that the pretreatment with Li or VPA prevented the dopamine depletion induced by i.n. MPTP administration in both the olfactory bulb [ $F_{2,24} = 3.59$ ;  $P \leq 0.05$ ] and striatum [ $F_{2,24} = 88.68$ ;  $P \leq 0.0001$ ] of rats (Fig. 6A and B, respectively). Moreover, repeated administration of VPA resulted in significantly increased striatal dopamine levels compared to saline-treated control rats (Fig. 6B). On the other hand, the current pretreatment with Li or VPA as well as the treatment with MPTP did not alter the serotonin and 5-HIAA levels in the olfactory bulb and striatum of rats (data not shown).

#### 4. Discussion

There is increasing evidence of the protective effects of the mood stabilizers agents Li and VPA against the dopaminergic neurodegeneration induced by different PD-mimetic toxins [34,38,39,77]. The current findings provide new insights in experimental models of PD, indicating that Li and VPA may represent novel therapeutic tools for the management of non-motor symptoms of PD, since they were able to prevent the olfactory discrimination and STM impairments in rats infused with a single i.n. administration of MPTP.

As recently highlighted by Taylor et al. [70], since research continues to unmask PD as a multi-system disorder, animal PD models should also present non-motor behavioral features of this disease. In this context, in a recent series of studies we have proposed a new animal model of PD consisting of a single i.n. administration of MPTP in rats [40,49,51,55]. Remarkably, MPTP



**Fig. 6.** The effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline, lithium (Li, 47.5 mg/kg, i.p.) or valproate (VPA, 200 mg/kg, i.p.) on dopamine levels in the olfactory bulb and striatum of rats evaluated, respectively, at 7 and 14 days after i.n. infusion of MPTP (0.1 mg/nostril). The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. dopamine levels (ng/g wet tissue) of 5–6 animals in each group. \* $P \leq 0.05$  compared to the control/control-treated group. # $P \leq 0.05$  compared to the control pretreated group (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

is not being widely used in rats at the present time, since early studies have demonstrated that rats injected systemically with MPTP doses comparable to those used in mice do not show any significant dopaminergic degeneration [8,33]. More recently, it has been suggested that the i.n. route bypasses the blood–brain barrier and avoids peripheral and brain capillaries metabolic effects capable of decreasing MPTP toxicity following systemic administration in rats (for review see [48,49]). Therefore, the nasal cavity might represent an additional route for the research of MPTP effects in rats. Consistent with this suggestion, rats treated intranasally with MPTP suffered progressive impairments in olfactory, emotional, cognitive and motor functions associated with time-dependent disruption of dopaminergic neurotransmission in different brain structures which appears to be correlated with different stages of the human PD [40,49,51,55]. Therefore, the present study further validates the proposed i.n. MPTP rat model of PD. According to Braak's hypothesis, the olfactory bulb is one of the first brain structures to display the pathology related to PD [3]. Corroborating this hypothesis, approximately 90% of PD patients exhibit during the earliest phases of the disease olfactory dysfunction unresponsive to current treatments of PD [19]. In the present study, the i.n. administration of MPTP (0.1 mg/nostril) promoted an early disruption in the olfactory discrimination ability of rats, verified 3 days after MPTP treatment, who spent similar time in the familiar and non-familiar compartments. We suggest that the inability of MPTP-treated rats to discriminate between the familiar and the non-familiar compartments really reflects a deficit in olfactory discrimination, and not a simple locomotor impairment, since no alteration in the number of crossings between the familiar and non-familiar compartments as well as in the behavioral parameters evaluated in the open field was

observed after i.n. MPTP treatment. In accordance with our findings, Schintu et al. [63] using a protocol of chronic i.p. administration of MPTP (25 mg/kg) plus probenecid (250 mg/kg) in mice twice a week for 5 weeks demonstrated that olfactory dysfunction already appeared after the first injection, whereas motor impairments only appeared after the third and worsened upon subsequent administrations.

We also investigated the impact of i.n. MPTP administration on social recognition memory of adult rats. The social recognition memory is a particular model of olfactory memory mediated by olfactory cues [62] and may involve a non-procedural form of a short-term working memory based upon the olfactory discriminative ability of rats. Corroborating recent findings from our group [40], rats infused intranasally with MPTP (0.1 mg/nostril) spent significantly more time investigating the juvenile rat during the second presentation than they did in the first encounter, suggesting an impaired ability to recognize the familiar juvenile rat after a short time.

The observed olfactory discrimination and short-term olfactory memory deficits induced by the i.n. MPTP administration were correlated with a significant reduction of dopamine levels (about 55%) and its metabolites DOPAC and HVA in the olfactory bulb of rats. Our results are in accordance with several lines of evidence that strongly suggest the involvement of dopamine in olfactory processing. The olfactory bulb of mammals contains a large population of dopaminergic interneurons, principally periglomerular and external tufted cells, which are important for the odor information processing [28]. Most data indicate that these dopaminergic cells constitute the entire dopamine content in the bulb, although there is a report of a minor projection from the ventral tegmental area [25]. One systemic injection of a dopaminergic agonist can reduce odor detection [21] and can abolish the odor-induced metabolic activation pattern in the olfactory bulb [60]. Moreover, dopamine appears to be necessary for olfactory memory because its release increases during olfactory learning [11] whereas dopamine receptor antagonists [52,54,75] or treatments that reduce the dopaminergic neurotransmission such as MPTP [17,50] and reserpine [52,54] inhibit olfactory memory.

Of high importance, the present findings demonstrate that the pretreatment with Li (47.5 mg/kg) or VPA (200 mg/kg) by i.p. route during 7 consecutive days was able to prevent the olfactory discrimination and the short-term social recognition memory impairments as well as the dopamine depletion in the olfactory bulb of MPTP-treated rats. Therefore, from these limited results it appears that Li and VPA might be particularly useful to restore impaired olfactory function in PD. However, we cannot rule out the noradrenergic participation in the MPTP-related olfactory deficits of the present study. Previous studies [16,50] have indicated that the i.n. MPTP administration induced a marked noradrenaline depletion in the olfactory bulb of mice. Furthermore, the olfactory bulb of rodents receives a prominent noradrenergic input from the locus coeruleus [66]. Indeed, noradrenaline has been implicated as playing an important role in the social recognition memory in rodents [18]. That being said, however, 6-OHDA depletion of noradrenaline in the olfactory bulb has no demonstrable effect on the rat's ability to detect odors [20].

Since the i.n. administration of MPTP does not cause, at least at initial periods, gross motor alterations that would preclude assessment of cognitive and emotional functions, we also investigated whether such behaviors are affected in these animals. Previous studies from our group have demonstrated that rodents treated intranasally with MPTP performed normally in the long-term retention session (24 h after training) of the inhibitory avoidance task [50] and in the spatial reference memory version of the water maze [51]. In contrast, MPTP-infused animals displayed a poor performance in the short-term retention session (1.5 h after training)

of the inhibitory avoidance task [50] as well as in the working memory version of the water maze [51]. These findings are consistent with the view of human studies suggesting that PD patients present deficits in working memory and STM tasks mainly dependent of the frontostriatal circuitry (for review see [45,78]) with long-term spatial (declarative) memories mostly spared [2,22].

In the present study we provided new evidence that the pretreatment with Li or VPA improved selectively the STM impairments induced by i.n. MPTP administration in rats evaluated in the inhibitory avoidance task. Moreover, pretreatment with Li or VPA prevented the striatal dopamine depletion (about 40% of control) induced by i.n. MPTP infusion. The current results are in accordance with previous findings indicating the neuroprotective and cognitive-enhancing properties of Li and VPA in diverse animal models of brain injury. For instance, Zhu et al. [80] have demonstrated that Li treatment (1 mmol/kg, i.p.) given daily for 14 days before the onset of moderate traumatic brain injury (TBI) enhanced spatial learning and memory performance of injured mice. Interestingly, Houghoghi et al. [31] demonstrated that intra-hippocampal administration of Li prevents morphine-induced amnesia in mice through the modulation of the dopaminergic system. Moreover, Li pretreatment attenuated both the cognitive deficits and the reduction in choline acetyltransferase activity caused by fore-brain cholinergic system lesion [46]. Recently, Zhang et al. [79] demonstrated that long-term Li treatment reduces  $\gamma$ -cleavage of amyloid precursor protein (APP), amyloid-beta production, and senile plaque formation, improving spatial learning and memory deficits in aged double transgenic mouse model of AD. Furthermore, chronic Li treatment increases long-term potentiation (LTP) of the granule cells in the dentate gyrus of the hippocampus in rats [65] as well as it enhances learning and memory processes in rats [41,72]. Altogether, this previous literature strongly suggests the potential of Li as a neuroprotective agent and cognitive enhancer (for review see [71]).

In the same way, VPA provides neuroprotection and improves cognitive function in rats submitted to TBI [13]. Moreover, VPA inhibits amyloid-beta production, neuritic plaque formation, and memory deficits in mouse models of Alzheimer's disease [57]. On the other hand, some authors have also described that VPA may cause cognitive impairments by reducing neurogenesis within the hippocampus [64,73]. Beyond the olfactory and cognitive symptoms, mood disorders are the most prevalent psychiatric problems associated to PD, and affect up to 50% of patients [68]. Recent pre-clinical findings have indicated that through the use of low doses and/or specific routes of administration (e.g. intranigral, intrastriatal, intranasal), some toxins widely used to induce experimental parkinsonism such as MPTP and 6-OHDA induce depressive-like behaviors in rodents with no major motor impairments [40,61,67]. For instance, Moreira et al. [40] have recently demonstrated that the i.n. infusion of MPTP (1 mg/nostril) caused a depressive-like behavior in rats, reflected by an increased immobility time in the forced swimming test observed at 16 days after treatment. The findings obtained in the present study indicate that, as expected, the MPTP dose administered by i.n. route also represents an important factor that modulates depressive-related parameters in the present PD model. Here we observed that the i.n. administration of 0.1 mg/nostril of MPTP, which represents a 10-fold lower dose when compared to that used by Moreira et al. [40], did not alter significantly the behavioral parameters evaluated in the forced swimming test. Despite this limitation, in accordance with an extensive literature (see for example [27,58]), the pretreatment with Li and VPA reduced significantly the immobility time of the animals, consistent with an antidepressant-like profile.

It must be conceded that, at present stage, it not possible to determine the exact site of action and molecular mechanisms underlying the olfactory discrimination and STM memory

impairments in MPTP-treated rats are improved by Li and VPA. Nevertheless, based on previous studies addressing the neuroprotective effects of such drugs on experimental models of PD, a speculative hypothesis can be given. For instance, Youdim and Arraf [77] demonstrated the ability of a diet supplemented with Li (1.1–4.4 g/kg) during 4 weeks to prevent the depletion of striatal dopamine and its metabolites DOPAC and HVA in mice treated with MPTP (24 mg/kg, i.p., once daily for 3 days). Importantly, Li did not interfere with the metabolism of MPTP, or with its brain uptake, since, the level of its monoamine oxidase (MAO) B derived metabolite, MPP<sup>+</sup>, was not altered by Li diet [77]. Of high importance, previous cellular and in vivo studies have demonstrated that the neuroprotective effects induced by Li are mediated via up-regulation of anti-apoptotic and reduction of pro-apoptotic Bcl-2 family proteins, including Bcl-2 and Bax [7,9,77]. In these respects, the dopaminergic neurotoxin MPTP has an opposite action, which contributes to its neurotoxic action [44,76]. Therefore, the anti-apoptotic activity may represent an important molecular mechanism underlying Li prevent the behavioral deficits induced by i.n. MPTP administration, since we previously identify apoptosis as a pathogenic mechanism involved in the dopaminergic neurodegeneration observed in the i.n. MPTP rodent model of PD [49,50,55].

Additionally, Monti et al. [38] have recently evaluated the effects of a schedule of dietary administration of VPA (2% VPA added to the chow) during 4 weeks on degeneration of nigro-striatal dopaminergic neurons in rats induced by a sub-chronic administration of the mitochondrial toxin, rotenone, via osmotic pumps. Interestingly, the authors described that VPA treatment significantly counteracted the death of nigral neurons and the 50% drop of striatal dopamine levels caused by rotenone administration [38]. These findings corroborate previous results on VPA neuroprotection in cellular models of PD-like neurodegeneration [6,39]. Moreover, Kidd and Schneider [34] published recently a highlight study where VPA (400 mg/kg, i.p.) was co-administered with MPTP (25 mg/kg, s.c., twice daily) for 5 days to mice and continued for an additional 2 weeks after the final MPTP injection. VPA was able to partially prevent striatal dopamine depletion and almost completely protect against substantia nigra dopaminergic cell loss. These results suggest that VPA may be a potential disease-modifying therapy for PD. The neuroprotective effect of VPA correlates with inhibition of histone deacetylase activity and with increased histone acetylation in the substantia nigra and frontal cortex [34] which increases the transcription of many factors that may contribute to the protection of dopaminergic neurons following MPTP exposure, including free radical scavengers and anti-apoptotic Bcl-2 family members [23]. However, further studies are certainly necessary to confirm this hypothesis.

In conclusion, the present study provides preclinical data indicating that repeated systemic treatment with Li or VPA prevents the olfactory discrimination and STM impairments as well as dopamine depletion in the olfactory bulb and striatum of rats infused with a single i.n. administration of MPTP (0.1 mg/nostri). These results provide new insights in experimental models of PD, indicating that the mood stabilizers agents Li and VPA may represent novel therapeutic tools for the management of olfactory and cognitive symptoms associated to early preclinical phases of PD.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX), and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC). A.A.C. and

K.G. receive scholarships from CAPES, J.Q., A.L., C.I.T. and R.D.S.P. are supported by research fellowships from CNPq. The authors have no financial or personal conflicts of interest related to this work.

## References

- [1] Allain H, Bentue-Ferrer D, Akwa Y. Disease-modifying drugs and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2008;84:25–39.
- [2] Bosboom JL, Stoffers D, Wolters E. Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2004;111:1303–15.
- [3] Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004;318:121–34.
- [4] Carr WJ, Yee L, Gable D, Marasco E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. *J Comp Physiol Psychol* 1976;90:821–8.
- [5] Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH. National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2006;5:235–45.
- [6] Chen PS, Peng GS, Li G, Yang S, Wu X, Wang CC, et al. Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. *Mol Psychiatry* 2006;11:1116–25.
- [7] Chen RW, Chuang DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem* 1999;274:6039–42.
- [8] Chiueh CC, Markey SP, Burns RS, Johannessen JN, Pert A, Kopin JJ. Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. *Eur J Pharmacol* 1984;100:189–94.
- [9] Chuang DM, Chen RW, Chalecka-Franaszek E, Ren M, Hashimoto R, Senatorov V, et al. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord* 2002;4:129–36.
- [10] Chuang DM. Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: can it be used to treat neurodegenerative diseases? *Crit Rev Neurobiol* 2004;16:83–90.
- [11] Coopersmith R, Wehnmuller FB, Kirstein CL, Marshall JF, Leon M. Extracellular dopamine increase in neonatal olfactory bulb during odor preference training. *Brain Res* 1991;564:149–53.
- [12] Dantzer R, Bluthé RM, Koob GF, Le Moal M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophysial peptides. *Psychopharmacology* 1987;91:363–8.
- [13] Dash PK, Orsi SA, Zhang M, Grill RJ, Pati S, Zhao J, et al. Valproate administered after traumatic brain injury provides neuroprotection and improves cognitive function in rats. *PLoS ONE* 2010;5:e11383.
- [14] Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 2003;302:819–22.
- [15] Dawson TM, Dawson VL. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2002;5:1058–61.
- [16] Dluzen DE, Kefalas G. The effects of intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) upon catecholamine concentrations within olfactory bulbs and corpus striatum of male mice. *Brain Res* 1996;741:215–9.
- [17] Dluzen DE, Kreutzberg JD. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) disrupts social memory/recognition processes in the male mouse. *Brain Res* 1993;609:98–102.
- [18] Dluzen DE, Muraoka S, Landgraf R. Olfactory bulb norepinephrine depletion abolishes vasopressin and oxytocin preservation of social recognition responses in rats. *Neurosci Lett* 1998;254:161–4.
- [19] Doty RL, Deems DA, Stellar S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology* 1988;38:1237–44.
- [20] Doty RL, Fergusson-Segall M, Lucki I, Kreider M. Effects of intrabulbar injections of 6-hydroxydopamine on ethyl acetate odor detection in castrate and non-castrate male rats. *Brain Res* 1988;444:95–103.
- [21] Doty RL, Risser JM. Influence of the D2 dopamine receptor agonist quinpirole on the odor detection performance of rat before and after spiperone administration. *Psychopharmacology* 1989;98:310–5.
- [22] Dubois B, Pillon B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. *J Neurol* 1997;244:2–8.
- [23] Faraco G, Pancani T, Formentini L, Mascagni P, Fossati G, Leoni F, et al. Pharmacological inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene expression and reduces ischemic injury in the mouse brain. *Mol Pharmacol* 2006;70:1876–84.
- [24] Frey BN, Valvassori SS, Reus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 2006;31:326–32.
- [25] Gall CM, Hendry SH, Seroogy KB, Jones EG, Haycock JW. Evidence of coexistence of GABA and dopamine in neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1987;266:307–18.
- [26] Gerlach M, Foley P, Riederer P. The relevance of preclinical studies for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol* 2003;250(Suppl. 1):131–4.
- [27] Ghasemi M, Sadeghipour H, Poorheidari G, Dehpour AR. A role for nitric oxide system in the antidepressant-like effects of chronic lithium treatment in the mouse forced swimming test. *Behav Brain Res* 2009;200:76–82.
- [28] Halasz N, Shepherd GM. Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience* 1983;10:579–619.

- [29] Hashimoto R, Hough C, Nakazawa T, Yamamoto T, Chuang DM. Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. *J Neurochem* 2002;80:589–97.
- [30] Hicks CW, Pandya MM, Itin I, Fernandez HH. Valproate for the treatment of medication-induced impulse-control disorders in three patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2011;17:379–81.
- [31] Houghoghi V, Rezayof A, Zyaian S, Zarrindast MR. Intradorsal hippocampal microinjection of lithium reverses morphine-induced impairment of memory in mice: interactions with dopamine receptor mechanism(s). *Behav Pharmacol* 2009;20:680–7.
- [32] Jornada LK, Valvassori SS, Steckert AV, Moretti M, Mina F, Ferreira CL, et al. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *J Psychiatr Res* 2011;45:162–8.
- [33] Kalaria RN, Mitchell MJ, Harik SI. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood–brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3521–5.
- [34] Kidd SK, Schneider JS. Protective effects of valproic acid on the nigrostriatal dopamine system in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2011;194:189–94.
- [35] Leng Y, Chuang DM. Endogenous alpha-synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity. *J Neurosci* 2006;26:7502–12.
- [36] Leng Y, Liang MH, Ren M, Marinova Z, Leeds P, Chuang DM. Synergistic neuroprotective effects of lithium and valproic acid or other histone deacetylase inhibitors in neurons: roles of glycogen synthase kinase-3 inhibition. *J Neurosci* 2008;28:2576–88.
- [37] Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:81–104.
- [38] Monti B, Gatta V, Piretti F, Raffaelli SS, Virgili M, Contestabile A. Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein. *Neurotox Res* 2010;17:130–41.
- [39] Monti B, Polazzi E, Batti L, Crochemore C, Virgili M, Contestabile A. Alpha-synuclein protects cerebellar granule neurons against 6-hydroxydopamine-induced death. *J Neurochem* 2007;103:518–30.
- [40] Moreira EL, Rial D, Aguiar Jr AS, Figueiredo CP, Siqueira JM, DalBo S, et al. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2010;117:1337–51.
- [41] Nocjar C, Hammonds MD, Shim SS. Chronic lithium treatment magnifies learning in rats. *Neuroscience* 2007;150:774–88.
- [42] Nonaka S, Chuang DM. Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats. *Neuroreport* 1998;9:2081–4.
- [43] Nutt J, Williams A, Plotkin C, Eng N, Ziegler M, Calne DB. Treatment of Parkinson's disease with sodium valproate: clinical, pharmacological, and biochemical observations. *Can J Neurol Sci* 1979;6:337–43.
- [44] Offen D, Beart PM, Cheung NS, Pascoe CJ, Hochman A, Gorodin S, et al. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5789–94.
- [45] Owen AM. Cognitive dysfunction in Parkinson's disease: the role of frontostriatal circuitry. *Neuroscientist* 2004;10:525–37.
- [46] Pascual T, Gonzalez JL. A protective effect of lithium on rat behaviour altered by ibotenic acid lesions of the basal forebrain cholinergic system. *Brain Res* 1995;695:289–92.
- [47] Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977;266:730–2.
- [48] Prediger RD, Aguiar Jr AS, Matheus FC, Walz R, Antoury L, Raisman-Vozari R, et al. Intranasal administration of neurotoxicants in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2012;21:90–116.
- [49] Prediger RD, Aguiar Jr AS, Moreira EL, Matheus FC, Castro AA, Walz R, et al. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. *Curr Pharm Des* 2011;17:489–507.
- [50] Prediger RD, Aguiar Jr AS, Rojas-Mayorquin AE, Figueiredo CP, Matheus FC, Ginetet L, et al. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2010;17:114–29.
- [51] Prediger RD, Batista LC, Medeiros R, Pandolfo P, Florio JC, Takahashi RN. The risk is in the air: intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2006;202:391–403.
- [52] Prediger RD, Batista LC, Miyoshi E, Takahashi RN. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. *Behav Brain Res* 2004;153:149–57.
- [53] Prediger RD, Batista LC, Takahashi RN. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol Aging* 2005;26:957–64.
- [54] Prediger RD, Da Cunha C, Takahashi RN. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behav Pharmacol* 2005;16:209–18.
- [55] Prediger RD, Rial D, Medeiros R, Figueiredo CP, Doty RL, Takahashi RN. Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1170:629–36.
- [56] Price PA, Parkes JD, Marsden CD. Sodium valproate in the treatment of levodopa-induced dyskinesia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1978;41:702–6.
- [57] Qing H, He G, Ly PT, Fox CJ, Staufienbiel M, Cai F, et al. Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 2008;205:2781–9.
- [58] Redrobe JP, Bourin M. The effect of lithium administration in animal models of depression: a short review. *Fundam Clin Pharmacol* 1999;13:293–9.
- [59] 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* 1976;38:277–301.
- [60] Sallaz M, Jourdan F. Apomorphine disrupts odour-induced patterns of glomerular activation in the olfactory bulb. *Neuroreport* 1992;3:833–6.
- [61] Santiago RM, Barbieiro J, Lima MM, Dombrowski PA, Andreatini R, Vital MA. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34:1104–14.
- [62] Sawyer TF, Hengehold AK, Perez WA. Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats. *Behav Neurosci* 1984;98:908–13.
- [63] Schintu N, Frau L, Ibba M, Garau A, Carboni E, Carta AR. Progressive dopaminergic degeneration in the chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2009;16:127–39.
- [64] Sgobio C, Ghiglieri V, Costa C, Bagetta V, Siliquini S, Barone I, et al. Hippocampal synaptic plasticity, memory, and epilepsy: effects of long-term valproic acid treatment. *Biol Psychiatry* 2010;67:567–74.
- [65] Shim SS, Hammonds MD, Ganocy SJ, Calabrese JR. Effects of sub-chronic lithium treatment on synaptic plasticity in the dentate gyrus of rat hippocampal slices. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:343–7.
- [66] Shipley MT, Halloran FJ, de la Torre J. Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 1985;329:294–9.
- [67] Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a pre-motor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2008;156:830–40.
- [68] Tandberg E, Larsen JP, Aarsland D, Cummings JL. The occurrence of depression in Parkinson's disease. A community-based study. *Arch Neurol* 1996;53:175–9.
- [69] Tariot PN, Loy R, Ryan JM, Porsteinsson A, Ismail S. Mood stabilizers in Alzheimer's disease: symptomatic and neuroprotective rationales. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1567–77.
- [70] Taylor TN, Greene JG, Miller GW. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2010;211:1–10.
- [71] Tsaltas E, Kontis D, Boulougouris V, Papadimitriou GN. Lithium and cognitive enhancement: leave it or take it. *Psychopharmacology* 2009;202:457–76.
- [72] Tsaltas E, Kyriazi T, Pouloupoulou C, Kontis D, Maillis A. Enhancing effects of lithium on memory are not by-products of learning or attentional deficits. *Behav Brain Res* 2007;180:241–5.
- [73] Umka J, Mustafa S, ElBeltagy M, Thorpe A, Latif L, Bennett G, et al. Valproic acid reduces spatial working memory and cell proliferation in the hippocampus. *Neuroscience* 2010;166:15–22.
- [74] Walz R, Roessler R, Quevedo J, Rockenbach IC, Amaral OB, Vianna MR, et al. Dose-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by immediate post-training infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical structures. *Behav Brain Res* 1999;105:219–23.
- [75] Weldon DA, Travis ML, Kennedy DA. Posttraining D1 receptor blockade impairs odor conditioning in neonatal rats. *Behav Neurosci* 1991;105:450–8.
- [76] Yang L, Matthews RT, Schulz JB, Klockgether T, Liao AW, Martinou JC, et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J Neurosci* 1998;18:8145–52.
- [77] Youdim MB, Arraf Z. Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: involvements of Bcl-2 and Bax. *Neuropharmacology* 2004;46:1130–40.
- [78] Zgaljardic DJ, Borod JC, Foldi NS, Mattis P. A review of the cognitive and behavioral sequelae of Parkinson's disease: relationship to frontostriatal circuitry. *Cogn Behav Neurol* 2003;16:193–210.
- [79] Zhang X, Heng X, Li T, Li L, Yang D, Du Y, et al. Long-term treatment with lithium alleviates memory deficits and reduces amyloid-beta production in an aged Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis* 2011;24:739–49.
- [80] Zhu ZF, Wang QG, Han BJ, William CP. Neuroprotective effect and cognitive outcome of chronic lithium on traumatic brain injury in mice. *Brain Res Bull* 2010;83:272–7.

## CAPÍTULO II

### **Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease**

Adalberto A. Castro<sup>b,c</sup>, Bárbara P. Wiemes<sup>b</sup>, Filipe C. Matheus<sup>c</sup>, Fernanda R. Lapa<sup>d</sup>, Giordano G. Viola<sup>b</sup>, Adair R. Santos<sup>a,d</sup>, Carla I. Tasca<sup>a,b,\*</sup>, Rui D. Prediger<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurociências, <sup>b</sup>Departamento de Bioquímica, <sup>c</sup>Departamento de Farmacologia, <sup>d</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

\* These authors contribute equally to this study.

Corresponding author: Rui Daniel S. Prediger, PhD

Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88049-900, Florianópolis, SC, Brazil.

Phone 55 48 3721 9491 – Fax 55 48 3337 5479

E-mail address: ruidsp@hotmail.com

#### **Abstract**

Affective disorders and memory impairments precede the classical motor symptoms seen in Parkinson's disease (PD) and the currently approved antiparkinsonian agents do not alleviate the non-motor symptoms as well as the underlying dopaminergic neuron degeneration. On the other hand, there is increasing evidence that inflammation plays a key role in the pathophysiology of PD and that the anti-inflammatory actions of statins are related to their neuroprotective properties against different insults in the CNS. The present data indicates that the oral treatment with atorvastatin (10 mg/kg/day), once a day during 7 consecutive days, was able to prevent short-term memory impairments and depressive-like behavior of rats assessed in the social recognition and forced swimming tests at 7 and 14 days, respectively, after a single intranasal (i.n.) administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (1 mg/nostril). Importantly, at this time no significant alterations on the locomotor activity of the animals were observed in the open field test. Moreover, atorvastatin was found to protect against the long-lasting motor deficits evaluated in activity chambers

and the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta observed at 21 days after i.n. MPTP administration. Despite the absence of clear alterations on the animals' performance in a spatial reference memory version of the water maze and in concentrations of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 in striatum and hippocampus following i.n. MPTP administration, atorvastatin treatment resulted in a significant increase in the striatal and hippocampal levels of nerve growth factor (NGF). These findings reinforce and extend the notion of the neuroprotective potential of atorvastatin and suggest that it may represent a new therapeutic tool for the management of motor and non-motor symptoms of PD.

*Keywords:* Atorvastatin; Parkinson's disease; MPTP; Intranasal; Neuroinflammation; Cytokines; Nerve growth factor (NGF); Memory; Depression; Rat.

## **1. Introduction**

Parkinson's disease (PD) is the second more common neurodegenerative disorder affecting 1-2% of individuals older than 60 years and estimated prevalence is 5 million individuals worldwide (De Lau and Breteler, 2006). PD is a debilitating disease primarily characterized by the progressive loss of neuromelanin-containing dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) with presence of eosinophilic, intracytoplasmic, proteinaceous inclusions termed as Lewy bodies and dystrophic Lewy neurites in surviving neurons (Hirsh et al., 1988). At the time of diagnosis, patients typically display an array of motor impairments including bradykinesia, resting tremor, rigidity, and postural instability. Although most of the typical motor impairments are due to the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons, PD affects multiple neuronal systems both centrally and peripherally, leading to a constellation of non-motor symptoms including olfactory deficits, affective disorders, memory impairments, as well as autonomic and digestive dysfunction (Chaudhuri et al., 2006; Chaudhuri and Odin, 2009). These non-motor features of PD do not meaningfully respond to dopaminergic medication and are a challenge to the clinical management of PD (Chaudhuri et al., 2006, Allain et al., 2008).

To date, most studies performed with animal models of PD have investigated their ability to induce nigrostriatal dopaminergic pathway damage and motor alterations associated with advanced phases of PD (Beal, 2001; Duty and Jenner, 2011). As current research continues to unmask PD as a multi-system disorder, animal models should similarly evolve to



include the non-motor features of the disease (Taylor et al., 2010). In this context, we have recently proposed a new experimental model of PD consisting of a single intranasal (i.n.) administration of the proneurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rodents (for review see Prediger et al., 2011). Our previous findings demonstrate that rats (Prediger et al., 2006, 2009; Moreira et al., 2010; Castro et al., 2012) and mice (Prediger et al., 2010; Matheus et al., 2012) infused intranasally with MPTP suffer impairments in olfactory, cognitive, emotional and motor functions conceivably analogous to those observed during different stages of PD. Such infusion causes time-dependent loss of tyrosine hydroxylase (TH) in the olfactory bulb and SNpc of rats, resulting in significant dopamine depletion in different brain areas (Prediger et al., 2006; Castro et al., 2012). Therefore, the i.n. MPTP administration seems to represent a valuable rodent model for testing novel drugs that may provide alternative or adjunctive treatment for both motor and non-motor symptoms of PD.

On the other hand, there is growing recognition that neuroinflammatory mechanisms might contribute to the cascade of events leading to neuronal degeneration in PD (for review see Hirsch and Hunot, 2009). Post-mortem studies revealed an increase in activated glial cells in the substantia nigra (McGeer et al., 1988) and in concentrations of cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6 in the striatum (Mogi et al., 1994a,b; Nagatsu et al., 2000) of patients with PD. Further studies in animal models support the idea that neuroinflammation can increase neuronal degeneration in PD. For instance, microglial activation and accumulation of inflammatory mediators in the substantia nigra, striatum and hippocampus have been described after MPTP injection in mice (Liberatore et al., 1999; Sriram et al., 2002; Selley, 2005), rats (Wang et al., 2009, 2010) and monkeys (Hurley et al., 2003; McGeer et al., 2003). Thus, therapeutic strategies aimed at downregulating these inflammatory processes might be important to slow the progression of PD.

In this context emerges statins that are competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, the key enzyme that regulates the biosynthesis of cholesterol. Despite their hypolipidemic actions, recently, statins have been found to have potent anti-inflammatory and immunomodulating effects, which led to the hypothesis that statins could be neuroprotective agents (Wood et al., 2010; Wang et al., 2011). There is increasing evidence from clinical and animal studies that statins might be beneficial as a therapy for depression (Ludka et al., 2012), dementia (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2007) and PD, even though conflicting results were observed and the exact mechanisms remain unclear. Several prospective studies have been conducted to examine the association

between statin use and PD risk and have generated mixed results (Hippisley-Cox and Coupland, 2010; Ritz et al., 2010; Gao et al., 2012). Moreover, recent experimental findings have demonstrated the protective effects of statins (mainly simvastatin) against the dopaminergic neurodegeneration induced by different PD-mimetic toxins, such as MPTP and its active metabolite 1-methyl-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) (Selley, 2005; Kreisler et al., 2007; Ghosh et al., 2009), 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Yan et al., 2011; Kumar et al., 2012) and lipopolysaccharide (LPS) (Hernández-Romero et al., 2008). Of high importance, previous studies using both MPTP- and 6-OHDA-induced animal models of PD reported that statins attenuate the production of inflammatory markers such as TNF- $\alpha$  and IL-6, nitric oxide, and superoxide in activated microglia thereby protecting dopaminergic neurons from inflammatory damage (Selley, 2005; Yan et al., 2011; Kumar et al., 2012).

In spite of the available literature indicating the neuroprotective potential of statins in PD, no consistent evidence for the effects of such agents in the non-motor symptoms of PD has to date been documented. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the potential of the treatment with atorvastatin to improve non-motor symptoms of PD, including short-term memory deficits and depressive-like behavior, induced by a single i.n. MPTP administration in rats.

## 2. Results

### 2.1. Social recognition

Fig. 1 shows a schematic illustration of the treatment schedule and the time course of behavioral and biochemical analysis performed in two independent cohorts rats. The results for the effects of i.n. administration of MPTP (1 mg/nostril) on the short-term social recognition memory of rats pretreated with saline or atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) are illustrated in Fig. 2. Two-way ANOVA revealed significant effects for the pretreatment [ $F(1,31) = 4.63$ ;  $P \leq 0.05$ ], treatment [ $F(1,31) = 3.68$ ;  $P \leq 0.05$ ] and their interaction [ $F(1,31) = 8.42$ ;  $P \leq 0.01$ ] in the ratio of investigation duration (RID). Post-hoc comparisons indicated that the i.n. MPTP (1 mg/nostril) administration promoted a significant increase in the RID when the same juvenile rat was re-exposed 30 min after the first encounter, indicating a disruption in the social recognition ability of adult rats. Remarkably, pretreatment with atorvastatin prevented the deficit in social recognition ability induced by i.n. MPTP administration, inducing a significant reduction in the RID when the same juvenile was re-exposed after 30 min.

## 2.2. Open-field

The results of locomotor activity evaluated in the open field arena (for 5 min) at 14 days after i.n. MPTP (1 mg/nostril) administration are summarized in Fig 3. Two-way ANOVA (pretreatment versus treatment) revealed no significant effects for the main factors in the total distance travelled (pretreatment: [ $F(1,31)=1.24, P=0.27$ ]; treatment: [ $F(1,31)=0.58, P=0.45$ ]) (Fig. 3A) and in the average speed (pretreatment: [ $F(1,31)=1.30, P=0.26$ ]; treatment: [ $F(1,31)=0.59, P=0.44$ ]) (Fig. 3B).

## 2.3. Forced swimming

The effects of the pretreatment with saline or atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) on the depressive-like behavior of rats evaluated in the forced swimming test at 14 days after i.n. administration of MPTP (1 mg/nostril) are summarized in Fig. 4. Two-way ANOVA revealed significant effects for the pretreatment [ $F(1,31)=17.81, P\leq 0.01$ ], treatment [ $F(1,31)=4.70, P\leq 0.05$ ] and their interaction [ $F(1,31)=22.45, P\leq 0.01$ ] in the immobility time. Subsequent post-hoc comparisons indicated that MPTP-treated rats presented higher immobility time in comparison to control group ( $P\leq 0.05$ ), suggesting a depressive-like profile. The pretreatment with atorvastatin prevented the depressive-like behavior of MPTP-treated rats as indicated by a significant reduction in the immobility time (Fig. 4A). On the other hand, two-way ANOVA revealed no significant effects for the pretreatment [ $F(1,31)=0.27, P=0.60$ ] and treatment [ $F(1,31)=0.007, P=0.93$ ] factors in climbing time (Fig. 4B), used as a parameter of motor activity scored directly in the forced swimming test (Vieira et al., 2008).

## 2.4. Sucrose consumption

During the initial training phase, in which the rats were habituated to drink from two bottles (both filled with water), no significant difference was observed in water intake between the experimental groups (Fig. 5). Moreover, two-way ANOVA revealed no significant effects for the pretreatment [ $F(1,24)=0.18, P=0.67$ ] and treatment [ $F(1,24)=0.46, P=0.50$ ] factors in the mean 48-h intake of sucrose solution at 14 days after i.n. MPTP administration. Finally, all groups consumed significantly more sucrose solution than water ( $P\leq 0.05$ , unpaired Student's *t*-test) and no difference in total water intake during this time was observed (Fig. 5).

## 2.5. Activity chamber

The effects of the pretreatment with atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) on locomotor activity of rats evaluated in the activity chamber (for 30 min) at 21 days after i.n. MPTP administration are illustrated in Fig. 6. Two-way ANOVA revealed significant effects for the pretreatment [ $F(1,31)=3.39$ ,  $P\leq 0.05$ ], treatment [ $F(1,31)=17.21$ ,  $P\leq 0.001$ ] and their interaction [ $F(1,31)=24.69$ ,  $P\leq 0.001$ ] in the number of crossings in the activity chamber. Subsequent Newman–Keuls test indicated that MPTP-treated rats displayed reduced locomotor activity in comparison to the control group. More importantly, the pretreatment with atorvastatin was able to prevent these later motor impairments, increasing significantly the number of crossings of MPTP-infused rats (Fig. 6).

## 2.6. Water maze

The data presented in Fig. 7 show that rats treated intranasally with MPTP did not differ from their controls in the escape latency for finding the platform in the training sessions when submitted to the spatial reference memory version of the water maze. The animals from all experimental groups were able to learn the task, since their mean escape latency improved throughout the training days.

## 2.7. Immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase in the substantia nigra

With the purpose of determining the relationship between the motor impairments observed in the activity chamber at later periods after i.n. MPTP administration in rats and the loss dopaminergic cells in the nigrostriatal pathway, evaluation of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons in the SNpc was performed 21 days after i.n. administration of MPTP by immunohistochemistry. Fig. 8A-H shows representative photomicrographs of TH-positive cells in the ventral mesencephalon containing SNpc of rats from the four experimental groups. Two-way ANOVA revealed no significant effect for the pretreatment factor [ $F(1,16)=0.50$ ,  $P=0.49$ ]. However, it revealed significant effects for the treatment [ $F(1,16)=15.88$ ,  $P\leq 0.01$ ] and the interaction factor between pretreatment and treatment [ $F(1,16)=6.72$ ,  $P\leq 0.05$ ]. Subsequent Newman–Keuls test indicated that the i.n. administration of MPTP induced a pronounced reduction (about 80%) of the immunolabeling of TH-positive cells in the SNpc of rats. The repeated treatment with atorvastatin (10 mg/kg/day, p.o.) was able to attenuate significantly this loss (about 50%) of TH-positive neurons in the SNpc of MPTP-treated rats (Fig. 8).

### 2.8. Measurements of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL10 and NGF- $\beta$ levels in striatum and hippocampus

One hypothesis of the cause of degeneration of the nigrostriatal dopaminergic neurons in PD is due to increased levels of cytokines and/or decreased ones of neurotrophins (Nagatsu et al., 2000). With the purpose of determining possible alterations in inflammatory markers and neurotrophins following i.n. MPTP treatment, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL10 and NGF- $\beta$  were measured in striatum and hippocampus of rats at 21 days after i.n. MPTP infusion. As illustrated in Fig. 9, two-way ANOVA revealed no significant effects for the pretreatment and treatment factors in the levels of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL10 in striatum and hippocampus. Interestingly, the pretreatment with atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) induced a long-lasting increase in NGF- $\beta$  levels in both striatum [ $F(1,20)=11.03$ ,  $P\leq 0.01$ ] and hippocampus [ $F(1,20)=18.40$ ,  $P\leq 0.01$ ] of rats (Fig. 9).

### 3. Discussion

PD is associated with a number of non-motor symptoms including hyposmia, sleep disturbances, gastrointestinal dysfunction, autonomic dysfunction, anxiety, depression, and cognitive decline, which can precede the classical motor features of PD by years and contribute substantially for the loss of quality of life in PD patients (Chaudhuri et al., 2006). Animal models are an invaluable tool for studying the pathogenesis and progression of human diseases, as well as for testing new therapeutic intervention strategies. The characteristics of PD can be induced in laboratory animals through the administration of different compounds such as reserpine, 6-OHDA, MPTP, and rotenone (Gerlach and Riederer, 1996; Beal, 2001). Although these models have undoubtedly contributed to a better understanding of many features of PD, most studies have focused on the ability of these models to induce nigrostriatal pathway damage and motor alterations associated with advanced phases of PD. However, there is no a well-accepted PD model regarding its non-motor symptoms.

As recently highlighted by Taylor et al. (2010), animal models of PD should also present non-motor behavioral features of this disease. This requires that typically behavioral test batteries (mainly based on motor tests) be expanded. In this context, some preclinical studies have begun to demonstrate that through the use of low doses and/or specific routes of administration (e.g., intranigral, intrastriatal, intranasal), some toxins widely used to induce experimental parkinsonism such as MPTP and 6-OHDA induce a moderate loss of the nigral dopamine neurons resulting in sensorial, emotional and memory deficits with no major motor impairments

(Da Cunha et al., 2002; Miyoshi et al., 2002; Ferro et al., 2005; Tadaiesky et al., 2008; Santiago et al., 2010).

In this context, recently, Prediger and collaborators have proposed a new experimental model of PD based on a single i.n. administration of MPTP in rats (Prediger et al., 2006, 2009; Moreira et al., 2010; Castro et al., 2012) and mice (Prediger et al., 2010; Matheus et al., 2012). The time-course of the olfactory, cognitive, emotional and motor impairments verified in rodents treated intranasally with MPTP, which appears to be correlated with different stages of the human PD, suggests that it may represent a valuable model for testing novel drugs that may provide alternative or adjunctive treatment for both motor and non-motor symptoms as well as the discovery of compounds to modify the course of PD (for review see Prediger et al., 2011).

The present data indicated that significant motor deficits were only observed at 21 days after i.n. MPTP administration in rats. This late decrease in locomotor activity of MPTP-treated rats was accompanied by a marked reduction (about 80%) of TH-positive neurons in the SNpc. These results corroborate our previous findings using the i.n. MPTP model where a reduction in locomotor activity of MPTP-treated rats in the open-field and activity chambers was only observed at 21 and 32 days, respectively, after i.n. MPTP infusion (Prediger et al., 2006; Moreira et al., 2010). Of high importance, the administration of atorvastatin demonstrated its neuroprotective properties as previously described in several models of neuronal damage (Piermartiri et al., 2009; 2010; Cui et al., 2010), preventing the locomotor impairments and the decrease of the TH immunoreactivity in the SNpc induced by i.n. infusion of MPTP in rats.

Over the last years, there is an increasing number of studies addressing the effects of statins in PD. Epidemiologic studies have generated mixed results regarding statin use and PD risk. Significant protective effects of statins were observed in 2 retrospective case-control studies (Huang et al., 2007; Wahner et al., 2008). However, recall and selection biases cannot be ruled out in these studies. Moreover, a significantly inverse association between use of overall or certain subclasses of statins and PD risk was observed in some (Wolozin et al., 2007; Hippisley-Cox and Coupland, 2010) but not all prospective studies (Becker et al., 2008; Ritz et al., 2010) using registry data. Recently, Gao et al. (2012) published a large prospective study including 38,192 men and 90,874 women participating in 2 ongoing US cohorts, the Health Professional Follow-up Study and the Nurses' Health Study. The authors described that regular use of statins was associated with a reduction in PD risk in participants younger than 60 years at baseline but not among those were older. Importantly, adjustment for caffeine intake, history of heart disease

and hypercholesterolemia, and other potential confounders did not change the results (Gao et al., 2012).

The observed association between regular use of statins and lower PD risk corroborates recent findings demonstrating that statins slowed down dopaminergic degeneration observed in diverse experimental models of PD (Selley, 2005; Hernández-Romero et al., 2008; Ghosh et al., 2009; Yan et al., 2011). For instance, *in vivo* and *in vitro* studies suggest that statins could reduce  $\alpha$ -synuclein accumulation and oxidative stress, suppress cyclooxygenase 2 expression, reduce the release of TNF- $\alpha$  and nuclear factor  $\kappa$ B activation, activate peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , and upregulate dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the brain (Becker and Meier, 2009; Wood et al., 2010; Wang et al., 2011). Taken together, these results suggest that statins may represent potential disease-modifying agents for PD.

Since the i.n. administration of MPTP does not cause, at least at initial periods, gross motor alterations that would preclude assessment of cognitive and emotional functions, we also investigated whether such behaviors are affected in these animals. Previous studies from our group have demonstrated that rats treated intranasally with MPTP performed normally in the long-term retention session (24 h after training) of the inhibitory avoidance task (Castro et al., 2012) and in the spatial reference memory version of the water maze (Prediger et al., 2006). In contrast, MPTP-infused rats displayed a poor performance in the short-term retention session (1.5 h after training) of the inhibitory avoidance task (Castro et al., 2012), in the working memory version of the water maze (Prediger et al., 2006) and in the social recognition task (Moreira et al., 2010; Castro et al., 2012). These findings are consistent with the view of human studies suggesting that PD patients present deficits in working memory and short-term memory tasks mainly dependent of the frontostriatal circuitry (for review see Zgaljardic et al., 2003; Owen, 2004) with long-term spatial (declarative) memories mostly spared (Dubois and Pillon, 1997; Bosboom et al., 2004).

In the present study we investigated the impact of i.n. MPTP administration on social recognition memory of adult rats. The social recognition memory is a particular model of olfactory memory mediated by olfactory cues (Sawyer et al., 1984) and may involve a non-procedural form of a short-term working memory based upon the olfactory discriminative ability of rats. The persistence with which an adult rat investigates a juvenile can be enhanced or decreased in a predictive manner by using inhibition and facilitation procedures (Dantzer et al., 1987). It is important to emphasize that dopamine seems to be necessary for social recognition memory in rodents, since treatments with dopamine receptors antagonists

(Prediger et al., 2004, 2005) or drugs that reduce dopaminergic neurotransmission such as reserpine (Prediger et al., 2004, 2005) or MPTP (Moreira et al., 2010; Monaghan et al., 2010; Castro et al., 2012) inhibit short-term olfactory memory.

Corroborating these previous findings, we observed in the present study that rats infused intranasally with MPTP (1 mg/nostril) spent significantly more time investigating the juvenile rat during the second presentation than they did in the first encounter, suggesting an impaired ability to recognize the juvenile rat after a short time. Of high importance, the present findings demonstrate that the treatment with atorvastatin (10 mg/kg) by oral route during seven consecutive days was able to prevent the short-term social recognition memory impairments in MPTP-treated rats. Interestingly, Wolozin et al. (2007) analyzed data from the decision support system of the US Veterans Affairs database, which contains diagnostic, medication and demographic information on approximately 4.5 million subjects, to evaluate whether the use of statins is associated with a reduced incidence of dementia and PD. The authors described that simvastatin is associated with a strong reduction in the incidence of dementia and PD, whereas atorvastatin is associated with a modest reduction in incident dementia and PD. Therefore, from these limited results it appears that statins might be particularly useful to improve impaired memory processes in PD.

Beyond the cognitive symptoms, depressive disorders commonly occur in PD (Cummings and Masterman, 1999), affecting approximately 40% of the patients during the early stages of the disease (Tolosa et al., 2007). Recent preclinical studies have provided strongly evidence that classical neurotoxin models of PD (such as 6-OHDA and MPTP) are able to induce depressive-like behaviors in rodents with no major motor impairments (Tadaiesky et al., 2008; Moreira et al., 2010; Santiago et al., 2010). In accordance with previous findings described by Moreira et al. (2010), in the present study we demonstrated that the i.n. infusion of MPTP (1 mg/nostril) caused a depressive-like behavior in rats, reflected by an increased immobility time in the forced swimming test. This depressive-like behavior might be correlated with dopamine changes at striatal level (Tadaiesky et al., 2008; Castro et al., 2012). In addition, anhedonia is a classical feature of depression and involves decreased libido and a lack of desire for other pleasurable experiences. Sucrose consumption is frequently used as a measure of anhedonia in rodents, and Tadaiesky et al. (2008) have described that intrastriatal administration of 6-OHDA promoted an early decrease in sucrose consumption measured 1 week after 6-OHDA treatment. However, in the current study we failed to observe similar anhedonic behavior in rats infused intranasally with MPTP. Therefore, the



toxin, the low dose of MPTP and/or the route of administration utilized in the current study may explain, in part, the discrepancy with this previous report by Tadaiesky et al. (2008).

Indeed, although no significant differences in the serotonin levels were observed in any of the brain structures investigated after i.n. administration of MPTP in mice (Prediger et al. 2010), it must be conceded that, at this moment, we cannot rule out the serotonergic participation in the emotional alterations found in the MPTP-treated rats. In fact, there is pathophysiological evidence of serotonin alterations in patients with PD-associated depression (Schrag, 2004), and a “serotonin hypothesis” has even been proposed for depression in PD (Mayeux, 1990). Of high interest, the treatment with atorvastatin significantly prevented the behavioral despair induced by i.n. MPTP, inferred from the fact that fraction-treated animals showed a similar level of immobility time as the control group. Interestingly, clinical data indicates that statins therapy is linked to a reduction in the incidence of depression and anxiety (Young-Xu et al., 2003), although the mechanisms of action are not established. Moreover, we recently demonstrated that atorvastatin treatment may display antidepressant-like effects in mice (Ludka et al., 2012). However, further research is needed to clarify the exact molecular mechanisms involved in the antidepressive-like effect induced by atorvastatin in MPTP-treated rats.

There is increasing evidence that inflammation plays a key role in the pathophysiology of PD (for review see Hirsch and Hunot, 2009). Despite their hypolipidemic actions, previous studies using both MPTP- and 6-OHDA-induced animal models of PD reported that statins attenuate the production of inflammatory markers such as TNF- $\alpha$  and IL-6, nitric oxide, and superoxide in activated microglia thereby protecting dopaminergic neurons from inflammatory damage (Selley, 2005; Yan et al., 2011; Kumar et al., 2012). However, contrasting with previous findings showing microglial activation and accumulation of inflammatory mediators in the substantia nigra, striatum and hippocampus of rodents after MPTP injection (Liberatore et al., 1999; Sriram et al., 2002; Selley, 2005; Wang et al., 2009, 2010), the current i.n. MPTP model did not induce long-lasting alterations in concentrations of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 in striatum and hippocampus of rats. In this regard, it is important to emphasize that the neurotoxicity induced by MPTP in laboratory animals seems to be dependent of many variables, such as species, strain, gender, age and/or the schedule of treatment utilized (Sedelis et al., 2000, 2001; Przedborski et al., 2001; Schmidt and Ferger, 2001). Bezard et al. (1997a,b) proposed that different schedules (e.g., dose, duration and route of administration) of MPTP might induce different mechanisms of neuronal death.

Interestingly, we observed that the current treatment with atorvastatin (10 mg/kg/day, p.o.) during 7 consecutive days increase significantly the levels of NGF striatum and hippocampus of rats. NGF is a neurotrophic factor and its antioxidant (Salinas et al., 2003), antiapoptotic (Shimoke et al., 2001) and neurorescue properties (Stromberg et al., 1990) can be exploited for increasing the graft survival in neural transplantation studies. Exogenous application of NGF has been shown to increase the level of antioxidant enzymes, heme oxygenase-1 and prevent apoptosis by inducing antiapoptotic gene signaling pathways following exposure to 6-OHDA and MPTP (Shimoke et al., 2001; Salinas et al., 2003). It has also been shown that NGF level is decreased in PD patients and experimental parkinsonian rats (Lorigados Pedre et al., 2002). Taking together the above reports, we can speculate that the neuroprotective effects of atorvastatin against the behavioral and neurochemical alterations induced by i.n. MPTP administration may result from the increase in NGF levels. However, the sequence of events leading to the protective effects of atorvastatin against cell damage remains to be elucidated.

In conclusion, the present study provides the first preclinical data indicating that repeated systemic treatment with atorvastatin prevents short-term memory, depressive-like behavior and motor impairments as well as dopaminergic cell loss in the SNpc of rats submitted to an experimental model of PD. These results provide new insights in experimental models of PD, indicating that atorvastatin may represent a new therapeutic tool for the management of motor and non-motor symptoms of PD, together with its neuroprotective potential.

## **4. Experimental procedure**

### *4.1. Animals*

The subjects were adult male Wistar rats (4 months old, 300–350 g) and juvenile male Wistar rats (25–30 days old) provided by the animal facility of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brazil). Juvenile rats were kept in groups of ten per cage and served as social stimuli for the adult rats in the social recognition task. Animals were maintained in a 12-h light–dark cycle (lights on at 6:00 a.m.) at constant room temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humidity between 50 and 70% and were housed in groups of five animals per cage with free access to food and water. The animals were allowed to adapt to the laboratory conditions for at least 1 week before the behavioral assessment and all tests were carried out between 9:00 and 14:00 h. All procedures used in the present study complied with the guidelines on animal care of the UFSC Ethics Committee

on the Use of Animals which follows the “Principles of laboratory animal care”. All experimental protocols were designed with the goal of keeping the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These protocols were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Santa Catarina (Process 23080.037860/2010-31).

#### *4.2. Drugs and treatment*

The animals were allocated to the following groups: (i) control + control ( $n = 15$ ), (ii) control + MPTP ( $n = 18$ ), (iii) atorvastatin + control ( $n = 14$ ) or (iv) atorvastatin + MPTP ( $n = 16$ ). Atorvastatin for animal treatment was extracted from commercially available capsules (Lipitor<sup>®</sup>, Pfizer, São Paulo, Brazil). The effect of the repeated systemic administration of atorvastatin on MPTP-induced behavioral deficits and dopaminergic cell death was investigated by administering atorvastatin (10 mg/kg/day) or its vehicle (sterile saline solution – 0.9% NaCl) during 7 consecutive days by oral route (p.o.). The current atorvastatin dose and schedule for administration were chosen based on previous studies (Piermartiri et al., 2009,2010; Funck et al., 2011) and in pilot experiments (data not shown). Six hours before the 4<sup>th</sup> administration of atorvastatin, the animals were infused intranasally with a single bilateral dose of MPTP (1 mg/nostril) or saline (control).

MPTP HCl (Sigma Chemical Co., USA) was administered by i.n. route according to the procedure described by Prediger et al. (2006). Briefly, rats were lightly anaesthetized with isoflurane 0.96% (0.75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brazil) using a vaporizer system (SurgiVet Inc., WI, USA) and a 10-mm piece of PE-50 tubing was inserted through the nostrils. The tubing was connected to a peristaltic pump set at a flow rate of 12.5  $\mu$ l/min. The MPTP HCl was dissolved in 0.9% NaCl (saline) at a concentration of 20 mg/ml, after which it was infused for 4 min (1 mg/nostril). The control solution consisted of saline. Animals were given a 1-min interval to regain normal respiratory function and then this procedure was repeated with infusions administered through the contralateral nostrils.

#### *4.3. Behavioral and biochemical analysis*

During a period of 7, 14 and 21 days after the i.n. administration of MPTP, the animals were submitted to a battery of behavioral and biochemistry analysis (Fig. 1) that included the social recognition, open-field, forced swimming, sucrose consumption, activity chamber and water maze tasks, and the quantification of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NGF- $\beta$  and IL10 levels in striatum and hippocampus and immunohistochemistry for TH in the SNpc. The tests were conducted in two independent cohorts rats. One group was tested in the social recognition, open field, forced swimming and activity chamber and the animals were killed 21 days after i.n. infusion of MPTP or vehicle for the measurement of TH immunohistochemistry in the SNpc. The second group was tested in the sucrose consumption and water maze and the animals were killed 21 days after i.n. infusion of MPTP or vehicle for quantification of cytokines and NGF- $\beta$  using specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The time point for the performance of each behavioral task was chosen based on previous studies using the i.n. MPTP model (Prediger et al., 2006, 2011; Moreira et al., 2010; Castro et al., 2012). All tests were scored by the same rater in an observation room where the rats had been habituated for at least 1 h before the beginning of the tests. Behavior was monitored through a video camera positioned above the apparatuses and the images were later analyzed with the ANY Maze video tracking (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) by an experienced experimenter who was unaware of the experimental group of the animals tested.

#### *4.3.1. Social recognition*

Short-term social memory was assessed 7 days after i.n. MPTP administration with the social recognition task described by Dantzer et al. (1987) and previously evaluated in our laboratory (Prediger et al., 2004; Castro et al., 2012). All juveniles were isolated in individual cages for 20 min prior to the beginning of the experiment. The social recognition task consisted of two successive presentations (5 min each), separated by a short period of time, where the juvenile rat was placed in the home cage of the adult rat and the time spent by the adult in investigating the juvenile (nosing, sniffing, grooming, or pawing) was recorded. At the end of the first presentation, the juvenile was removed and kept in an individual cage during the delay period and re-exposed to the same adult rat after 30 min. In this paradigm, if the delay period is less than 40 min, the adult rodents display recognition of this juvenile, as indicated by a significant reduction in the social investigation time during the second presentation (Dantzer et al., 1987; Prediger et al., 2004).

Time spent in social investigation by the adult rat was measured and then expressed for each animal as the ratio of the second exposure to the first exposure (Ratio of Investigation Duration (RID)). A reduction in RID reflects a decrease in investigation behavior during the second encounter, demonstrating the recognition ability of the adult rat. This transformation was chosen in order to minimize day-to-day variations on the baseline of performance and to equalize variances among different groups (Dantzer et al., 1987; Prediger et al., 2004).

#### *4.3.2. Open-field*

To rule out early effects of tested drugs on locomotor activity, the animals were placed for 5 min in an open-field arena at 14 days after i.n. MPTP administration. The apparatus, made of wood covered with impermeable Formica, had a grey floor of 50 × 50 cm and transparent walls, 50 cm high. Each rat was placed in the center of the apparatus and the total distance traveled (m) and the average speed (m/s) were registered for 5 min using the ANY-maze® video tracking system (Stoelting Co., Wood Dale IL, USA) (Castro et al., 2012). The apparatus was cleaned with 10% ethanol between animals.

#### *4.3.3. Forced swimming*

The depressive-like effect was assessed 14 days after i.n. MPTP administration with the forced-swimming test previously described by Porsolt et al. (1977). Rats were placed in individual glass cylinders (40 cm in height and 17 cm in diameter) containing water (water depth was 30 cm; 25±1 °C). Two swimming sessions were conducted (an initial 15-min training followed 24 h later by a 5-min test). The water was changed and the cylinder rinsed with clean water after each rat. Following the training and the test sessions, the animals were dried in a heated enclosure. During the 5 min swimming test session, the following behavioral responses were recorded by a trained observer: the immobility time (i.e. the time spent floating in the water without struggling, making only those movements necessary to keep the head above the water) and climbing behavior (or trashing), which is defined as upward directed movements of the forepaw along the cylinder walls. Decrease in immobility time is indicative of a reduction in depression-related behaviors (Cryan et al., 2002), while time of climbing was used as a predictor of altered motor activity scored directly in the forced swimming test (Vieira et al., 2008).

#### 4.3.4. Sucrose consumption

Anhedonia is a classical feature of depression and involves decreased libido and a lack of desire for other pleasurable experiences. Sucrose consumption is frequently used as a measure of anhedonia in rodents, including in experimental models of PD (Tadaiesky et al., 2008). At 14 days after i.n. MPTP administration, animals were transferred into single housing cages with free access to food. Each rat was provided with two water bottles on the extreme sides of the cage during the 24-h training phase to adapt the rats to drinking from two bottles. After training, one bottle was randomly switched to contain 0.8% sucrose solution, as described previously (Slattery et al., 2007), and 24 h later, the bottles were reversed to avoid perseveration effects. The use of a 48-h testing period allowed us to preclude any effects of neophobia, artifactual bias toward any particular side and perseveration effects. The consumption of water and sucrose solution was estimated simultaneously in groups by weighing the bottles.

#### 4.3.5. Activity chamber

In order to assess possible long-lasting effects of MPTP on locomotor activity, the animals were tested 21 days after i.n. MPTP administration in activity chambers during a period of 30 min (Moreira et al., 2010). The activity chamber consists of a wooden cage (40 cm x 12 cm x 20 cm) with steel grid floor and equipped with automatic movement detection using three pairs of infrared beams positioned 2 cm above the floor and evenly placed in the apparatus. The locomotion was automatically measured by a digital counter that recorded photocell beam interruptions.

#### 4.3.6. Water maze

To evaluate the existence of long-lasting spatial memory deficits after the i.n. administration of MPTP in rats, the animals were submitted from 18 to 21 days after MPTP treatment to a spatial reference memory version of the water maze using a protocol described previously (Morris et al., 1982). Tests were performed in a circular swimming pool made of black painted fibreglass, 1.7 m inside diameter, 0.8 m high, and was filled to a depth of 0.6 m with water maintained at 25°C. The target platform (10×10 cm) was made of transparent Plexiglas and was submerged 1–1.5 cm beneath the surface of the water. Starting points for the animals were marked on the outside of the pool as north (N), south (S), east (E) and west (W). Four distant visual cues (55×55 cm) were placed on the walls of the

water maze room. They were all positioned with the lower edge 30 cm above the upper edge of the water tank, and in the standard setting the position of each symbol marked the midpoint of the perimeter of a quadrant (circle = NE quadrant, square = SE quadrant, cross = SW quadrant, and diamond = NW quadrant). The protocol consisted of 4 training days, four consecutive trials per day, during which the animals were left in the tank facing the wall, then being allowed to swim freely to the submerged platform placed in the centre of southwest quadrant of the tank. If the animal did not find the platform during a period of 60 s, it was gently guided to it. The animal was allowed to remain on the platform for 10 s after escaping to it and was then removed from the tank for 20 s before being placed at the next starting point in the tank. The apparatus was located in a room with indirect incandescent illumination. A monitor and a video-recording system were installed in an adjacent room. The experiments were video-taped and the scores for latency of escape from the starting point to the platform and swimming speed were later measured using the ANY-maze® video tracking system (Stoelting Co., Wood Dale IL, USA).

#### *4.3.7 Immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase (TH)*

For the investigation of possible neuroprotective effects of atorvastatin against the loss of dopaminergic neurons induced by i.n. MPTP administration, five animals of each group were intracardiacally perfused with physiological saline (NaCl 0.9%) followed by a solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 21 days after MPTP treatment. Brains were removed and post-fixed for 4 h in the same solution and cryoprotected by immersion in 30% sucrose in 0.1M PBS for 48 h. For each brain, serial coronal sections (50  $\mu$ m) were obtained using a cryostat (Leica, CM 1850 UV) at -20 °C and collected in PBS. For immunohistochemistry, the free-floating sections were pretreated with 10% methanol diluted in 3% hydrogen peroxidase for 30 min, carefully washed and blocked with 2% albumin in 0.1 M phosphate saline buffer pH 7.4, containing 0.3% Triton X-100 (PBS-Tx, Sigma) for 30 min and incubated with anti-TH monoclonal antibody (1:1000, MAB318, Millipore/Chemicon International Technology, USA) for 48 h at 4 °C as described previously (Ferraz et al., 2003). After washing several times with PBS-Tx, tissue sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (Dako, Carpinteria, CA) diluted 1:200 in PBS-Tx at room temperature for 2 h. The immunohistochemical reaction was developed by incubating the sections in a medium containing 0.06% 3,3-diaminobenzidine (DAB, Sigma) dissolved in PBS for 10 min, and then in the same solution containing 1  $\mu$ M of 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per ml of DAB medium for 10 min. The sections were rinsed with

PBS, dehydrated with ethanol, cleared with xylene, and covered with Permount and coverslips. Control sections were prepared by omitting the primary antibody and replacing it with PBS. All brains were fixed and postfixed for the same time in identical solutions and rigorously processed at the same time, and sections were incubated in an identical medium for the same period of time. This precaution was taken to avoid over reaction, differences in chromogen reaction, saturation of optical density, and changes in background levels (Ferraz et al., 2003). Coronal sections of the SNpc were selected for this immunohistochemical study. These areas were identified according to the atlas of Paxinos and Watson (2005) and the readings were made between the coordinates interaural 4.2 mm, bregma -4.8 mm and interaural -2.7 mm, bregma -6.3 mm. TH-positive neurons in SNpc were determined on visual inspection with Sight DS-5M-L1 digital camera (Nikon, Melville, NY, USA) connected to an Eclipse 50i light microscope (Nikon) using a counting grid at a 5x and 40x magnification.

#### *4.3.8 Determination of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NGF- $\beta$ and IL10 levels in rat striatum and hippocampus*

Six rats of each group were killed by decapitation 21 days after i.n. administration of MPTP or vehicle. Brains were removed immediately and the structures striatum and hippocampus were dissected and homogenized with PBS buffer containing 0.05% Tween 20, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 IU aprotinin A. The homogenates were centrifuged at 3,000 $\times$ g for 10 min and the supernatants stored at -80°C until assays for the determination of levels of the cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and NGF- $\beta$  were carried out. The amount of protein in each sample was measured using the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard. The levels of each cytokine and NGF- $\beta$  were evaluated using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's recommendations (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) and the results are expressed in pg/mg of protein in each sample.

#### *4.4. Statistical analysis*

All values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. ( $n$  equals the number of rats included in each analysis). The statistical analysis was carried out using two-way analysis of variance (ANOVA) with pretreatment (control vs. atorvastatin) and treatment (control vs. MPTP) as independent variables. Data from the water maze task were analyzed using two-way ANOVA with repeated measure (number of training days). Following significant



ANOVAs, multiple post-hoc comparisons were performed using the Newman–Keuls test. The comparisons of water and sucrose intake in each group were performed using unpaired Student's *t*-test. The accepted level of significance for the tests was  $P \leq 0.05$ . All tests were performed using the Statistica® software package (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

### **Acknowledgments**

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Projects: IBN-Net #01.06.0842-00; INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX - Project NENASC), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC). A.A.C., F.C.M., F.R.L., G.G.V., and B.P.W. received scholarships from CAPES, CNPq or FAPESC; A.R.S., C.I.T. and R.D.S.P. are supported by research fellowships from CNPq-Brazil. The authors have no financial or personal conflicts of interest related to this study.

## Figures and legends

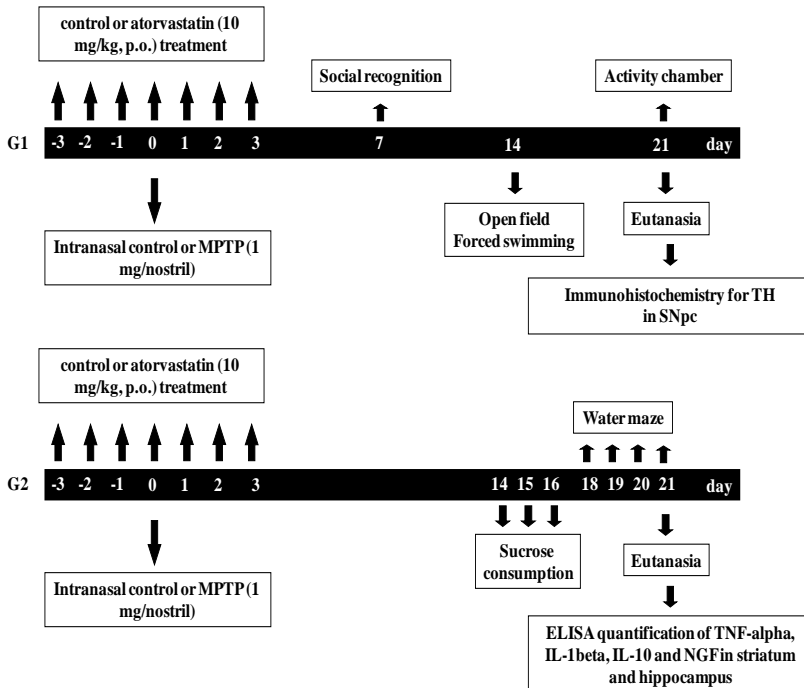


Fig. 1. Schematic illustration of the time course of behavioral and neurochemical tests following the pretreatment (during 7 consecutive days) with control (saline) or atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) and a single intranasal (i.n.) administration of control (saline) or MPTP (1 mg/nosril) in adult male Wistar rats.

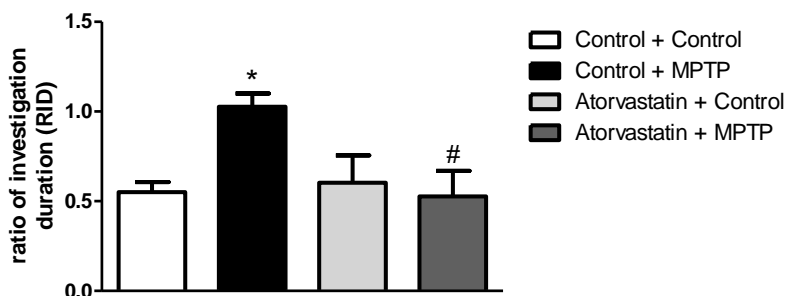


Fig. 2. Effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline or atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) on the social recognition memory of rats evaluated 7 days after i.n. infusion of MPTP (1 mg/nostril). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of RIDs (i.e. the ratio of the second exposure to the first exposure) when the same juvenile was exposed for 5 min with an interval of 30 min [control/control (n = 9); control/MPTP (n = 11); atorvastatin/control (n = 7); and atorvastatin/MPTP (n = 8)]. \* $P \leq 0.05$  compared to the control/control group. # $P \leq 0.05$  compared to the control/MPTP group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

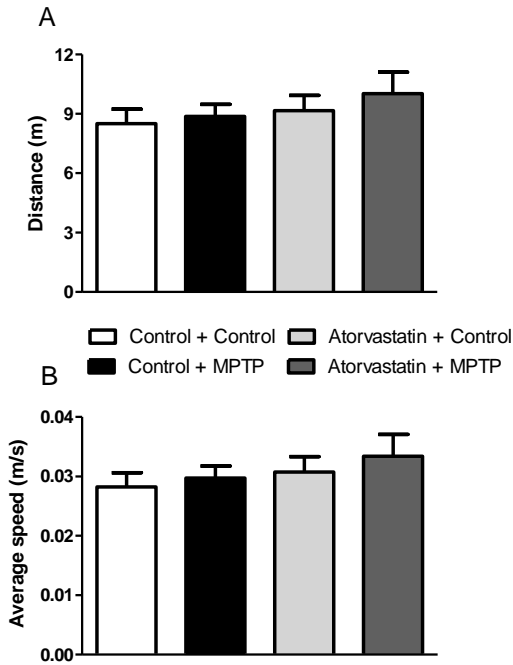


Fig. 3. Effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline or atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) on the locomotor activity of rats evaluated in the open field 14 days after i.n. infusion of MPTP (1 mg/nostril). Data of are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of the distance travelled (A) and average speed (B) during 30 min [control/control (n = 9); control/MPTP (n = 11); atorvastatin/control (n = 7); and atorvastatin/MPTP (n = 8)].

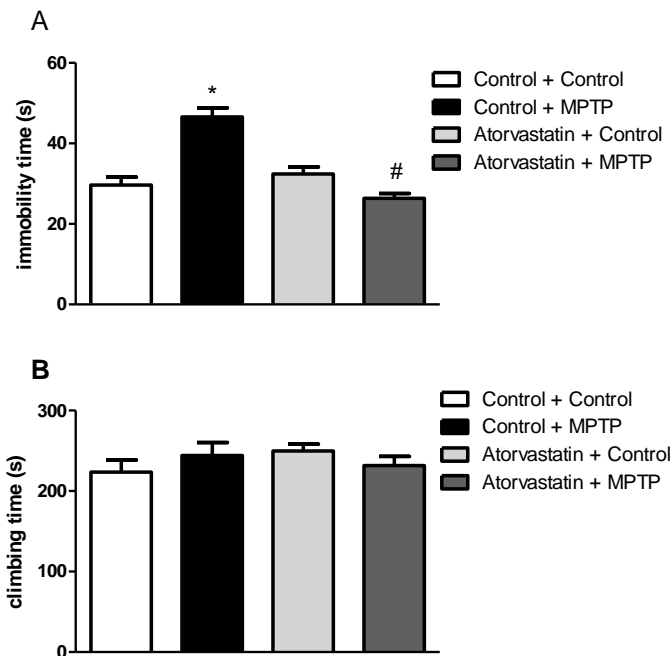


Fig. 4. Effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline or atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) on depressive-like behavior of rats evaluated 14 days after i.n. infusion of MPTP (1 mg/nostri). Data of are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of the immobility time (A) and climbing time (B) in the forced-swimming test [control/control (n = 9); control/MPTP (n = 11); atorvastatin/control (n = 7); and atorvastatin/MPTP (n = 8)]. \* $P \leq 0.05$  compared to the control/control group. # $P \leq 0.05$  compared to the control/MPTP group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

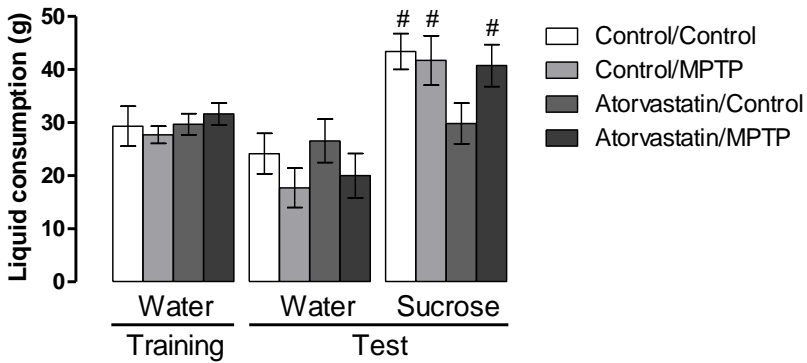


Fig. 5. Effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline or atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) on anhedonic behavior of rats evaluated in the sucrose consumption test 14 days after i.n. infusion of MPTP (1 mg/nostril). Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of liquid consumption (g) during the 48-h sucrose and water intake and during the 24-h training phase [control/control (n = 6); control/MPTP (n = 7); atorvastatin/control (n = 7); and atorvastatin/MPTP (n = 8)]. # $P \leq 0.05$  compared to the water intake of the respective group (Student's t-test).

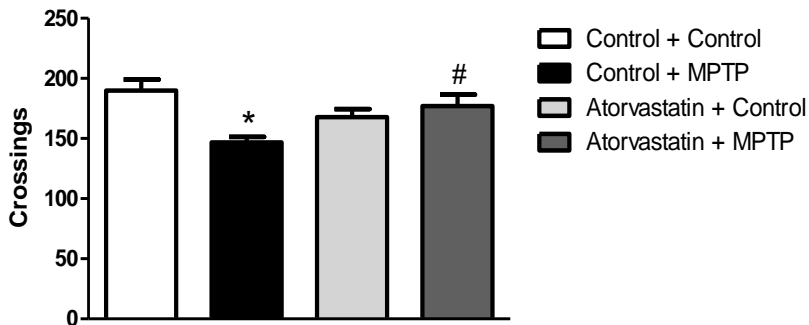


Fig. 6. Effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline or atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) on locomotor activity of rats evaluated in the activity chamber 21 days after i.n. infusion of MPTP (1 mg/nostril). Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of crossings during 30 min [control/control (n = 9); control/MPTP (n = 11); atorvastatin/control (n = 7); and atorvastatin/MPTP (n = 8)]. \* $P \leq 0.05$  compared to the control/control group. # $P \leq 0.05$  compared to the control/MPTP group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

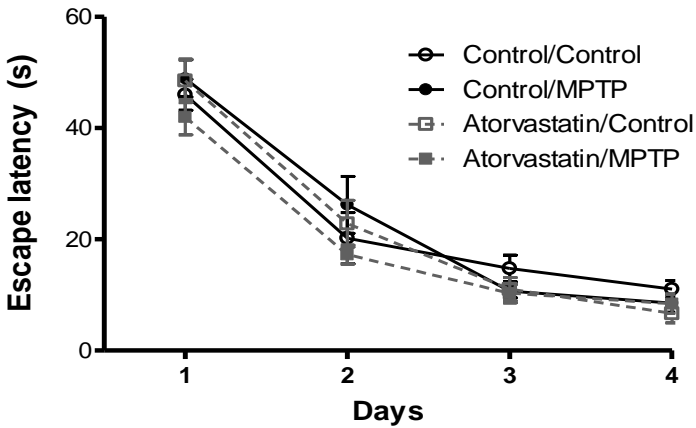


Fig. 7. Effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with saline or atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) on cognitive performance of rats evaluated in the spatial reference memory version of the water maze 21 days after i.n. infusion of MPTP (1 mg/nostiril). Values are shown as mean  $\pm$  S.E.M. latency to escape to a submersed platform during four training days, with four consecutive trials per day [control/control (n = 6); control/MPTP (n = 7); atorvastatin/control (n = 7); and atorvastatin/MPTP (n = 8)].



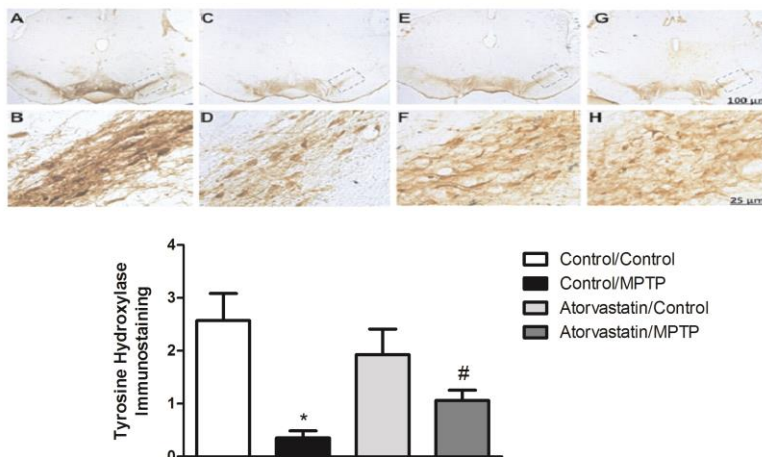


Fig. 8. Effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) on tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of rats evaluated through immunohistochemistry at 21 days after i.n. infusion of MPTP (1 mg/nostiril). Representative images of TH immunostaining in the ventral mesencephalon containing SNpc of rats treated with saline + saline (A,B), saline + MPTP (C,D), atorvastatin + saline (E,F) or atorvastatin + MPTP (G,H). Scale bar (A,C,E,G = 100  $\mu$ m and B,D,F,H = 25 $\mu$ m). Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 animals in each group. \* $P \leq 0.05$  compared to the control/control group; # $P \leq 0.05$  compared to the control/MPTP group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

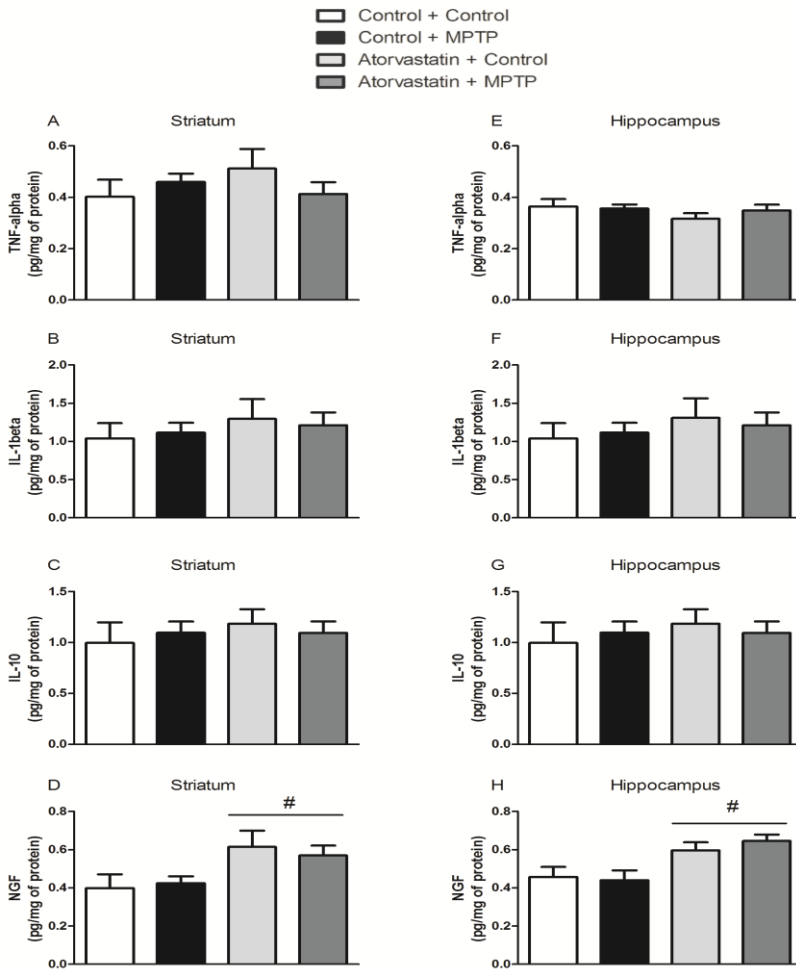


Fig. 9. Effects of the pretreatment (during 7 consecutive days) with atorvastatin (10 mg/kg, p.o.) on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL10 and NGF- $\beta$  levels in the striatum (A, B, C, D) and hippocampus (E, F, G, H) 21 days after i.n. infusion of MPTP (1 mg/nostril). Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. of pmol/mg protein of 6 animals in each group. # $P \leq 0.05$  compared to the pretreatment with control (two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

## References

- Allain, H., Bentue-Ferrer, D., Akwa, Y., 2008. Disease-modifying drugs and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 84, 25-39.
- Beal, M.F., 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 325-334.
- Becker, C., Meier, C.R., 2009. Statins and the risk of Parkinson disease: an update on the controversy. *Expert Opin Drug Saf.* May;8(3):261-71.
- Becker, C., Jick, S.S., Meier, C.R., 2008. Use of statins and the risk of Parkinson's disease: a retrospective case-control study in the UK. *Drug Saf.* 31, 399-407.
- Bekris, L. M.; Mata, I. F.; Zabetian, C. P. The genetics of Parkinson disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23:228–242; 2010.
- Bezard, E., Dovero, S., Bioulac, B., Gross, C., 1997a. Effects of different schedules of MPTP administration on dopaminergic neurodegeneration in mice. *Exp Neurol.* Nov;148(1):288-92.
- Bezard, E., Dovero, S., Bioulac, B., Gross, C.E., 1997b. Kinetics of nigral degeneration in a chronic model of MPTP-treated mice. *Neurosci Lett.* Sep 26;234(1):47-50.
- Bosboom, J.L., Stoffers, D., Wolters, E.C., 2004. Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 111, 1303-1315.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 7;72:248-54.
- Castro, A.A., Ghisoni, K., Latini, A., Quevedo, J., Tasca, C.I., Prediger, R.D., 2012. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 229, 208-215.
- Chaudhuri, K.R., Healy, D.G., Schapira, A.H., 2006. National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5, 235-245.
- Cryan, J.F., Page, M.E., Lucki, I., 2002. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur J Pharmacol.* Feb 2;436(3):197-205.
- Cui, L., Zhang, X., Yang, R., Wang, L., Liu, L., Li, M., Du, W., 2010. Neuroprotection of early and short-time applying atorvastatin in the acute phase of cerebral ischemia: down-regulated 12/15-LOX, p38MAPK and cPLA2 expression, ameliorated BBB permeability. *Brain Res* 1325, 164-173.
- Cummings, J.L., Masterman, D.L., 1999. Depression in patients with Parkinson's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* Sep;14(9):711-8.

- Dantzer, R., Bluthé, R.M., Koob, G.F., Le Moal, M., 1987. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology* 91, 363-368.
- Dubois B., Pillon B., 1997. Cognitive deficits in Parkinson's disease. *J. Neurol*; 244, 2-8.
- Da Cunha, C., Angelucci, M.E., Canteras, N.S., Wonnacott, S., Takahashi R.N., 2002. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell Mol Neurobiol. Jun*;22(3):227-37.
- De Lau LM, Breteler MM., 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol. Jun*;5(6):525-35.
- Duty S, Jenner P., 2011. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol. 2011 Oct*;164 (4):1357-91.
- Ferraz, A.C., Xavier, L.L., Hernandez, S., Sulzbach, M., Viola, G.G., Anselmo-Franci, J.A., Achaval, M., Da Cunha, C., 2003. Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6-hydroxydopamine. *Brain Res.* 986, 200-205.
- Ferro, M.M., Bellissimo, M.I., Anselmo-Franci, J.A., Angellucci, M.E., Canteras, N.S., Da Cunha, C., 2005. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J. Neurosci. Methods* 148, 78-87.
- Funck, V.R., de Oliveira, C.V., Pereira, L.M., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Royes, L.F., Ferreira, J., Guerra, G.P., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Mallmann, C.A., de Mello, C.F., Oliveira, M.S., 2011. Differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia* 52, 2094-2104.
- Gao, X., Simon, K.C., Schwarzschild, M.A., Ascherio, A., 2012. Prospective study of statin use and risk of Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 69, 380-384.
- Gerlach, M., Riederer, P., 1996. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural Transm.* 103, 987-1041.
- Ghosh, A., Roy, A., Matras, J., Brahmachari, S., Gendelman, H.E., Pahan, K., 2009. Simvastatin inhibits the activation of p21ras and prevents the loss of dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 29, 13543-13556.
- Hernández-Romero, M.C., Argüelles, S., Villarán, R.F., de Pablos, R.M., Delgado-Cortés, M.J., Santiago, M., Herrera, A.J., Cano, J., Machado, A., 2008. Simvastatin prevents the inflammatory process and the dopaminergic

- degeneration induced by the intranigral injection of lipopolysaccharide. *J. Neurochem.* 105, 445-459.
- Hirsch, E.C., Hunot, S., 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* Apr;8(4): 382-97.
- Hippisley-Cox, J., Coupland, C., 2010. Unintended effects of statins in men and women in England and Wales: population based cohort study using the Qresearch database. *B.M.J.* 340, c2197.
- Huang, X., Chen, H., Miller, W.C., Mailman, R.B., Woodard, J.L., Chen, P.C., Xiang, D., Murrow, R.W., Wang, Y.Z., Poole, C., 2007. Lower low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 22, 377-381.
- Hurley, S.D., O'Banion, M.K., Song, D.D., Arana, F.S., Olschowka, J.A., Haber, S.N., 2003. Microglial response is poorly correlated with neurodegeneration following chronic, low-dose MPTP administration in monkeys. *Exp Neurol.* Dec;184(2):659-68.
- Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., Drachman, D.A., 2000. Statins and the risk of dementia. *Lancet*; 356:1627-31.
- Kumar, A., Sharma, N., Gupta, A., Kalonia, H., Mishra, J., 2012. Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. *Brain Research.*
- Kreisler, A., Gelé, P., Wiart, J.F., Lhermitte, M., Destée, A., Bordet, R., 2007. Lipid-lowering drugs in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: fenofibrate has a neuroprotective effect, whereas bezafibrate and HMG-CoA reductase inhibitors do not. *Brain Res.* Mar 2;1135(1):77-84.
- Liberatore, G.T., Finkelstein, D.I., Wong, J.Y., Horne, M.K., Porritt, M.J., Donnan, G.A., Howells, D.W., 1999. Sprouting of dopaminergic axons after striatal injury: confirmation by markers not dependent on dopamine metabolism. *Exp Neurol.* Oct;159(2):565-73
- Lorigados Pedre, L., Pavón Fuentes, N., Alvarez González, L., McRae, A., Serrano Sánchez, T., Blanco, Lescano, L., Macías González, R., 2002. Nerve growth factor levels in Parkinson disease and experimental parkinsonian rats. *Brain Res.* Oct 11;952(1):122-7.
- Ludka, F.K., Zomkowski, A.D., Cunha, M.P., Dal-Cim, T., Zeni, A.L., Rodrigues, A.L., Tasca, C.I., 2012. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. *Eur. Neuropsychopharmacol.*  
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.05.005>)
- McGeer, P.L., Schwab, C., Parent, A., Doudet, D., 2003. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-

- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol.* Nov;54(5):599-604.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L., 1988. The dystonias. *Can J Neurol Sci.* Nov;15(4):447-83.
- Matheus, F.C., Aguiar, As. Jr., Castro, A.A., Villarinho, J.G., Ferreira, J., Figueiredo, C.P., Walz, R., Santos, A.R., Tasca, C.I., Prediger, R.D., 2012. 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.* Dec 1;235(2):263-72.
- Mayeux, R., 1990. The "serotonin hypothesis" for depression in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 53, 163–166.
- Miyoshi E, Wietzikoski S, Camplessei M, Silveira R, Takahashi RN, Da Cunha C (2002) Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. *Brain Res Bull* 58:41–47.
- Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T (1994) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 165:208–210.
- Monaghan, M.M., Leddy, L., Sung, M.L., Albinson, K., Kubek, K., Pangalos, M.N., Reinhart, P.H., Zaleska, M.M., Comery, T.A., 2010. Social odor recognition: a novel behavioral model for cognitive dysfunction in Parkinson's disease. *Neurodegener. Dis.* 7, 153-159.
- Moreira, E.L., Rial, D., Aguiar, A.S. Jr, Figueiredo, C.P., Siqueira, J.M., DalBó, S., Horst, H., de Oliveira, J., Mancini, G., dos Santos, T.S., Villarinho, J.G., Pinheiro, F.V., Marino-Neto, J., Ferreira, J., De Bem, A.F., Latini, A., Pizzolatti, M.G., Ribeiro-do-Valle, R.M., Prediger, R.D., 2010. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 117, 1337-1351.
- Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., Togari, A., 2000. Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.*(58):143-51.
- Owen, A.M., 2004. Cognitive dysfunction in Parkinson's disease: the role of frontostriatal circuitry. *Neuroscientist* 10, 525-537.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 5th ed, p 205. San Diego: Academic Press.
- Piermartiri, T.C., Figueiredo, C.P., Rial, D., Duarte, F.S., Bezerra, S.C., Mancini, G., de Bem, A.F., Prediger, R.D., Tasca, C.I., 2010. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress

following amyloid- $\beta$ (1-40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp. Neurol.* 226, 274-284.

Piermartiri, T.C., Vandresen-Filho, S., de Araújo Herculano, B., Martins, W.C., Dal'agnolo, D., Stroeh, E., Carqueja, C.L., Boeck, C.R., Tasca, C.I., 2009. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox. Res.* 16, 106-115.

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.

Prediger, R.D., Aguiar, A.S. Jr, Moreira, E.L., Matheus, F.C., Castro, A.A., Walz, R., De Bem, A.F., Latini, A., Tasca, C.I., Farina, M., Raisman-Vozari, R., 2011. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Des.* 17, 489-507.

Prediger, R.D., Aguiar, A.S. Jr, Rojas-Mayorquin, A.E., Figueiredo, C.P., Matheus, F.C., Ginestet, L., Chevarin, C., Bel, E.D., Mongeau, R., Hamon, M., Lanfumey, L., Raisman-Vozari, R., 2010. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's Disease. *Neurotox. Res.* 2, 114-129.

Prediger, R.D., Rial, D., Medeiros, R., Figueiredo, C.P., Doty, R.L., Takahashi, R.N., 2009. Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1170, 629-636.

Prediger, R.D., Batista, L.C., Medeiros, R., Pandolfo, P., Florio, J.C., Takahashi, R.N., 2006. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 202, 391-403.

Prediger, R.D., Da Cunha, C., Takahashi, R.N., 2005. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behav. Pharmacol.* 16, 209-218.

Prediger, R.D., Batista, L.C., Miyoshi, E., Takahashi, R.N., 2004. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. *Behav. Brain Res.* 153: 149-157.

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

- Ritz, B., Manthripragada, A.D., Qian, L., Schernhammer, E., Wermuth, L., Olsen, J., Friis, S., 2010. Statin use and Parkinson's disease in Denmark. *Mov. Disord.* 25, 1210-1216.
- Salinas, M., Diaz, R., Abraham, N.G., Ruiz de Galarreta, C.M., Cuadrado, A., 2003. Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem.* Apr 18;278(16):13898-904.
- Santiago, R.M., Barbieiro, J., Lima, M.M., Dombrowski, P.A., Andreatini, R., Vital, M.A., 2010. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 1104-1114.
- Saint-Cyr JA, Taylor AE, Lang AE (1988) Procedural learning and neostriatal dysfunction in man. *Brain* 111 (Pt 4):941-959.
- Sawyer, T.F., Hengehold, A.K., Perez, W.A., 1984. Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats. *Behav. Neurosci.* 98, 908-113.
- Sedelis, M., Hofele, K., Auburger, G.W., Morgan, S., Huston, J.P., Schwarting, R.K., 2000. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet.* May; 30(3):171-82.
- Sedelis, M., Schwarting, R.K., Huston, J.P., 2001. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* Nov 1;125(1-2):109-25.
- Selley, M.L., 2005. Simvastatin prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced striatal dopamine depletion and protein tyrosine nitration in mice. *Brain Res.* Mar 10; 1037(1-2):1-6.
- Shimoke, K., Chiba, H., 2001. Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced cell death via the Akt pathway by suppressing caspase-3-like activity using PC12 cells: relevance to therapeutical application for Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* Mar 1;63 (5):402-9.
- Schmidt, N., Ferger, B., 2001. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm*;108 (11):1263-82.
- Schrag, A., 2004. Psychiatric aspects of Parkinson's disease--an update. *J Neurol.* Jul;251(7):795-804.
- Strömberg, I., Wetmore, C.J., Ebendal, T., Ernfors, P., Persson, H., Olson, L., 1990. Rescue of basal forebrain cholinergic neurons after implantation of genetically modified cells producing recombinant NGF. *J Neurosci Res.* Mar;25(3):405-11.



- Slattery DA, Markou A, Cryan JF (2007) Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 190:555–568.
- Sriram, K., Matheson, J.M., Benkovic, S.A., Miller, D.B., Luster, M.I., O'Callaghan, J.P., 2002. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *FASEB J. Sep*;16(11):1474-6.
- Tadaiesky, M.T., Dombrowski, P.A., Figueiredo, C.P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C., Takahashi, R.N., 2008. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156, 830-840.
- Taylor, T.N., Greene, J.G., Miller, G.W., 2010. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 211, 1-10.
- Tolosa, E., Compta, Y., Gaig, C., 2007. The premotor phase of Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord.* 13, 2-7.
- Vieira C, De Lima TC, Carobrez Ade P, Lino-de-Oliveira C., 2008. Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. *Neurosci Lett. Nov* 14;445(2):170-3.
- Wahner, A.D., Bronstein, J.M., Bordelon, Y.M., Ritz, B., 2008. Statin use and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 70, 1418-1422.
- Wang, Q., Yan, J., Chen, X., Li, J., Yang, Y., Weng, J., Deng, C., Yenari, M.A., 2011. Statins: multiple neuroprotective mechanisms in neurodegenerative diseases. *Exp. Neurol.* 230, 27-34.
- Wang, A.L., Liou, Y.M., Pawlak, C.R., Ho, Y.J., 2010. Involvement of NMDA receptors in both MPTP-induced neuroinflammation and deficits in episodic-like memory in Wistar rats. *Behav Brain Res.* Mar 17;208(1):38-46.
- Wang, W.F., Wu, S.L., Liou, Y.M., Wang, A.L., Pawlak, C.R., Ho, Y.J., 2009. MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats. *Behav Neurosci.* Dec;123(6):1261-70.
- Wolozin, B., Wang, S.W., Li, N.C., Lee, A., Lee, T.A., Kazis, L.E., 2007. Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *B.M.C. Med.* 5, 20.
- Wood, W.G., Eckert, G.P., Igbavboa, U., Müller, W.E., 2010. Statins and neuroprotection: a prescription to move the field forward. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1199, 69-76.
- Yan, J., Xu, Y., Zhu, C., Zhang, L., Wu, A., Yang, Y., Xiong, Z., Deng, C., Huang, X.F., Yenari, M.A., Yang, Y.G., Ying, W., Wang, Q., 2011. Simvastatin prevents dopaminergic neurodegeneration in experimental parkinsonian models: the association with anti-inflammatory responses. *PLoS One* 6, e20945.

Young-Xu, Y.K., Chan, A., Liao, J.K., Ravid, S., Blatt, C.M., 2003. Long-term statin use and psychological well-being. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42, 690–697.

Zgaljardic, D.J., Borod, J.C., Foldi, N.S., Mattis, P., 2003. A review of the cognitive and behavioral sequelae of Parkinson's disease: relationship to frontostriatal circuitry. *Cogn. Behav. Neurol.* 16, 193-210.

## CAPÍTULO III

### **Atorvastatina atenua a toxicidade induzida por 6-OHDA em fatias de estriado, hipocampo e córtex cerebral *in vitro* via interação com os receptores NMDA**

#### **1. Introdução**

A 6-hidróxi-dopamina (6-OHDA) é uma das toxinas mais usadas em modelos experimentais da doença de Parkinson (PD) (Gomez-Lazaro et al., 2008, Ikeda et al., 2008, Mu et al., 2009). Ela possui uma estrutura semelhante a da dopamina (DA), e por isso degenera seletivamente neurônios dopaminérgicos e catecolinérgicos (Lehmensiek et al., 2006). Uma vez dentro do neurônio, o acúmulo de 6-OHDA promove uma auto-oxidação não-enzimática, causando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Blandini et al., 2008). A oxidação de 6-OHDA reduz os níveis de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) ou glutatona (GSH) no estriado (Perumal et al., 1992; Kunikowska e Jenner, 2001). A interação direta com complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial, acaba levando a posterior inibição respiratória e estresse oxidativo, também explica o mecanismo descrito para a geração de EROs por esta neurotoxina (Glinka et al., 1997; Inden et al., 2006; Lehmensiek, Tan, 2006; Chin et al., 2008).

A excitotoxicidade induzida pelo glutamato nos neurônios localizados em estruturas do gânglio da base tem sido descrita em modelos animais e pacientes com a PD (Olanow, 2002, Rodriguez et al., 1998). Portanto, é possível que uma diminuição na ativação do sistema glutamatérgico possa reduzir os sintomas da PD e retardar a degeneração dos neurônios dopaminérgicos. Estudos têm demonstrado que a excitotoxicidade induzida por neurotoxinas dopaminérgicas é prevenida com o uso de antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), como o MK-801 (Turski et al., 1991). No entanto, embora os antagonistas dos receptores NMDA produzam efeitos semelhantes a fármacos anti-parkinsonianos, antagonistas não competitivos de alta afinidade do receptor NMDA tem demonstrado induzir efeitos colaterais graves incluindo sintomas observados em pacientes esquizofrênicos e ataxia em diferentes estudos (Greenamyre e o ' Brien, 1991, Ossowska et al., 1994). Neste sentido, a busca de novos compostos que possam atuar como moduladores (e não bloqueadores) da transmissão glutamatérgica é uma estratégia terapêutica interessante contra a neurodegeneração observada na PD.

As estatinas são uma classe de inibidores da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que são amplamente

utilizadas na clínica para na redução dos níveis de colesterol em pacientes hiperlipidêmicos (Bucher et al., 1999). No entanto, evidências recentes sugerem que as estatinas têm efeitos neuroprotetores independentes da inibição da síntese do colesterol apresentados em várias doenças neurológicas, incluindo a isquemia cerebral, hemorragia intracerebral, PD, encefalomielite alérgica experimental e Doença de Alzheimer (DeKosky, 2005, Jung et al., 2004, Li et al., 2006, Stepien et al., 2005, Weber et al., 2005). As estatinas sequestram radicais livres derivados do oxigênio, reduzem a biossíntese de isoprenóides ligadas a geração de radicais livres e diminuem a produção excessiva de óxido nítrico através da inibição da óxido nítrico sintase induzida (Lefer et al., 2001, Wagner et al., 2000, Yamamoto et al., 1998). Elas também atenuam o aumento de cálcio intracelular induzido por GLU através de modulação das funções dos receptores NMDA (Bosel et al., 2005). Esses efeitos e ações pleiotrópicas, incluindo efeitos antioxidantes e anti-excitotóxico têm sido sugeridas para explicar os efeitos neuroprotetores das estatinas (Di Napoli et al., 2002, Jick et al., 2000). Além disso, a atorvastatina (ATOR) impede danos no hipocampo induzidos pelo ácido quinolínico, um agonista de receptores NMDA, demonstrando uma interação com os receptores NMDA e sugerindo assim um possível mecanismo envolvido em sua ação neuroprotetora (Piermartiri et al., 2009). Confirmando os efeitos demonstrados em estudos experimentais, Wolozin e colaboradores (2007) constataram que a simvastatina e a ATOR estão associadas a uma redução na incidência da DP. Além disso, Vuletic e colaboradores (2006) demonstraram que as estatinas atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, reforçando a sua eficácia neuroprotetora em doenças no SNC.

Desde a sua descrição inicial, por James Parkinson (1817) no estudo “*Essay on the shaking palsy*”, a DP vem sendo caracterizada como um distúrbio motor. Entretanto, os pacientes parkinsonianos somente desenvolvem estas alterações motoras quando aproximadamente 60-70% dos neurônios da SNpc encontram-se degenerados e os níveis estriatais de dopamina são reduzidos em 70-80% (Braak et al., 2004). Além dos sintomas motores, existem evidências de distúrbios de caráter emocional, cognitivo e psicossocial, o que é acompanhado com alterações nos níveis de dopamina nos gânglios da base (Gerlach e Riederer, 1996; Barrio et al., 1997; Lindner et al., 1999) e em outras áreas cerebrais, como o córtex pré-frontal (Stebbins et al., 1999; Marié et al., 1999). Portanto, o estudo em regiões cerebrais como o estriado, córtex cerebral e o hipocampo, diretamente relacionadas aos sintomas motores e não-motores da DP, é fundamental para o sucesso de novos compostos com potencial terapêutico.

## 2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi investigar a toxicidade *in vitro* induzida por 6-OHDA em fatias do hipocampo, estriado e córtex cerebral, estruturas cerebrais sabidamente acometidas na DP, a fim de estabelecer um modelo *in vitro* de toxicidade aguda com 6-OHDA e visando a utilização desse modelo como “screening” de novos compostos com potencial efeito neuroprotetor. Além disso, avaliou-se o efeito neuroprotetor da ATOR contra a toxicidade induzida por 6-OHDA, utilizando-se como ferramenta farmacológica uma comparação com os efeitos do MK-801 (um antagonista não competitivo dos receptores NMDA para GLU).

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Animais

Ratos Wistar machos adultos (250-300 g) foram obtidos do biotério central da UFSC. Os animais ficaram acondicionados em cinco ratos por caixa, com livre acesso a comida e água, e mantidos em um ciclo de 12 horas luz-escuro (a luz é ligada as 7:00 da manhã), com uma temperatura de 22°C  $\pm$  1°C. Todos os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram conduzidos cuidadosamente de acordo com as normas previstas pelo comitê de ética no uso de animais da UFSC (CEUA/UFSC PP00551-23080.037860/2010-31).

### 3.2. Preparação e incubação das fatias cerebrais

Os animais foram mortos por decapitação e as estruturas cerebrais (estriado, hipocampo, córtex cerebral) foram rapidamente removidas e mantidas em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB: NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain e pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37°C, sendo gaseificadas com carbogênio. Fatias controle foram incubadas por 1 h no tampão KRB e gaseificadas com carbogênio. Depois de pré-incubadas em KRB, as fatias foram incubadas com 6-OHDA (10 - 500  $\mu$ M, dependendo do experimento) ou KRB (controle) por 1 h. Para avaliação da produção de EROs, as fatias foram imediatamente processadas. Quando presentes, MK-801 e/ou ATOR (ATOR, 10  $\mu$ M) foram co-incubadas por 1 h com 6-OHDA. Após este período, KRB foi retirado e substituído por um meio de cultura nutritivo, composto por 50% de KRB, 50% do meio de cultura (DMEM, Gibco), 20

mM de HEPES e 100 µg/ml de gentamicina, a 37° C em atmosfera de CO<sub>2</sub> (Molz et al., 2008). As fatias foram mantidas por um período adicional de 3 ou 6 h para avaliação da viabilidade celular *in vitro*.

### 3.3 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo = Thiazolyl blue). O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson e Fowler, 1999). Após o período de tratamento, as fatias cerebrais foram incubadas com MTT (0,5 mg/ml) à 37 °C e o formazam reduzido é solubilizado pela adição de dimetil-sulfóxido. A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (550 nm).

### 3.4 Avaliação da captação de L-[<sup>3</sup>H] GLU em estruturas cerebrais

A captação de GLU foi realizada conforme previamente descrito (Molz et al., 2008). As fatias de estriado, hipocampo e córtex cerebral foram pré-incubadas por 15 minutos a 35° C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl<sub>2</sub> 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,65 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,27 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1 mM, D-glicose 2 mM e Hepes 5 mM). A captação inicia-se com a adição de 100 µM de glutamato, permanecendo o mesmo por 7 minutos nas fatias. A incubação é terminada com a retirada do meio de captação, as fatias são lavadas duas vezes com 1 ml de HBSS gelado e 300 µl de uma solução de NaOH 0,1 N/SDS 0,01 % foi adicionado para solubilização das fatias. Após completa solubilização, os lisados foram utilizados para determinação do conteúdo intracelular de GLU através de cintilação líquida. A captação de GLU foi expressa como união dependente de sódio (transporte de maior afinidade) ou independente de sódio (dependente de cloreto, realizada através da substituição do NaCl por solução isomolar de Cloreto de colina). O conteúdo proteico foi avaliado pelo método de Lowry et al. (1951) usando albumina de soro bovino (Sigma) como padrão.

### 3.5 Avaliação da produção de EROs

A produção de EROs intracelular foi detectada usando o composto não-fluorescente, diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). O DCFH-DA é hidrolisado por esterases intracelulares para DCFH, quando internalizado. Esta molécula não-fluorescente é oxidada para diclorofluoresceína (DCF) pela ação de oxidantes celulares. As fatias foram

incubadas com DCFH-DA (80  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos a 37°C. Depois, as fatias foram homogeneizadas em tampão TFK (K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mmol/L, com pH KCl, 140 mM). A fluorescência foi medida com a excitação em 485 nm e a emissão em 520 nm, modificado de Hempel et al. (1999). Os valores foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

### 3.6 Análise estatística

Todos os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via. A análise de post-hoc foi realizada utilizando o teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls. O nível de significância aceito para os testes foi  $P < 0,05$ . Todos os testes foram realizados usando o software  $\text{\textcircled{R}}$  Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

## 4. Resultados

### 4.1 Avaliação de neurotoxicidade induzida por 6-OHDA *in vitro*

As fatias foram submetidas à incubação com 6-OHDA (em uma curva de concentração de 100, 250 ou 500  $\mu\text{M}$ ) por 1 h e, em seguida, mantidas em meio de cultura por 3 ou 6 h antes da avaliação da viabilidade celular pela redução de MTT. Houve uma redução significativa da viabilidade celular nas fatias de estriado e hipocampo após a incubação com 6-OHDA em todas as concentrações (Figura 1). Assim, a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA e o tempo de 3 h de incubação em meio de cultura (DMEM) foram escolhidos para os experimentos subsequentes. A incubação de 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$  por 1 h) nas fatias de estriado e hipocampo também aumentou os níveis de EROs (Figura 2). As concentrações inferiores de 6-OHDA (10 ou 50  $\mu\text{M}$ ) foram ineficazes em aumentar a produção de ROS (dados não mostrados).

Considerando que a produção de EROs é medida logo após a 1 h de incubação com 6-OHDA e a viabilidade celular havia sido avaliada 3 h ou 6 h após a incubação com 6-OHDA, ambos parâmetros foram avaliados 1 h após a incubação com 6-OHDA. A produção de EROs já é máxima com 100  $\mu\text{M}$ , no entanto, só há redução da viabilidade celular com 500  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA nas fatias das três estruturas cerebrais, demonstrando a sequência temporal de produção de ROS e perda de viabilidade celular, relacionada a um mecanismo de dano por estresse oxidativo (Fig. 3).

### 4.2 Prevenção da neurotoxicidade induzida por 6-OHDA com antagonista do receptor NMDA

A incubação das fatias de hipocampo, estriado e córtex cerebral com 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) induziu uma redução semelhante na viabilidade celular em todas as regiões avaliadas como já visto anteriormente. No entanto, quando o MK-801 nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  ou 250  $\mu\text{M}$  (dados não mostrados) foi incubado na presença de 6-OHDA, um efeito neuroprotetor parcial foi observado (Fig. 4). Estes resultados demonstram a participação dos receptores NMDA na neurotoxicidade induzida por 6-OHDA.

#### 4.3 Prevenção da neurotoxicidade induzida por 6-OHDA com ATOR

O tratamento com ATOR (10  $\mu\text{M}$ ) não alterou a viabilidade celular de fatias do estriado, hipocampo e córtex cerebral, mas a 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) reduziu a viabilidade celular nas três regiões estudadas. A incubação de ATOR na presença de 6-OHDA por 1 h preveniu a redução da viabilidade celular, demonstrando que a ATOR apresentou um efeito neuroprotetor contra a toxicidade da 6-OHDA (Fig. 5).

#### 4.4 Avaliação de neuroproteção com a associação de ATOR e MK-801 na toxicidade induzida 6-OHDA

A incubação de fatias com ATOR e MK-801 não alterou a viabilidade celular. No entanto, a incubação com ATOR + 6-OHDA; MK-801 + 6-OHDA; e ATOR + MK-801 + 6-OHDA preveniu o efeito tóxico da 6-OHDA, aumentando a viabilidade celular no hipocampo, estriado e córtex cerebral (Fig. 6). Estes resultados mostram que os efeitos neuroprotetores de ATOR e MK-801 convergem para mecanismos moleculares similares, ou seja, uma ação antagonista no receptor NMDA, que deve ser melhor investigada no futuro.

#### 4.5 A toxicidade induzida por 6-OHDA *in vitro* não é prevenida pela ATOR após o tratamento *in vivo*

Considerando que o tratamento *in vitro* com a ATOR preveniu a toxicidade da 6-OHDA em fatias cerebrais, utilizamos também o tratamento *in vivo*, através da administração (v.o.) de 1 ou 10 mg/kg ATOR por 7 dias consecutivos. O tratamento *in vivo* com ATOR não alterou a redução na viabilidade celular observada após a incubação das fatias cerebrais de estriado e hipocampo com 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 7). Ao avaliarmos a captação de GLU, observamos que o tratamento com ATOR (1 ou 10 mg/kg) por 7 dias também não reverteu a redução da captação de GLU induzida pela 6-OHDA nas fatias de estriado e hipocampo (Fig. 8). Entretanto, a ATOR *per se* também não alterou a captação de GLU basal quando comparado ao grupo controle.



## 5. Conclusão

Observamos que o modelo de neurotoxicidade *in vitro* induzida por 6-OHDA diminui a viabilidade celular, a captação de GLU e aumentou a produção de EROs em fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado. A ATOR apresentou um efeito de neuroproteção semelhante ao apresentado pelo MK-801 contra a toxicidade induzida pela 6-OHDA, prevenindo a redução da viabilidade celular, efeito este que pode estar relacionado a uma ação antagonista do receptor NMDA. Mais estudos são necessários para avaliar a correlação entre a neurotoxicidade da 6-OHDA e os efeitos neuroprotetores da ATOR, como por exemplo a avaliação de marcadores de neurodegeneração neuronal e marcadores inflamatórios, observados na DP.

## 6. Figuras e legendas

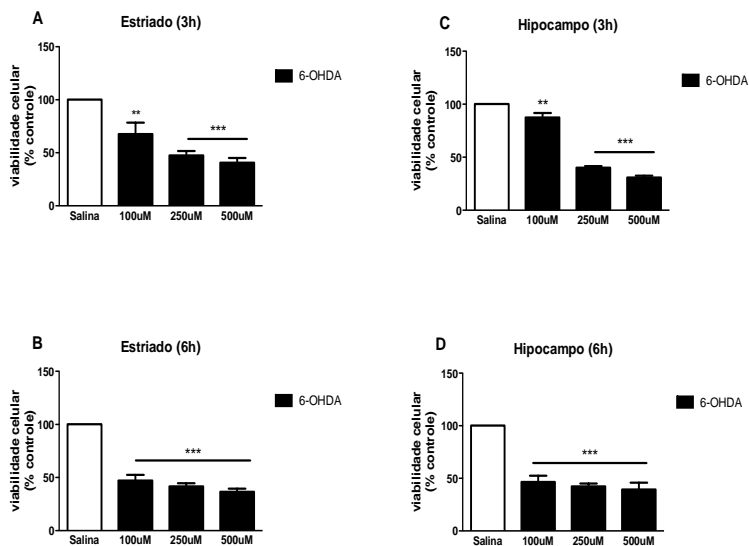


Fig. 1 Avaliação da viabilidade celular em fatias de estriado e hipocampo submetidas à incubação com 6-OHDA. Salina ou 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M ou 500  $\mu$ M 6-OHDA foram incubadas no estriado (A e B) e hipocampo (C e D) durante 1 h em meio de cultura. Após este período, o meio foi substituído por meio de cultura fresco (DMEN), na ausência de 6-OHDA onde as fatias foram mantidas por 3 ou 6 h. O grupo controle representa 100% de viabilidade celular. O MTT (0,5 mg/ml) foi incubado por 20 min em 37°C e viabilidade celular foi medida a 550 nm. Os valores estão apresentados na forma de desvio  $\pm$  erro padrão em triplicatas. (\*\* $P < 0,05$  e \*\*\* $P < 0,01$  de controle (100%)  $n = 3-5$

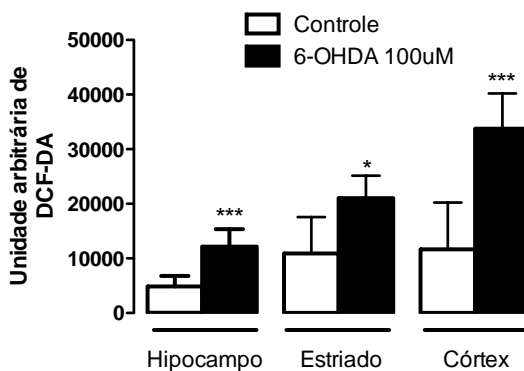


Fig. 2 Avaliação da produção de EROs em fatias de hipocampo, estriado córtex submetidas à incubação com 6-OHDA (100 $\mu$ M) e avaliadas através de DFCH-DA (intensidade de fluorescência). As fatias permaneceram incubadas durante 1 h com 6-OHDA e logo após foram avaliadas para a oxidação do DCFH-DA. Os valores estão apresentados na forma de desvio  $\pm$  erro padrão em triplicatas. (\*\*\*)  $P < 0,05$  de controle; n = 3-5).

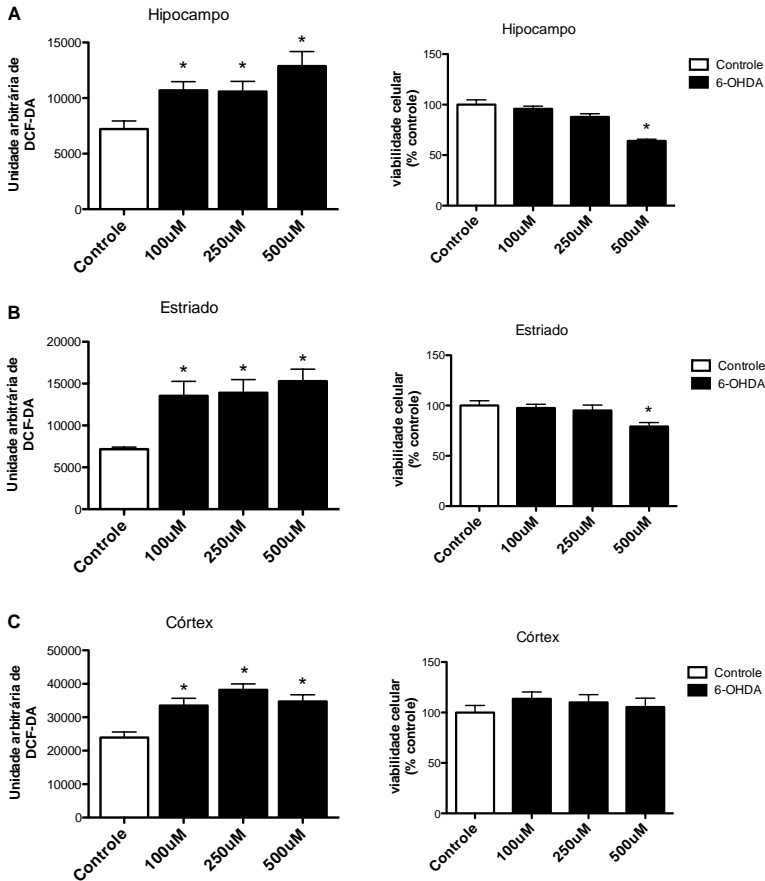


Fig. 3 Avaliação da produção de EROs (DCFH-DA, intensidade de fluorescência) e viabilidade celular (MTT) em fatias de estriado (A), hipocampo (B) e córtex (C) submetidas à incubação com 6-OHDA (100, 250 ou 500  $\mu$ M) As fatias permaneceram incubadas durante 1 h com 6-OHDA e foram imediatamente avaliadas. Os valores estão apresentados na forma de desvio  $\pm$  erro padrão em triplicatas. (\*  $P < 0,05$  de controle (100%);  $n = 3-5$ ).

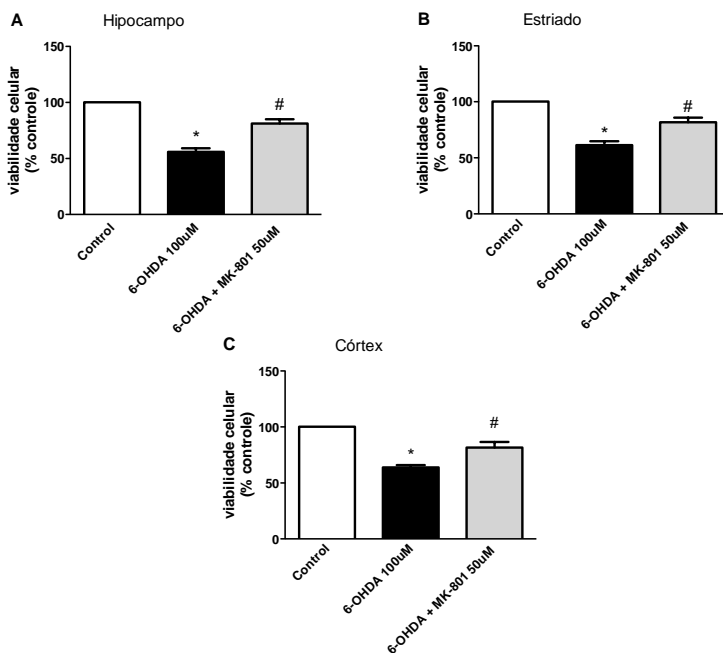


Fig. 4 Avaliação da viabilidade celular (MTT) em fatias de estriado (A), hipocampo (B) e córtex (C) submetidos à incubação com 6-OHDA (100µM) e MK-801 (50 µM). Salina (controle), 6-OHDA (100 µM), 6-OHDA + MK-801 (50 µM), foram incubadas durante 1 h em meio de cultura. Após este período, o meio foi substituído por meio de cultura fresco e as fatias mantidas por 3h adicionais. O grupo controle representa 100% de viabilidade celular. O MTT (0,5 mg/ml) foi incubado por 20 min em 37°C e viabilidade celular foi medida a 550 nm. Os valores estão apresentados na forma de desvio ± erro padrão em triplicatas. (\* $P < 0,05$  vs controle de grupo (100%); # $P < 0,05$  vs 6-OHDA; n = 3-5).

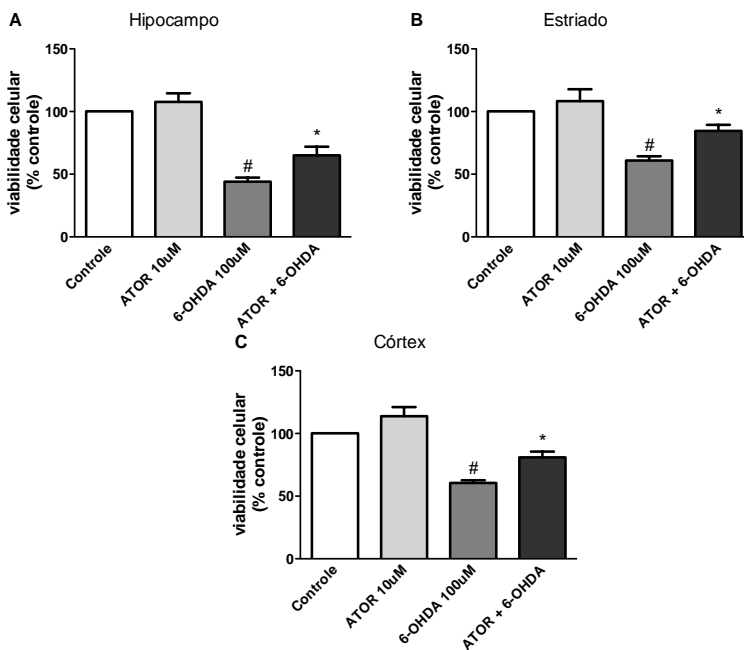


Fig. 5 Avaliação da viabilidade celular (MTT) em fatias de estriado (A), hipocampo (B) e córtex (C) submetidos a incubação com ATOR (10  $\mu$ M) e 6-OHDA (100 e MK-801 (50  $\mu$ M). Salina (controle), ATOR 10  $\mu$ M, 6-OHDA 100  $\mu$ M e ATOR + 6-OHDA foram incubadas durante 1 h em meio de cultura. Após este período, o meio foi substituído por meio de cultura fresco e as fatias mantidas por 3h adicionais. O grupo controle representa 100% de viabilidade celular. O MTT (0,5 mg/ml) foi incubado por 20 min em 37°C e viabilidade celular foi mensurada a 550 nm. Os valores estão apresentados na forma de desvio  $\pm$  erro padrão em triplicatas. (\* $P < 0,05$  vs controle (100%); # $P < 0,05$  vs 6-OHDA; n = 3-5).

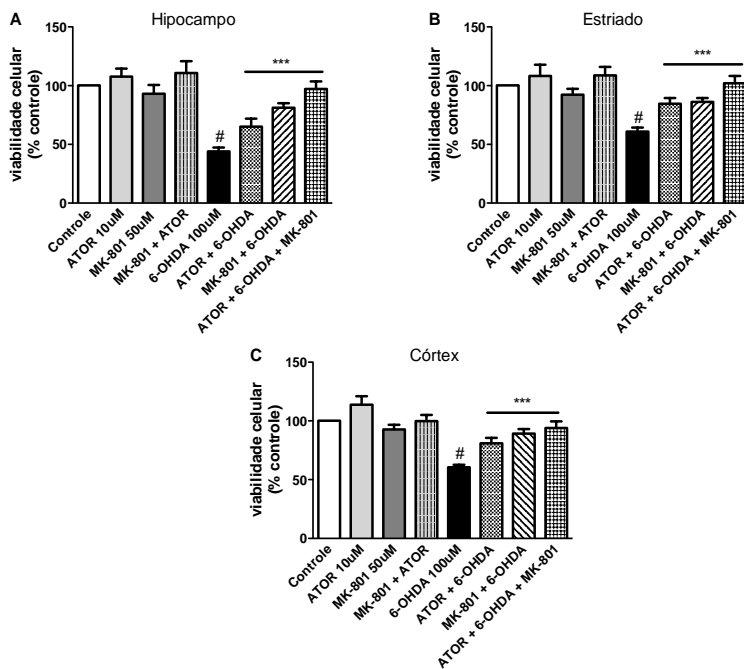


Fig. 6 Avaliação da viabilidade celular (MTT) em fatias de estriado (A), hipocampo (B) e córtex (C) submetidos à incubação com ATOR (10  $\mu$ M) e 6-OHDA (100) e MK-801 (50  $\mu$ M). Salina (controle), ATOR (10  $\mu$ M), MK-801 (50  $\mu$ M), MK-801 + ATOR, 6-OHDA (100  $\mu$ M), ATOR 6-OHDA, MK-801 + 6-OHDA, MK-801 + 6-OHDA + ATOR foram incubadas durante 1 h em meio de cultura. Após este período, o meio foi substituído por meio de cultura fresco e as fatias mantidas por 3h adicionais. O grupo controle representa 100% de viabilidade celular. O MTT (0,5 mg/ml) foi incubado por 20 min em 37°C e viabilidade celular foi mensurada a 550 nm. Os valores estão apresentados na forma de desvio  $\pm$  erro padrão em triplicatas. (# $P < 0,05$  vs controle (100%); \*\*\* $P < 0,05$  vs 6-OHDA; n = 3-5).

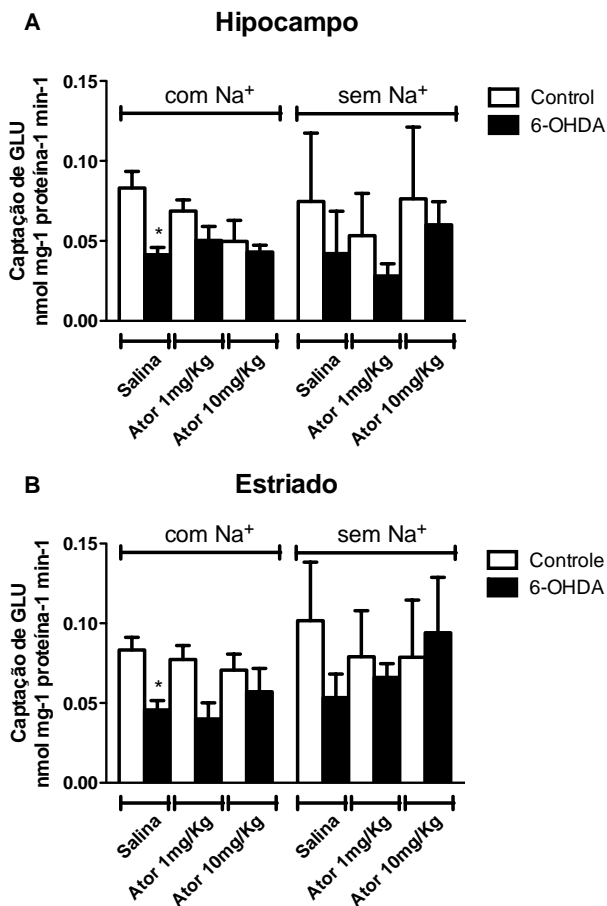


Fig. 7 Avaliação da toxicidade induzida pela 6-OHDA *in vitro*, sobre as alterações da captação de L-[<sup>3</sup>H]glutamato após o tratamento *in vivo* com ATOR. Os animais receberam por 7 dias consecutivos o tratamento com atorvastatina (ATOR, 1 ou 10 mg/kg, v.o.) ou solução salina. As fatias do hipocampo (A) e estriado (B) foram incubadas durante 1 h com 6-OHDA e logo foram avaliadas para a captação de glutamato. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. (\* $P < 0,05$  do grupo controle; n = 3-5).



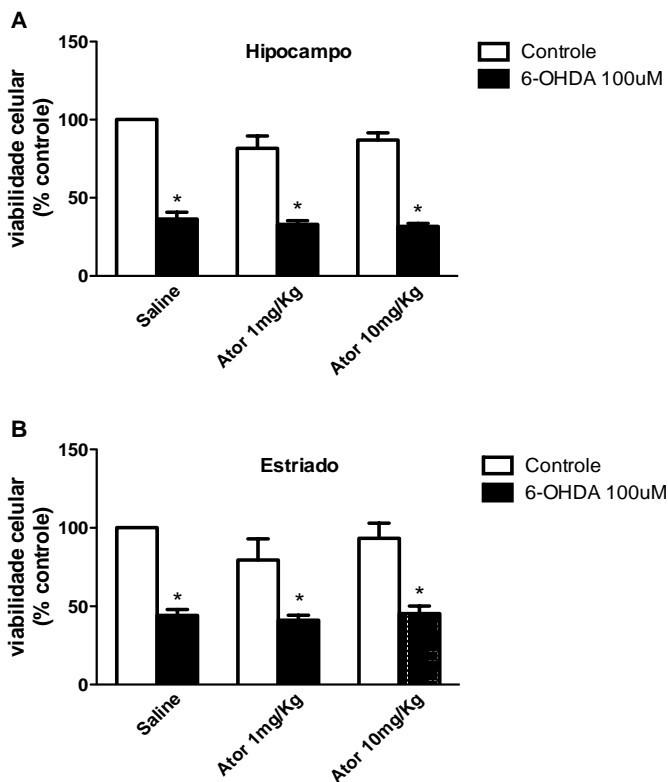


Fig. 8 Avaliação da viabilidade celular (MTT) induzida pela 6-OHDA *in vitro*, após o tratamento *in vivo* com ATOR. Os animais receberam por 7 dias consecutivos o tratamento com atorvastatina (ATOR, 1 ou 10 mg/kg, v.o.) ou solução salina. As fatias do hipocampo (A) e estriado (B) foram incubadas durante 1 h com 6-OHDA e logo foram avaliadas para a redução do MTT. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. (\* $P < 0,05$  do grupo controle (100%);  $n = 3-5$ ).

## CAPÍTULO IV

### **Estudo do envolvimento dos receptores A<sub>2A</sub> para adenosina em um modelo experimental da doença de Parkinson: infusão intranasal de MPTP em camundongos**

O estudo relatado a seguir foi desenvolvido durante o estágio de Doutorado-sanduíche (com bolsa CAPES-PDSE) realizado no período de Novembro de 2011 a Agosto de 2012 no Centro de Neurociências e Biologia Celular, Faculdade de Medicina, da Universidade de Coimbra em Portugal, sob a supervisão do Prof. Dr. Rodrigo Cunha e contou com a colaboração do Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger (Depto. Farmacologia, UFSC), da Dra. Paula Canas e do Dr. Angêlo Tomé, ambos do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

#### **1. Introdução**

Os receptores para adenosina (ADO) regulam a ação de diversos sistemas de neurotransmissores, inclusive de vias dopaminérgicas e glutamatérgicas do circuito corticoestriatal (Gomes et al., 2009; Quiroz et al., 2009). No momento, quatro diferentes subtipos de receptores para ADO (A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R e A<sub>3</sub>R), todos acoplados à proteína G, foram clonados e identificados em humanos e roedores (Fredholm et al., 2001). Os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> inibem a produção do segundo mensageiro adenosina-5'-monofosfato cíclico (AMPC) pelo acoplamento a uma proteína G inibitória (Gi). Por outro lado, os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> ativam à adenilato ciclase através de proteínas G estimulatórias (Gs). Embora os receptores A<sub>2B</sub> também possam ativar a via mediada pela fosfolipase C (PLC) pelo acoplamento a uma proteína Gq (Ryzhov et al., 2006), a ADO possui baixa afinidade a esses receptores. Sabe-se que a ADO apresenta maior afinidade pelos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>, enquanto os receptores A<sub>3</sub> possuem uma afinidade intermediária (Jacobson e Gao, 2006).

Os receptores A<sub>1</sub> são altamente expressos no córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e no corno dorsal da medula espinhal (Ribeiro et al., 2002). Os receptores A<sub>2A</sub> são encontrados em alta densidade no núcleo acumbens e em outras regiões do estriado, particularmente em neurônios glutamatérgicos, GABAérgicos e em interneurônios colinérgicos (Latini et al., 1996; Moreau e Huber, 1999; Ferre et al., 2005). Os receptores A<sub>2A</sub> também são expressos no bulbo olfatório e no hipocampo de ratos (Cunha, et al., 1994; Cunha et al., 1995; Dixon et al., 1996). Esses receptores podem interferir na transmissão sináptica em várias áreas do cérebro, participando da modulação de diversas funções, como aprendizagem, memória, atividade motora, ciclo sono e vigília. Os receptores A<sub>2B</sub> são pouco expressos no SNC

(Dixon et al., 1996), enquanto que os receptores  $A_3$  aparecem em níveis moderados no cerebelo e hipocampo (Fredholm et al., 2001; Lopes et al., 2003).

A ADO tem sido considerada um importante neuromodulador nas sinapses, uma vez que seus receptores estão localizados em neurônios da pré- e pós-sinapse e em células da glia, onde promovem a homeostasia da função neural (Cunha, 2001). Desta forma, a ADO funciona como um “sintonizador” de uma complexa interação entre seus próprios receptores e de outros neurotransmissores (Sebastiao e Ribeiro, 2000; Cunha, 2001; Ferre et al., 2007). Um número crescente de evidências tem demonstrado que a ADO apresenta efeitos opostos aos da dopamina no SNC e, por isso, os antagonistas dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  constituem uma promessa terapêutica em distúrbios motores e cognitivos, como a doença de Parkinson (DP), depressão e na dependência às drogas (Brown e Short, 2008; Cunha et al., 2008; Takahashi et al., 2008; Sebastiao e Ribeiro, 2009; Prediger, 2010). Os mecanismos moleculares pelo qual o bloqueio dos receptores  $A_{2A}$  promove neuroproteção contra a neurodegeneração dopaminérgica na DP ainda não estão totalmente elucidados. Porém, fortes evidências destacam o papel fundamental dos receptores  $A_{2A}$  na fisiopatologia da DP: 1) o papel fisiológico no controle motor; 2) modulação da neurotransmissão glutamatérgica; 3) o aumento da atividade de receptores  $A_{2A}$  na DP; 4) o seu envolvimento na neuroinflamação, sendo particularmente evidente na substância negra; 5) modulação do metabolismo e funcionamento mitocondrial (Ross et al., 2000; Ascherio et al., 2001). Segundo estudos de Cunha e colaboradores, foi demonstrado um aumento no número de receptores  $A_{2A}$  em astrócitos e micróglia em roedores submetidos a modelos experimentais da DP, visto que o bloqueio destes receptores é capaz de prevenir a neuroinflamação e conseqüentemente, a neurodegeneração dopaminérgica nestes animais (Cunha et al., 2007; Yu et al., 2008).

A idade pode alterar o equilíbrio sináptico produzido pelas modulações inibitórias e excitatórias dos receptores da ADO em terminais GABAérgicos, glutamatérgicos e dopaminérgicos. A densidade de receptores  $A_1$  no córtex e no hipocampo de ratos idosos está reduzida em relação à de adultos jovens, ao passo que os níveis de  $A_1$  no estriado sofrem pouca influência do envelhecimento (Pagonopoulou e Angelatou, 1992; Cunha et al., 1995). Por outro lado, ratos idosos apresentam uma densidade elevada de receptores  $A_{2A}$  no córtex e no hipocampo (Cunha et al., 1995; Rebola et al., 2003). Já no estriado, a densidade de receptores  $A_{2A}$  parece diminuir com o envelhecimento (Cunha et al., 1995).

Considerando a DP como uma das principais doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, o possível aumento no número de pacientes em virtude do envelhecimento populacional e a grande

procura por novas alternativas para o seu tratamento, se faz necessário uma melhor compreensão acerca da etiologia e dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia desta doença. Como descrito, os fatores ambientais e genéticos exercem um papel importante no desenvolvimento de várias alterações neurais verificadas na DP. Entretanto, verifica-se na literatura uma ausência de trabalhos buscando integrar os fatores ambientais e genéticos em modelos experimentais. Além disso, nos últimos anos vem crescendo o número de trabalhos epidemiológicos, clínicos e pré-clínicos indicando o potencial dos antagonistas seletivos dos receptores  $A_{2A}$  na prevenção e tratamento da DP (para revisão ver Prediger, 2010).

## 2. Metodologia

2.1 Animais: Foram utilizados camundongos com 5-6 meses (pesando 30-35 g) das linhagens C57BL/6 e camundongos geneticamente modificados que não expressam o receptor  $A_{2A}$  ( $A_{2A}^{-/-}$ ) que foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Jiang-Fan Chen (Universidade de Boston, EUA). Os animais foram alojados em grupos de 10 animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em câmaras ventiladas (ALESCO®) no biotério setorial do Instituto de Bioquímica da Universidade de Coimbra (Portugal) a uma temperatura de 22°C, umidade entre 60 – 80 % e ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

2.2 Drogas: Foram utilizados o MPTP (Sigma Chemical, EUA) e o antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$  para ADO, SCH58261 (gentilmente fornecido pela Dra. Christina E. Muller, Alemanha). O SCH58261 foi dissolvido em salina com 5% de Tween 80 e administrado pela via intraperitoneal (i.p.). O tratamento com SCH58261 0,3 mg/kg foi iniciado 5 dias antes da administração intranasal do MPTP, mantendo-se o tratamento ao longo dos 20 dias em que foi realizada a bateria de testes comportamentais, totalizando assim 25 dias de tratamento com SCH58261.

2.3 Administração intranasal (i.n.) de MPTP: A administração i.n. de MPTP foi realizada utilizando um procedimento semelhante ao descrito por Prediger et al. (2010). Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano 0.96% (0.75 CAM) utilizando um sistema de vaporizador (SurgiVet Inc., WI, USA). Os animais receberam a infusão bilateral (nas duas narinas) de MPTP (1,0 mg/narina). A infusão do MPTP foi realizada com o auxílio de um tubo de polietileno (PE 10), que foi inserido cerca de 7 mm de profundidade na narina dos animais. O tubo de polietileno foi conectado a uma micro-seringa de 10 µl (Hamilton, USA) acoplada à uma bomba de infusão, permitindo o controle da velocidade (10 ul/min) e do

volume (10 ul/narina) de infusão. O MPTP foi dissolvido em NaCl 0.9% (salina), sendo a salina utilizada como solução controle.

**2.4 Teste de discriminação olfatória:** A função olfatória dos animais foi avaliada através do teste de discriminação olfatória realizado seguindo o protocolo previamente descrito por Prediger e colaboradores (2005, 2010). A caixa de discriminação olfatória consiste em dois compartimentos idênticos (30 x 30 x 20 cm) separados por uma abertura que permite o acesso dos animais aos dois compartimentos. O chão de um dos compartimentos foi forrado com a serragem retirada da gaiola na qual o camundongo ficou isolado por 72 horas, enquanto que o outro compartimento foi forrado com serragem limpa e inodora. O experimento consiste em colocar o animal na caixa de discriminação olfatória e registrar, durante um período de 5 minutos, o tempo de investigação em cada compartimento. A discriminação olfatória foi avaliada pela preferência do animal ao compartimento impregnado com o seu odor (compartimento familiar) em relação ao compartimento inodoro (não-familiar), visto que nesta situação, tem sido demonstrado que roedores adultos preferem ambientes impregnados com seu próprio odor (Prediger et al., 2005, 2010).

**2.5 Teste de reconhecimento social:** O experimento foi realizado utilizando o procedimento descrito por Dantzer e colaboradores (1987) e padronizado em nosso laboratório (Prediger et al., 2005, 2010), sendo este um modelo válido para o estudo da memória olfatória de curta-duração. Os camundongos adultos (5 meses de idade) foram isolados em caixas de plástico individuais 2 horas antes do experimento. O teste de reconhecimento social consiste em duas apresentações sucessivas (5 min cada), separadas por um intervalo variável. Durante a primeira apresentação, um camundongo jovem (1 mês de idade) foi colocado na caixa do camundongo adulto, sendo registrado o tempo de investigação (cheirar, lambear, se aproximar, etc) ao camundongo jovem. Ao final da primeira apresentação, o camundongo jovem foi retirado da caixa do camundongo adulto, ficando isolado em outra caixa durante o intervalo entre as apresentações. Após um intervalo de 30 min, o jovem foi reapresentado ao camundongo adulto, registrando-se novamente o tempo de investigação do animal adulto durante a segunda apresentação. O que acontece neste tipo de experimento é que quando se utiliza um intervalo pequeno (menor que 40 min) entre as duas apresentações, o camundongo adulto é capaz de reconhecer o jovem com o qual foi previamente apresentado, verificando-se uma redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação. Entretanto, quando se utiliza um intervalo superior a 40 min entre as duas apresentações, o camundongo adulto perde a capacidade de reconhecimento, não sendo verificada redução no tempo de

investigação durante a segunda apresentação. Os resultados foram expressos pelo tempo de investigação (s) nas duas exposições ao camundongo jovem, sendo usando um intervalo de 30 min entre as apresentações.

2.6 Labirinto em Y: A memória de reconhecimento espacial dos animais foi investigada usando um labirinto em “Y” (Dellu, Mayo et al., 1992). O aparelho feito de acrílico preto possuía três braços iguais (50 x 10 x 20 cm, cada braço) afastados em 120° e foi colocado em uma sala com dicas visuais nas paredes para facilitar a localização espacial dos animais. O protocolo consistiu de duas sessões separadas por um intervalo de 180 min. Na primeira sessão, o animal foi colocado no final de um dos braços, chamado de “braço de partida”, e teve livre acesso para explorar o “outro braço” durante 5 min. Nesta sessão inicial, o terceiro braço do labirinto foi bloqueado por uma porta guilhotina e foi chamado de “braço novo”. O camundongo foi então removido do labirinto e retornou a caixa moradia. Depois de 2 horas, na segunda sessão, o animal foi novamente colocado no “braço de partida” do labirinto para explorar livremente todos os três braços durante 5 min. O número de entradas e o tempo de permanência em cada braço foram registrados. Os resultados foram expressos pelo percentual de entradas e de tempo de permanência no “braço novo.”

2.7 Teste de localização de objetos: O aparelho utilizado para o teste da localização de objetos foi uma caixa quadrada (campo aberto) de acrílico transparente (50,0 cm lados x 40,0 cm altura). Os objetos utilizados foram dois retângulos plásticos idênticos (3,0 cm lado x 4,5 cm lado x 4,5 cm altura) os quais foram colados ao chão de maneira equidistante 7 cm de dois lados da caixa. O teste da localização de objetos foi proposto inicialmente para ratos (Ennaceur et al., 1997) e posteriormente padronizado para camundongos (Murai et al., 2007; Assini et al., 2009). O procedimento consistiu em uma sessão de treino com duração de 3 min, na qual o animal foi colocado na caixa para explorar livremente. Após o final desta sessão de treino, os animais retornavam a sua caixa moradia e aguardavam até o momento do teste. Desta forma, para avaliar drogas ou procedimentos que prejudicassem o aprendizado utilizou-se o intervalo de tempo de 180 min. No momento do teste, os animais retornaram ao campo aberto do treino, porém um dos objetos havia sido mudado de lugar. Neste momento registrava-se o tempo de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou se aproximar do objeto a menos de 1 cm de distância. Os tempos de investigação dos objetos foram utilizados para o cálculo do índice de localização de objetos, o qual foi utilizado como parâmetro de memória

(índice de localização do objeto =  $[t(s)\text{objeto lugar novo} \times 100 / [t(s)\text{objeto lugar novo} + t(s)\text{objeto lugar antigo}]$ ).

2.8 Labirinto em cruz elevado: Trata-se de um teste clássico para avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade em roedores. O teste foi realizado conforme descrito previamente (Lister, 1987). Os camundongos foram colocados em um aparato de madeira de cor preta, no formato de uma cruz com dois braços abertos e dois braços fechados nas laterais (18 x 6 cm cada braço), elevados a 60 cm do chão. O comportamento foi observado por 5 min e foram medidos o número de entradas nos braços abertos e fechados, e o tempo de permanência nos mesmos. Foi calculada a proporção de entrada e permanência nos braços abertos como parâmetros de ansiedade. O número total de entradas nos braços fechados foi utilizada como um parâmetro de locomoção.

2.9 Teste de suspensão pela cauda: O teste da suspensão pela cauda é um dos testes animais mais amplamente utilizado para a avaliação e identificação de novos compostos com potencial ação antidepressiva (Bourin et al., 2005; Cryan et al., 2005). O procedimento empregado nesta tese foi similar ao descrito por STÉRU e colaboradores em 1985. Os animais foram fixados pela cauda, com o auxílio de fita adesiva, na bancada de experimentação, a uma altura de 70 cm do solo. Após a fixação, os animais foram observados individualmente durante 5 min, sendo registrados os seguintes parâmetros: tempo de latência para o início da imobilidade (definida como a ausência total de movimentação do animal) e tempo total de imobilidade. Ambas as medidas foram registradas em segundos.

2.10 Teste do rota-rod: A coordenação motora e o aprendizado de procedimento dos animais foram avaliados no teste do rota-rod seguindo o protocolo descrito por Kheirbek et al. (2009). O aparelho consiste de uma barra rotacional, que pode girar com velocidade constante ou com aceleração regulável de 1 rpm/s. A barra é dividida em quatro compartimentos. O animal foi posicionado na barra e assim que começou a caminhar, o tempo foi marcado. À medida que o tempo passa, a velocidade da barra aumentava. O tempo em que o animal permaneceu na barra foi registrado, sendo que o tempo máximo de permanência no aparelho era de 5 minutos. A velocidade em que a barra se encontrava no momento da queda também foi verificada. A avaliação total dos animais foi dividida em 4 sessões (com intervalos de 1 min) por animal durante 3 dias consecutivos. Obtendo-se assim uma média entre os dias em relação ao tempo de permanência no aparato e a sua velocidade.

2.11 Teste do labirinto aquático de Morris: O labirinto aquático consistiu de um tanque circular de cor preta (97 cm de diâmetro e 60 cm de altura), baseado no modelo proposto por Morris e colaboradores (1982), e localizado no interior de uma sala com várias pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água até a altura de 60 cm, sendo a temperatura da água mantida à temperatura constante ( $25 + 2^{\circ}\text{C}$ ). Foram estabelecidas 4 posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiram a superfície do labirinto em 4 quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). A plataforma utilizada no teste foi de acrílico transparente (10 x 10 cm) e permaneceu submersa 1 cm da superfície da água. Para o teste com pista visual (teste da memória de procedimento), uma bola de cor branca (7 cm de diâmetro) foi fixada sobre a superfície superior da plataforma submersa, permitindo que a bola permaneça visível sobre a superfície da água. Na presente proposição, foram utilizadas 3 diferentes versões do labirinto aquático de acordo com descrição prévia de Prediger et al. (2006) que permitem avaliar diferentes tipos de memória: memória espacial de referência, memória operacional e memória de procedimento.

- Versão memória operacional: os animais foram submetidos a 4 treinos por dia, durante 5 dias, no labirinto aquático. Em cada dia os animais eram liberados de 4 pontos de partida diferentes de forma pseudoaleatória. A plataforma submersa permaneceu em uma mesma posição durante todas as sessões do dia, mas entre um dia e outro foi trocada de posição. O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era levado manualmente até a plataforma e deixado nesta por 30 s. Os tempos de latência para o animal encontrar a plataforma foram registrados. Após os 30 s, o animal era colocado no ponto de partida seguinte.

- Versão memória espacial de referência: os animais foram submetidos a 10 treinos no labirinto aquático (durante um único dia). Em cada treino os animais foram liberados de pontos de partida diferentes de forma pseudoaleatória. A plataforma submersa permaneceu em uma mesma posição (Sudeste) durante todo o treinamento. No dia do teste (24 h após o treinamento), a plataforma foi retirada, sendo avaliada o tempo de nado no quadrante correto (isto é, o quadrante onde se encontrava a plataforma no dia do treino). O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era levado manualmente até a plataforma onde permanecia por 10 s. Os tempos de latência até o animal encontrar a plataforma foram registrados. Após os 10 s, o animal foi retirado da plataforma e colocado em uma caixa fora do labirinto aquático por 20 s, sendo que em seguida ele era colocado no próximo ponto de partida.



- Versão memória de procedimento (com pista visual): os animais foram submetidos a 4 treinos por dia, durante 4 dias, no labirinto aquático. Em cada treino os animais foram liberados dos 4 pontos de partida diferentes (Norte, Sul, Leste, Oeste) e a plataforma visível foi sendo trocada de posição em cada treino entre os 4 diferentes quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste, Sudoeste). O animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era levado manualmente até a plataforma onde permanecia por 10 s. Os tempos de latência até o animal encontrar a plataforma foram registrados. Após os 10 s, o animal era retirado da plataforma e colocado em uma caixa fora do labirinto aquático por 20 s. Nesse intervalo era efetuada a troca de posição da plataforma para o treino seguinte. A posição de partida e a posição da plataforma foram arranjadas de modo que as distâncias (proximal e distal) fossem contrabalançadas entre os treinos.

2.12 Teste da plataforma (*Pole test*): O pole teste é muito sensível a mudanças na função nigrostriatal, pois é necessário uma boa manutenção e força no desempenho. O camundongo é colocado de cabeça para cima próximo ao topo de uma plataforma vertical (1 cm de diâmetro e 50 cm de altura) e o tempo para girar 180° e descer são utilizados como medidas da função motora (Giovanni et al., 1994).

2.13 Teste de agarrar (*Grasping*): A força muscular dos animais foi medida através da força de agarramento no grasping test. Para isso, uma grade de 8 cm x 14 cm foi colada a uma balança eletrônica. Os camundongos foram permitidos a agarrar a grade obtendo-se uma média de três tentativas após serem suspensos pela cauda. O valor registrado pela balança no momento preciso da perda foi anotado e a força de agarramento foi calculada (Sgado et al., 2011).

2.14 Campo aberto: Para avaliar possíveis alterações locomotoras induzidas pelo tratamento ou deleções gênicas utilizadas, os animais foram testados durante 1 h no campo aberto (Pietro Paolo et al., 2008). O aparato, feito de madeira e fórmica, é formado por um chão de cor preta (30 x 30 cm), dividido em 9 quadrantes de 10 x 10 cm, com paredes transparentes de 15 cm de altura. Durante os experimentos, cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e as sessões experimentais foram gravadas por um sistema de câmera de vídeo. A distância total percorrida foi registrada e utilizada como índice de atividade motora.

2.15 Imunoistoquímica: O efeito da administração i.n. de MPTP sobre os níveis de expressão da proteína tirosina hidroxilase (TH) no encéfalo de

camundongos foi avaliado através da técnica de imunistoquímica. Após serem anestesiados, os animais foram perfundidos com solução salina e paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram fixados e submetidos a um processamento histológico para inclusão em parafina. A avaliação da expressão das proteínas descritas acima foi detectada em cortes histológicos parafinados (3-5  $\mu$ m), representativos das regiões de interesse (substância negra, e estriado). Depois de desparafinadas e hidratadas as amostras foram incubadas em solução de peróxido de hidrogênio 3%, para eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas à reativação antigênica induzida pelo calor, onde as mesmas foram imersas em solução de tampão citrato 0,01 M, pH 6,0, e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 35 min. Os anticorpos primários foram diluídos em uma solução comercial apropriada à diluição de anticorpos (DAKO CYTOMATION, EUA) e adicionados sobre os cortes teciduais, sendo mantidos de 12-16 h a uma temperatura de 2-8°C. Após lavagem das lâminas em tampão fosfato (PBS), estas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM coelho/camundongo conjugado com um polímero de peroxidase (Em Vision Plus, Dako, EUA), em câmara úmida durante 1 h, a temperatura ambiente. As amostras foram submetidas à revelação colorimétrica, com peróxido de hidrogênio a 0,3% e 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), contracoradas em hematoxilina de Harris, e montagem em meio permanente. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. A análise das reações imunohistoquímicas foi realizada através de análise computacional, utilizando o programa de análise ImageJ (National Health Institute, EUA).

### **3. Desenho experimental**

Dia 0: Administração intranasal (i.n.) de MPTP: modelo experimental da DP (Prediger et al., 2010, 2011).

Dia 3: Teste de discriminação olfatória: avaliação da função olfatória (Prediger et al., 2010).

Dia 7: Teste de reconhecimento social: avaliação da memória olfatória de curto prazo (Dantzer et al., 1987; Prediger et al., 2010).

Dias 8 e 9: Labirinto em Y: avaliação da memória espacial de curto prazo (Canas et al., 2009).

Dias 10 e 11: Teste da localização de objetos: avaliação da memória espacial de curto prazo (Assini et al., 2009)

Dia 12: Labirinto em cruz elevado: avaliação de comportamento do tipo ansiedade (Lister, 1987).

Dia 13: Teste da suspensão pela cauda: avaliação de comportamentos do tipo depressivo (Steru et al., 1985).

Dias 14 - 16: Teste do rota-rod: avaliação da coordenação motora e aprendizado de procedimento dependentes do estriado (Kheirbek et al., 2009).

Dias 14 - 17: Labirinto aquático de Morris: foi utilizada uma versão para avaliação da memória de procedimento (implícita) dependente do estriado (Prediger et al., 2006).

Dia 18: Testes da plataforma (*pole test*) e de agarrar (*grasping*): avaliação da bradicinesia (lentidão dos movimentos) e força muscular, respectivamente (Giovanni, et al., 1994; Sgado et al., 2011).

Dia 20: Teste da habituação no campo aberto (1 h): avaliação da atividade exploratória espontânea e aprendizado de procedimento dependentes do estriado (Pietropaolo et al., 2008).

Dia 21: Morte dos animais para coleta de estruturas cerebrais para avaliações bioquímicas e perfusão dos animais para imunoistoquímica.

#### **4. Resultados**

4.1 Efeitos do bloqueio farmacológico ou deleção gênica dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina sobre os prejuízos olfatórios induzidos pela administração i.n. de MPTP em camundongos

A Figura 1 mostra os resultados dos efeitos da administração do antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$  para ADO SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) ou da deleção total ou seletiva no estriado dos receptores  $A_{2A}$  sobre a discriminação olfatória de camundongos tratados com o MPTP i.n.

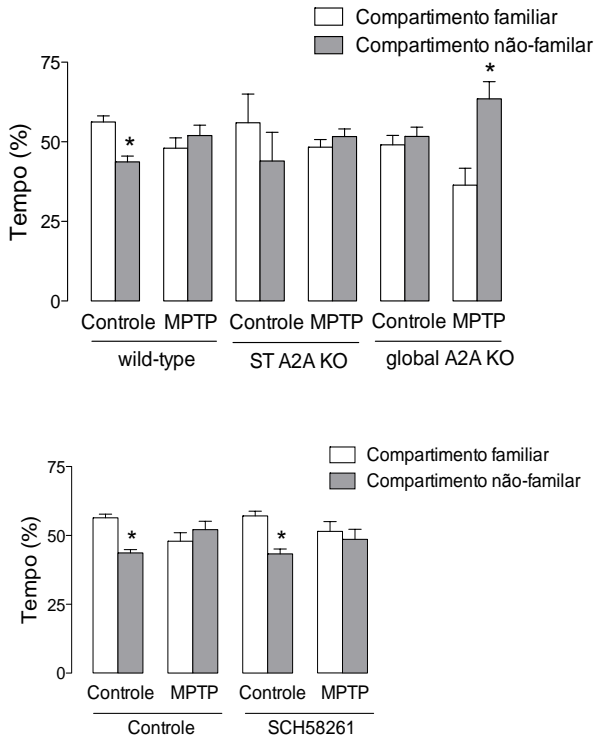


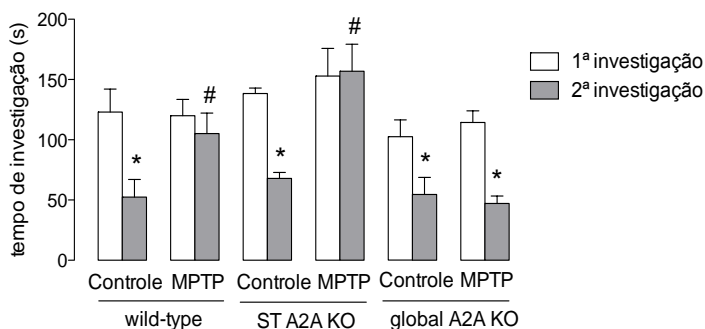
Fig. 1 - Efeitos do tratamento com o antagonista seletivo dos receptores A<sub>2A</sub> para adenosina SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) ou da deleção total ou seletiva no estriado dos receptores A<sub>2A</sub> sobre a discriminação olfatória de camundongos tratados com MPTP (1 mg/narina) pela via i.n. As barras representam a porcentagem do tempo (média ± E.P.M.) gasto em cada um dos compartimentos (n= 8-10 animais por grupo). \* $P \leq 0.05$  comparado a % do tempo gasto no compartimento familiar (Teste "t" de Student).

Como esperado, os animais tratados com a solução controle apresentaram um bom desempenho nessa tarefa, sendo capazes de discriminar o ambiente familiar do ambiente não-familiar, passando um tempo significativamente maior no compartimento familiar (impregnado com o seu próprio odor). Entretanto, os camundongos que receberam MPTP (1 mg/narina, i.n.) apresentaram prejuízo na discriminação olfatória, não sendo capazes de distinguir os dois compartimentos, passando tempos semelhantes nos dois ambientes. O bloqueio farmacológico ou a deleção gênica dos receptores A<sub>2A</sub> para adenosina não foram capazes de prevenir os prejuízos na discriminação olfatória induzidos pela administração i.n. de

MPTP em camundongos. Sugerindo assim que possivelmente os receptores  $A_{2A}$  não estão envolvidos no efeito neuroprotetor no teste de discriminação olfatória após o prejuízo com a infusão de MPTP. Torna-se interessante uma avaliação futura da expressão destes receptores na região do bulbo olfatório, visto que a mesma está envolvida diretamente com esta avaliação comportamental.

#### 4.2 Efeitos do bloqueio farmacológico ou deleção gênica dos receptores $A_{2A}$ para adenosina sobre os prejuízos cognitivos induzidos pela administração i.n. de MPTP em camundongos

Os efeitos da administração i.n. de MPTP, bem como do bloqueio farmacológico ou deleção gênica dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina nos processos de aprendizado e memória dos animais foram avaliados em diferentes testes comportamentais. Inicialmente realizamos o teste de reconhecimento social, que permite a avaliação de uma memória olfatória de curta-duração. Como pode ser observado na Figura 2, os animais que receberam a administração i.n. de MPTP não foram capazes de reconhecer um jovem familiar após 30 min da 1ª exposição, apresentando um tempo semelhante de investigação social entre as duas apresentações. De maneira interessante, o tratamento crônico com o antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.), bem como a deleção global (todo organismo) destes receptores foi capaz de prevenir estes prejuízos na memória social induzidos pelo MPTP. Entretanto, a deleção dos receptores  $A_{2A}$  seletivamente no estriado não foi capaz de prevenir os efeitos deletérios da administração i.n. de MPTP, sugerindo que outras estruturas cerebrais (como o bulbo olfatório ou o córtex pré-frontal) estão envolvidas nos efeitos positivos do bloqueio dos receptores  $A_{2A}$  na memória social.



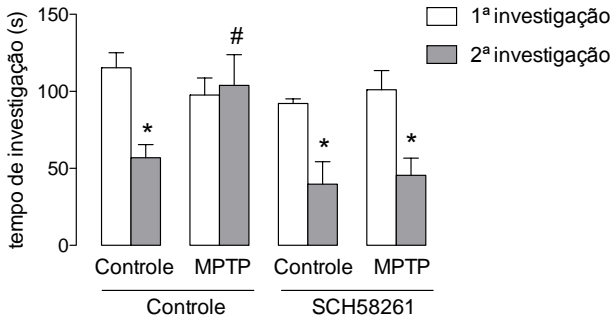
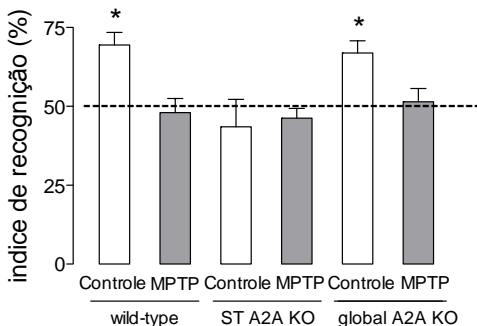


Fig. 2 - Efeitos do tratamento com o antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) ou da deleção total ou seletiva no estriado dos receptores  $A_{2A}$  sobre o tempo de investigação de camundongos tratados com MPTP (1 mg/narina) pela via i.n. quando o mesmo camundongo jovem foi re-apresentado ao animal adulto após um intervalo de 30 min. As barras representam o tempo de investigação (média  $\pm$  E.P.M.) de 8-10 animais por grupo. \* $P \leq 0.05$  comparado ao tempo de investigação gasto durante a 1ª apresentação do mesmo grupo; # $P \leq 0.05$  comparado ao tempo de investigação gasto durante a 2ª apresentação do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

No teste de realocação do objeto, que avalia a memória espacial de curto prazo através da capacidade dos animais perceberem uma alteração sutil na localização dos objetos em uma arena quadrangular, os resultados obtidos foram muito semelhantes aos do teste de reconhecimento social. Como ilustrado na Figura 3, os animais que receberam a administração i.n. de MPTP apresentaram um prejuízo no índice de reconhecimento, não sendo capazes de perceberem a mudança na posição dos objetos.



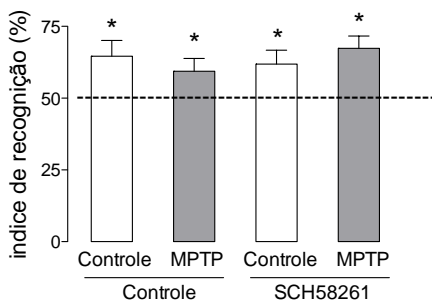


Fig. 3 - Efeitos do tratamento com o antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) ou da deleção total ou seletiva no estriado dos receptores  $A_{2A}$  sobre o índice de reconhecimento no teste de realocação de objetos de camundongos tratados com MPTP (1 mg/narina) pela via i.n. \* $P \leq 0.05$  comparado ao índice de aleatoriedade (50%) no reconhecimento dos objetos (Teste "t" de Student).

De maneira interessante, o tratamento crônico com o antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) apresentou um efeito característico de prevenção do prejuízo na memória espacial de curto-prazo, porém o grupo MPTP/control não apresentou este prejuízo significativo para podemos afirmar se esse efeito induzido pelo SCH58261 é válido.

A deleção dos receptores  $A_{2A}$  de forma global não foi capaz de prevenir os efeitos deletérios da administração i.n. de MPTP, sugerindo que outras estruturas cerebrais podem estar relacionadas a este efeito. A deleção dos receptores  $A_{2A}$  no estriado apresentou um prejuízo significativo inclusive no grupo controle, além do grupo MPTP, demonstrando a sensibilidade maior na participação dos receptores  $A_{2A}$  estriatais na memória especial de curto prazo.

Para finalizar a avaliação da função cognitiva dos animais, estes foram avaliados em uma versão de procedimento do labirinto aquático (a plataforma foi sinalizada por uma pista espacial). Como pode ser observado na Figura 4, a administração i.n. do MPTP promoveu um prejuízo no desempenho dos camundongos nesta tarefa, sendo que os animais gastaram mais tempo para encontrar a plataforma. De maneira interessante, o bloqueio farmacológico com o SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.), bem como a deleção global (todo organismo) destes receptores foi capaz de previr estes prejuízos na memória de procedimento induzidos pelo MPTP. Por outro lado, a deleção seletiva dos receptores  $A_{2A}$  do estriado promoveu *per se* um prejuízo no desempenho desta tarefa, sugerindo a importância destes receptores no estriado para a memória de procedimento.

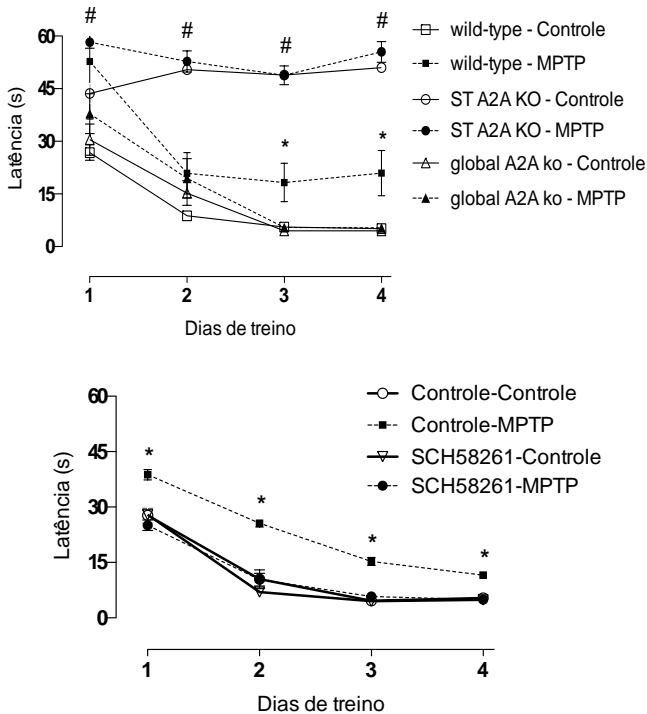


Fig. 4 - Efeitos do tratamento com o antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) ou da deleção total ou seletiva no estriado dos receptores  $A_{2A}$  sobre o desempenho dos animais na versão de memória de procedimento no labirinto aquático de Morris de camundongos tratados com MPTP (1 mg/narina) pela via i.n.. Os valores são expressos pela latência para encontrar a plataforma (média  $\pm$  E.P.M.) de 8-10 animais por grupo.  $*P \leq 0,05$  comparado ao grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

#### 4.3 Efeitos do bloqueio farmacológico ou deleção gênica dos receptores $A_{2A}$ para adenosina sobre possíveis prejuízos emocionais induzidos pela administração i.n. de MPTP em camundongos

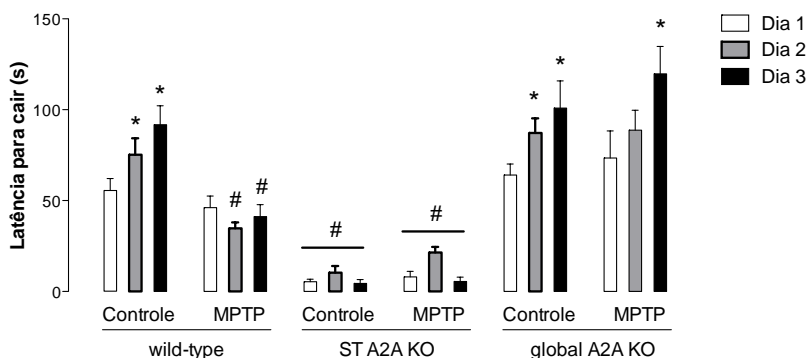
Investigamos os efeitos da administração i.n. de MPTP, bem como da administração do antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) ou da deleção total ou seletiva no estriado dos receptores  $A_{2A}$  sobre comportamentos relacionados a ansiedade e depressão



em camundongos. Não foram observadas alterações significativas nos testes do labirinto em cruz elevado (teste de ansiedade) e suspensão pela cauda (depressão) (resultados não mostrados).

#### 4.4 Efeitos do bloqueio farmacológico ou deleção gênica dos receptores $A_{2A}$ para adenosina sobre os prejuízos motores induzidos pela administração i.n. de MPTP em camundongos

Os possíveis prejuízos motores induzidos pela administração i.n. de MPTP na função motora dos animais foram avaliados através de diferentes testes comportamentais. Inicialmente realizamos o teste do rota-rod, onde os animais precisam se equilibrar e correr sobre uma barra giratória em rotação crescente de velocidade. Como pode ser observado na Figura 5, a administração i.n. de MPTP prejudicou a coordenação motora e o aprendizado motor, promovendo uma redução na latência de queda dos animais do rota-rod. O bloqueio farmacológico com o SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.), bem como a deleção global (todo organismo) destes receptores foi capaz de prevenir estes prejuízos motores induzidos pelo MPTP. Por outro lado, a deleção seletiva dos receptores  $A_{2A}$  do estriado promoveu *per se* um prejuízo no desempenho dos animais no rota-rod, sugerindo a importância destes receptores no estriado para a coordenação motora e o aprendizado de procedimento.



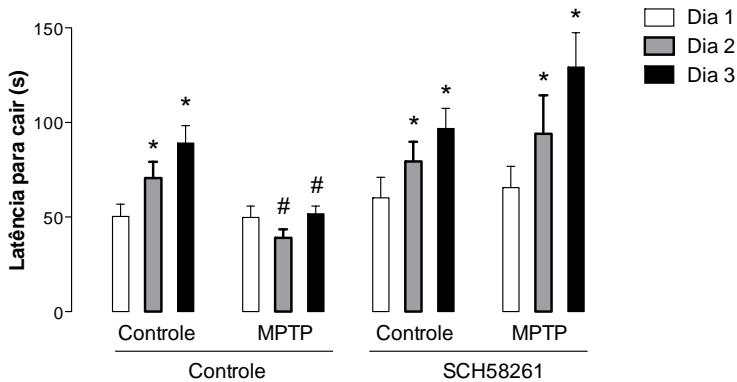
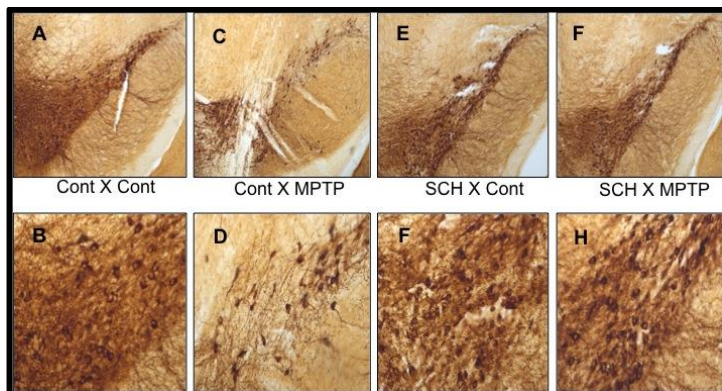


Fig. 5 - Efeitos do tratamento com o antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$  para adenosina SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) ou da deleção total ou seletiva no estriado dos receptores  $A_{2A}$  sobre o desempenho de camundongos tratados com MPTP (1 mg/narina) pela via i.n. no teste do rota-rod. Os valores são expressos pela latência para queda (média  $\pm$  E.P.M.) de 8-10 animais por grupo. \* $P \leq 0,05$  comparado ao dia 1 do mesmo grupo; #  $P \leq 0,05$  comparado ao mesmo dia do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

Nos demais testes motores realizados (teste da plataforma, teste de agarrar e campo aberto), não foram observadas diferenças significativas (dados não mostrados), indicando que a administração i.n. do MPTP promove prejuízos muito sutis na função motora dos animais, sendo um modelo útil para o estudo de sintomas mais precoces da doença de Parkinson.

#### 4.5 Efeitos do bloqueio farmacológico ou deleção gênica dos receptores $A_{2A}$ para adenosina sobre a morte neuronal induzido pela administração i.n. de MPTP em camundongos

Por fim realizamos estudos de imunistoquímica para avaliarmos a morte de neurônios dopaminérgicos após a administração i.n. de MPTP, sendo que estes representam alterações neuropatológicas características da doença de Parkinson. Como pode ser observado na Figura 6, a administração i.n. de MPTP promoveu uma redução significativa no número de neurônios dopaminérgicos (marcação para tirosina hidroxilase, TH) localizados tanto na substância negra parte compacta quanto no estriado dos animais.



### Substância negra

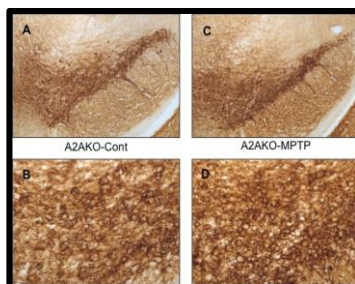
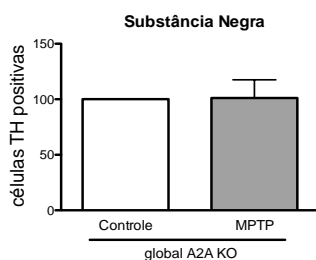
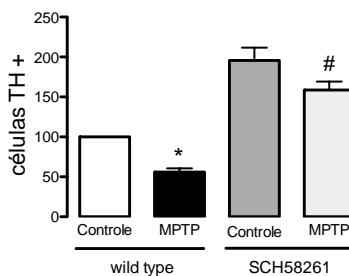


Fig. 6 - Efeitos do tratamento com o antagonista seletivo dos receptores A2A para adenosina SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) ou da deleção total dos receptores A2A sobre a perda de neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra (A, C, E, F com aumento de 5X; B, D, F, H com aumento de 20X) induzida pela administração i.n. de MPTP (1 mg/narina). \* $P \leq 0,05$  comparado ao grupo controle, e #  $P \leq 0,05$  comparado ao grupo MPTP (Teste ANOVA seguida de Tukey).

A deleção global (todo organismo) dos receptores A<sub>2A</sub> e o bloqueio farmacológico dos receptores A<sub>2A</sub> seletivamente com SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) no estriado e na substância negra foi capaz de prevenir a perda dos neurônios dopaminérgicos induzida pelo MPTP, demonstrando o potencial neuroprotetor desta abordagem (Figuras 6 e 7).

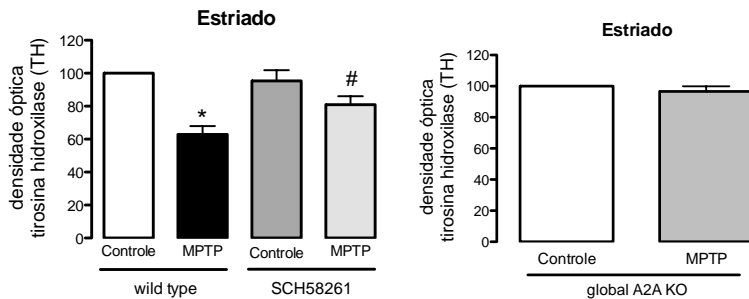
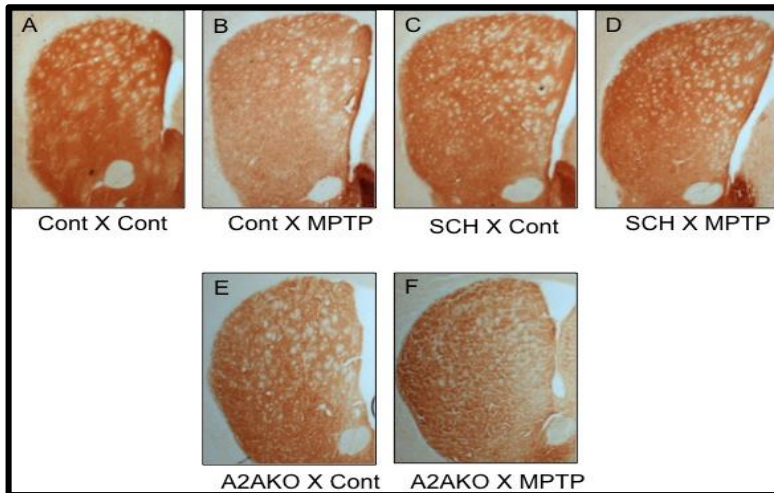


Fig. 7 – Efeitos do tratamento com o antagonista seletivo dos receptores A<sub>2A</sub> para adenosina SCH58261 (0.3 mg/kg, i.p.) ou da deleção total dos receptores A<sub>2A</sub> sobre a perda de neurônios dopaminérgicos localizados no estriado (A-F com aumento de 5X) induzida pela administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) em camundongos. \*  $P \leq 0,001$  comparado ao grupo controle e #  $P \leq 0,005$  comparado ao grupo controle x mtp. (Teste de Newman-Keuls).

## 5. Conclusão

Com a análise dos resultados do presente estudo podemos concluir que há um envolvimento dos receptores  $A_{2A}$  para ADO no processo neurodegenerativo induzido pela administração i.n. do MPTP, bem como destacar o potencial do bloqueio farmacológico destes receptores como um novo alvo para o tratamento dos sintomas não-motores da DP. Esperamos que estas informações possam futuramente contribuir no desenvolvimento de abordagens mais racionais e eficazes para o tratamento da DP.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo evidenciam o potencial terapêutico de novos compostos de ação não-dopaminérgica a fim de minimizar os sintomas motores e não-motores na doença de Parkinson (DP). Avaliamos o potencial protetor do Lítio e Valproato (estabilizadores do humor), da ATOR (utilizado no tratamento de dislipidemias), do SCH58261 (antagonista de receptores  $A_{2A}$  de adenosina) e da deleção gênica dos receptores  $A_{2A}$  para ADO. Foram utilizadas duas neurotoxinas já bem descritas na literatura como modelos experimentais da DP, sendo elas o MPTP e a 6-OHDA. O MPTP foi administrado pela via i.n., a fim de mimetizar um efeito de intoxicação ambiental por neurotoxinas, sendo esse um dos fatores na etiologia da DP. Esse modelo vem sendo utilizado pelo nosso laboratório e tem apresentado uma série de efeitos motores e não motores encontrados na DP, assim o mesmo se torna uma boa ferramenta para compreender a patologia, e buscar novos compostos com potencial terapêutico. A 6-OHDA foi abordada de uma forma diferente em relação aos modelos tradicionais presentes na literatura. Iniciamos a padronização de um modelo de toxicidade *in vitro* com fatias cerebrais incubadas em 6-OHDA a fim de desenvolver um protocolo de fácil execução que pudesse ser utilizado para a avaliação de possíveis drogas neuroprotetoras.

### Lítio e Valproato

No capítulo I do presente estudo investigamos os efeitos dos fármacos estabilizadores do humor, Li e VPA, que vêm sendo avaliados como novas estratégias de neuroproteção em relação a diferentes tipos de danos dopaminérgicos induzidos por toxinas que mimetizam a DP. (Kidd, et al., 2011; Monti et al., 2010 e 2007; Youdim, et al., 2004). Utilizamos como modelo experimental da DP a administração i.n. de MPTP em ratos que induz prejuízos dependentes do tempo nas funções olfatórias, emocionais, cognitivas e motoras, associadas com as perturbações dependentes do tempo de exposição à neurotoxina dopaminérgica nas estruturas cerebrais, correlacionando assim com os diferentes estágios da DP humana (Moreira et al., 2010; Prediger et al., 2011, 2009, 2006). De acordo com a hipótese de Braak, o bulbo olfatório é uma das primeiras estruturas a ser comprometida na patologia relacionada com DP (Braak et al., 2004).

O modelo de administração i.n. de MPTP utilizado no presente estudo induziu um prejuízo na capacidade de discriminação olfatória dos ratos avaliados, sendo este efeito verificado 3 dias após a administração de MPTP. A incapacidade dos ratos em discriminar entre o ambiente familiar e não-familiar realmente reflete em um prejuízo de discriminação olfatória, e não uma simples deficiência locomotora, visto a ausência de alteração no

número de cruzamentos entre os compartimentos familiares e não familiar e ausência de alteração nos parâmetros comportamentais avaliados no campo aberto após a administração i.n. de MPTP. De acordo com os nossos resultados, Schintu e colaboradores (2009) usando um protocolo de administração i.p. de MPTP (25 mg/kg) associado à probenecida (250 mg/kg) em ratos, duas vezes por semana durante 5 semanas, demonstraram um comprometimento da disfunção olfatória logo após a primeira injeção dos compostos, porém o prejuízo motor somente apareceu após o terceiro dia de administração. Outros trabalhos do nosso grupo confirmaram também que a administração i.n. de MPTP promove um prejuízo precoce da capacidade de discriminação olfatória (Prediger et al., 2006, 2009; Franco et al., 2007) em ratos adultos e camundongos (Prediger et al., 2009), verificados entre 1 a 14 dias após a infusão do MPTP.

Investigamos também o impacto da administração i.n. de MPTP sobre a memória de reconhecimento social. A memória de reconhecimento social é um modelo específico de memória olfatória que pode envolver uma forma de memória de curto prazo, utilizando como base a capacidade de discriminação olfatória em roedores (Sawyer et al., 1984). Confirmando os resultados do nosso grupo (Moreira et al., 2010), os animais que receberam MPTP (0.1 mg/narina) levaram mais tempo investigando o animal jovem durante a segunda apresentação, em relação a primeira, sugerindo uma deficiência na capacidade de reconhecer o rato jovem no ambiente familiar após um curto período de tempo. Os resultados de prejuízo nos testes de discriminação olfatória e de reconhecimento social induzidos pela administração de MPTP, podem estar relacionados com uma redução significativa dos níveis de dopamina (cerca de 55%) e dos seus metabólitos, DOPAC e HVA, no bulbo olfatório de ratos. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que sugerem fortemente o envolvimento da dopamina no processamento olfatório. Em mamíferos, o bulbo olfatório contém uma grande população de interneurônios dopaminérgicos, os quais são importantes para as informações no processamento do odor (Halazs e Shepherd, 1983). Uma injeção sistêmica do agonista dopaminérgico pode reduzir a detecção do odor (Doty e Risser, 1989) e diminuir a ativação metabólica induzida pelo odor no bulbo olfatório (Sallaz e Jourdan, 1992). Além disso, a dopamina parece ser necessária para a memória olfatória, considerando que antagonistas dos receptores de dopamina (Prediger et al., 2004, 2005; Weldon, Travis e Kennedy, 1991) ou tratamentos que reduzem a neurotransmissão dopaminérgica como o MPTP (Dluzen e Kreutzberg, 1993; Prediger et al., 2010) e a reserpina (Prediger et al., 2004, 2005) inibem a memória olfatória.

Demonstramos também neste estudo que o pré-tratamento por via i.p. com Li (47,5 mg/kg) e VPA (200 mg/kg) durante 7 dias consecutivos foi capaz de prevenir os prejuízos de discriminação olfatória e de

reconhecimento social, promovendo ainda uma prevenção na redução nos níveis de dopamina do bulbo olfatório causado pela administração de MPTP. Portanto, estes resultados de Li e VPA demonstram a sua importância para a restauração da função olfatória que se encontra prejudicada nas fases iniciais da DP.

Após observarmos em estudos prévios que a administração i.n. de MPTP não promove alterações motoras significativas nos períodos iniciais, o que comprometeria a avaliação de funções cognitivas e emocionais, também investigamos se estes comportamentos são afetados após a administração i.n. de MPTP. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a administração i.n. de MPTP em ratos, não promoveu alteração na memória de longo prazo (LTM) durante os testes de esQUIVA inibitória (Prediger et al., 2010) e de labirinto aquático (Prediger et al., 2006) sendo esses testados 24 h após os seus respectivos treinamentos para a consolidação da memória. Em contraste, na consolidação da memória de curto prazo (STM) a partir dos mesmos testes de esQUIVA inibitória (Prediger et al., 2010) e labirinto aquático (Prediger et al., 2006) os animais apresentaram um prejuízo significativo nos respectivos testes após a administração i.n. de MPTP. Esses resultados são consistentes com os estudos em humanos, sugerindo que pacientes com DP apresentam prejuízos na memória de trabalho e na memória de curto prazo em tarefas dependentes principalmente do circuito frontoestriatal (Pascual e Gonzalez, 1995; Zgaljardic et al., 2003), mantendo as memórias de longo prazo (declarativas) inalteradas (Bosboom, Stoffers e Wolters, 2004; Dubois e Pillon, 1997). No presente estudo, nossos resultados fornecem subsídios interessantes de que o pré-tratamento com Li e VPA melhoram seletivamente os prejuízos de STM induzidas pela administração i.n. de MPTP em ratos na esQUIVA inibitória. Além disso, o pré-tratamento com Li e VPA previniu a perda dos níveis de dopamina no estriado (40% em relação ao controle) induzido pela administração i.n. de MPTP. Apesar de existirem diversos estudos demonstrando os efeitos neuroprotetores do Li e VPA em relação às alterações neuroquímicas da DP, poucos ainda abordam os efeitos de alterações cognitivas presentes em modelos animais. Porém essas propriedades cognitivas de neuroproteção do Li e VPA podem ser vistas em outros modelos animais de lesão cerebral. Zhu e colaboradores (2010) demonstraram que o pré-tratamento com Li (1 mmol/kg, i.p.) durante 14 dias, melhorou o desempenho de aprendizagem e memória espacial de ratos após o traumatismo cranioencefálico (TCE). Recentemente, Zhang e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento a longo prazo com Li reduz a clivagem da proteína precursora amilóide (APP), a produção da beta-amilóide e a formação da placa senil, melhorando os prejuízos de aprendizagem espacial em um modelo de camundongo transgênico envelhecido. O tratamento crônico com Li



aumentou a potenciação de longa duração (LTP) em células grânulares do giro denteado no hipocampo de ratos (Shim et al., 2007), bem como, melhorou a aprendizagem em processos de memória em ratos (Nocjar, Hammonds e Shim, 2007; Tsaltas et al., 2007). Em conjunto, esses estudos sugerem fortemente o potencial efeito do Li como um agente neuroprotetor e de potencializador no aumento cognitivo (Tsaltas et al., 2009). Da mesma forma, o VPA também apresenta características de neuroproteção e de melhora na função cognitiva de ratos submetidos à TCE (Dash et al., 2010). Além disso, o VPA inibe a produção de beta-amilóide, a formação de placa neuríticas e déficits de memória em modelos animais da doença de Alzheimer (Qing et al., 2008). Por outro lado, alguns autores também descreveram que o VPA pode causar deficiência cognitiva, reduzindo a neurogênese no hipocampo (Sgobio et al., 2010; Umka et al., 2010), fato esse que pode estar relacionado à duração de tratamento e a concentração do fármaco usada.

Estima-se que 50% dos pacientes parkinsonianos sofrem com transtornos do humor (ex: depressão; ansiedade) (Tandeberg, et al., 1996). Recentes estudos demonstraram que o uso em baixas doses e/ou rotas específicas de administração (ex: intranigral, intraestriatal, intranasal) de algumas toxinas amplamente utilizadas para induzir parkinsonismo experimental como o MPTP e a 6-OHDA podem induzir comportamentos do tipo-depressivo em roedores sem apresentar nenhum tipo de deficiência motora durante o tempo de avaliação (Tadaiesky et al., 2008; Moreira et al., 2010; Santiago et al., 2010). Moreira e colaboradores (2010) demonstrara que a infusão i.n. de MPTP (1 mg/narina) induz um comportamento do tipo depressivo em ratos, refletido por um tempo maior de imobilidade no teste de nado forçado, observado em 16 dias após a infusão do MPTP. Observamos que a administração 0,1 mg/narina de MPTP que representa uma dose 10 vezes menor, quando comparado àquela usada por Moreira e colaboradores (2010), não alterou significativamente o tempo de imobilidade avaliado no teste do nado forçado. Apesar desta limitação, (Ghasemi et al., 2009; Redrobe e Bourin, 1999), o pré-tratamento com Li e VPA reduziu significativamente o tempo de imobilidade dos animais *per se*, confirmando assim um perfil antidepressivo destes fármacos. Entretanto, não é possível ainda determinar o exato mecanismo de ação referente ao efeito neuroprotetor do Li e VPA apresentados ao longo do presente estudo. Porém, com base em estudos anteriores que abordam os efeitos neuroprotetores desses fármacos em modelos experimentais da DP, uma hipótese especulativa pode ser sugerida. Youdim e Arraf (2004) demonstraram que uma suplementação dietética com Li (1.1–4.4 g/kg) durante 4 semanas pode prevenir a perda dos níveis de dopamina no estriado, bem como de seus metabólitos DOPAC e HVA em ratos, após a administração i.p. de MPTP (24 mg/kg) uma vez ao dia, durante 3 dias. O

Li não interferiu no metabolismo do MPTP ou na sua captação cerebral (Youdim e Arraf, 2004). Sendo assim, é importante resaltar que estudos celulares e *in vivo* demonstraram que os efeitos neuroprotetores induzidos por Li são mediados através da regulação de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas, como por exemplo as proteínas das famílias Bcl-2 e Bax (Youdim e Arraf, 2004; Chuang e Chen, 2002; Chen e Chuang, 1999). Portanto, a atividade anti-apoptótica pode representar um importante mecanismo molecular referente à ação do Li em evitar os prejuízos comportamentais induzidos pela administração i.n. de MPTP, uma vez que identificamos a apoptose como um mecanismo de patogenicidade envolvido na neurodegeneração dopaminérgica no modelo do MPTP i.n. (Prediger et al., 2006, 2009, 2010). Além disso, Monti e colaboradores (2010) recentemente avaliaram os efeitos da administração na dieta de VPA (2% VPA) durante 4 semanas na degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal em rato induzida por uma administração subcrônica da toxina mitocondrial rotenona. Curiosamente, os autores demonstraram que tratamento com VPA previniu a morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc e a redução de 50% dos níveis de dopamina no estriado (Monti et al., 2010). Esses resultados corroboram com os resultados anteriores em que o VPA apresentou neuroproteção em modelos celulares de neurodegeneração na DP (Monti et al., 2007; Chen et al., 2006). Além disso, Kidd e Schneider (2011) recentemente publicaram um estudo demonstrando que o VPA co-administrado com MPTP durante 5 dias, e por um período adicional de 2 semanas após a última injeção de MPTP, foi capaz de reduzir parcialmente a depleção dos níveis de dopamina no estriado em ratos. Estes resultados sugerem que o VPA, bem como o Li, podem representar possíveis agentes terapêuticos para a DP. O efeito neuroprotetor do VPA pode estar ainda correlacionado com a inibição da atividade na desacetilação de histonas e com o aumento da acetilação de histonas na substância negra e córtex frontal (Kidd e Schneider, 2011), o que aumenta as possíveis interações na transcrição de vários fatores de transcrição que podem contribuir para a proteção dos neurônios dopaminérgicos após a exposição com MPTP.

No entanto, mais estudos envolvendo os efeitos motores, não motores e neuroquímicos são necessários para confirmar estas nossas hipóteses de estratégias de neuroproteção induzidas pelos estabilizadores de humor na DP.

### **Atorvastatina e MPTP**

No capítulo II do presente estudo demonstramos que a ATOR, um fármaco usado atualmente no tratamento diário de dislipidemias decorrentes da síntese do colesterol, apresenta um potencial efeito terapêutico sobre os prejuízos cognitivos, emocionais, motore induzidos pela administração i.n.

de MPTP. Nos últimos anos, um número crescente de estudos epidemiológicos vem abordando os efeitos das estatinas (ex: ATOR e sinvastatina) na DP. Um estudo recente relatou que o uso de estatinas está associado a uma baixa ocorrência da DP. Os autores demonstram que a elevação dos níveis de colesterol pode ser uma das causas etiológicas para o desenvolvimento da DP (Huang et al., 2007; Wahner et al., 2008). Gao e colaboradores (2012) publicaram recentemente um grande estudo prospectivo incluindo 38.192 homens e 90.874 mulheres nos EUA, e descreveram que o uso regular de estatinas foi associado com uma redução no risco de desenvolvimento da DP em participantes mais jovens, mas não entre os mais velhos. A associação observada entre o uso regular de estatinas e a redução do risco de desenvolvimento da DP corrobora com as descobertas recentes, demonstrando que as estatinas reduzem a neurodegeneração dopaminérgica observada em diversos modelos experimentais da DP (Ghosh et al., 2009; Hernández-Romero et al., 2008; Yan et al., 2011). A maioria dos efeitos pleiotrópicos das estatinas é provavelmente mediado pela inibição da enzima marca-passo do colesterol a HMG-CoA redutase, através da redução dos níveis intracelulares de mevalonato e outros intermediários de isoprenóides (Cucchiara e Kasner, 2001, Liao, 2002).

Observamos no presente estudo que os animais que receberam a infusão i.n. de MPTP (1 mg/narina) apresentaram um prejuízo na capacidade de reconhecer o rato jovem após um curto período de tempo. De maneira interessante, o tratamento com atorvastatina (10 mg/kg) por via oral durante 7 dias consecutivos foi capaz de prevenir os prejuízos de memória de reconhecimento social em ratos após a infusão de MPTP. Experimentalmente, a ATOR tem sido usada em 10 mg/kg para obter um efeito neuroprotetor máximo (Laufs et al., 2000), e clinicamente, a ATOR é bem tolerada até 80 mg/dia (Amarenco et al., 2006) sem promover efeitos tóxicos. Como já havia sido abordado, demonstramos que a infusão i.n. de MPTP (1 mg/narina) induziu um comportamento do tipo-depressivo em ratos, visualizado com o aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Este comportamento tipo-depressivo pode ser correlacionado com mudanças nos níveis de dopamina no estriado (Tadaiesky et al., 2008). A anedonia é geralmente considerada como um sintoma e não uma síndrome e assim, ser parte de uma síndrome de apatia, seguindo os critérios de Marin e colaboradores (1991). Neste momento, a definição mais popular descreve a anedonia como a “incapacidade de sentir prazer” (Snaith et al., 1995). Um pequeno estudo de anedonia em pacientes com DP não relatou nenhuma correlação significativa entre a função motora, apatia, depressão e performance cognitiva (Isella et al., 2003). A avaliação de anedonia em ratos após a infusão de MPTP não apresentou a mesma característica tipo-depressiva, demonstrada pelo aumento no tempo de imobilidade através do

teste de natação forçada. A possível resposta para compreender melhor essa diferença observada nos dois testes que correlacionam esse efeito do tipo depressivo, pode ser através da avaliação dos níveis de serotonina e dopamina nas regiões do estriado e hipocampo. Embora não foram observadas diferenças nos níveis de serotonina nas estruturas cerebrais investigadas após a infusão de MPTP em camundongos (Prediger et al., 2010), não podemos descartar a participação do sistema serotoninérgico em alterações emocionais, presente em animais após a infusão de MPTP. De fato, há evidências fisiopatológicas envolvendo alterações de serotonina em pacientes com depressão associadas a DP (Schrag, 2004), e uma "hipótese serotoninérgica" mesmo foi proposta para a depressão na DP (Moreira, 1990). Curiosamente, os dados clínicos indicam que o tratamento com estatinas está relacionado a uma redução na incidência de depressão e ansiedade (Young-Xu et al., 2003), embora os mecanismos de ação pelos quais esses efeitos são proeminentes não estejam estabelecidos ainda. Além disso, um recente estudo do nosso grupo demonstrou que o tratamento agudo com ATOR reduziu o tempo de imobilidade dos animais em relação ao prejuízo induzido pelo pré-tratamento com NMDA em camundongos, além de produzir um aumento nos níveis de BDNF no hipocampo. Esses efeitos demonstrados podem estar envolvidos com a modulação do sistema glutamatérgico, pois o uso de antagonistas do receptor NMDA (MK-801 e Ketamina) reduziu o tempo de imobilidade similar ao observado com ATOR no teste de suspensão pela cauda (Ludka et al., 2012).

Déficits motores significativos somente foram observados 21 dias após a administração i.n. de MPTP em ratos. Esse efeito a longo prazo na diminuição da atividade locomotora foi acompanhado por uma redução elevada (cerca de 70-80%) dos neurônios dopaminérgicos através da marcação com TH na SNpc. De maneira interessante, a administração de ATOR previniu a diminuição da imunorreatividade para a TH na SNpc após a infusão MPTP em ratos, corroborando sua ação neuroprotetora conforme descrito em vários modelos de dano neuronal (Cui et al., 2010; Piermartiri et al., 2009; 2010).

Estudos *in vivo* e *in vitro* que utilizam estatinas têm sugerido uma série de efeitos como: redução na acumulação de  $\alpha$ -sinucleína e estresse oxidativo, redução na expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2), redução na liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) e ativação do fator de transcrição nuclear - B (NF $\kappa$ -B), ativação do receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ) e regulação dos receptores de dopamina D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> no cérebro (Becker e Meier, 2009; Wang et al., 2011; Madeira et al., 2010).

Resumindo, esses resultados demonstram que as estatinas podem ser utilizadas como possíveis agentes terapêuticos na DP. No entanto, ainda é necessária uma investigação para esclarecer os exatos mecanismos

moleculares envolvidos com esse efeito induzido pela ATOR em ratos tratados com MPTP.

### **Atorvastatina e 6-OHDA**

No capítulo III, iniciamos a caracterização em fatias cerebrais de estriado, hipocampo e córtex de um modelo de toxicidade aguda induzida pela 6-OHDA *in vitro*. A 6-OHDA induz aumento na formação de ROS e redução na captação de glutamato e na viabilidade celular. Demonstramos que a ATOR é protetora contra os efeitos tóxicos induzidos 6-OHDA por um mecanismo de ação que envolve o sistema glutamatérgico.

Atualmente, com exceção das drogas antimuscarínicas, todas as drogas em uso clínico na DP têm demonstrado eficácia no modelo da 6-OHDA, apoiando sua validade preditiva. Por exemplo, L-DOPA e agonistas de dopamina utilizados clinicamente (bromocriptina, cabergolina, pergolide, pramipexoli, ropinirol e rotigotina) produzem rotações contralaterais semelhantes às descritas com a apomorfina (Johnson et al., 1976; Broekkamp et al., 1990; Eden et al., 1991; Mierau e Schingnitz, 1992; Fukuzaki et al., 2000; Prikhojan et al., 2000; Schmidt et al., 2008). A toxicidade induzida pela 6-OHDA em fatias de hipocampo, estriado e córtex foi demonstrada pela redução na viabilidade celular, bem como um aumento na formação de ROS nas mesmas regiões. A ATOR, o MK-801 e a associação dos dois compostos demonstraram efeitos semelhantes nas três regiões investigadas. Ambos os compostos não induziram toxicidade quando avaliados *per se* e em combinação com a neurotoxina 6-OHDA promoveram uma reversão na redução da viabilidade celular e uma redução na formação de ROS. Apesar de não realizarmos estudos de união de ATOR ao receptor NMDA, o fato de ATOR e MK-801 apresentarem o mesmo efeito protetor e a demonstração de que a atorvastatina interage com o receptor NMDA (Wang et al., 2008), sugere que a ação da ATOR possa ocorrer via antagonismo ao receptor NMDA. Considerando que este foi um estudo *in vitro*, é possível que mais um dos efeitos pleiotrópicos da ATOR seja uma interação direta com o receptor NMDA.

No entanto, a proteção celular não foi observada após a administração *in vivo* da ATOR. A 6-OHDA reduziu a viabilidade celular e a captação de GLU em fatias de estriado e hipocampo, confirmando seu efeito neurotóxico. O pré-tratamento com ATOR (10 mg/kg) durante 7 dias pela via oral não reverteu a redução na captação de GLU e na viabilidade celular. Porém, é importante que realizemos futuramente uma análise mais minuciosa no intuito de compreender os mecanismos de toxicidade e proteção dependentes e independentes dos receptores e transportadores de GLU. Evidências obtidas em modelos da DP em roedores e primatas não-humanos, demonstraram que antagonistas seletivos dos receptores NMDA e

AMPA podem minimizar muitos dos sintomas da DP (Greenamyre e Porter, 1994, Klockgether et al., 1991, Starr, 1995). Os efeitos neuroprotetores da ATOR mostrados por Piermatiri e colaboradores (2009) demonstram que o pré-tratamento com ATOR previne uma redução na captação de glutamato em fatias de hipocampo submetidas a infusão intracerebroventricular (i.c.v.) do ácido quinolinico, um agonista do receptor NMDA. No entanto, no estudo realizado por Piermatiri e colaboradores (2010), a ATOR promove uma proteção contra a neurodegeneração induzida por uma infusão i.c.v. de  $\beta$ -amilóide 1–40, atenuando a astrogliose no hipocampo, a peroxidação lipídica e o aumento da expressão de COX-2 e dos transportadores de glutamato gliais (GLAST e GLT1), porém, a ATOR não previne a redução na captação de glutamato induzida pelo peptide  $\beta$ -amilóide. Existem muitas evidências clínicas e experimentais para os efeitos protetores das estatinas a nível de tecidos periféricos, tais como anti-inflamatórios, anti-trombóticos, vasculares e imunomoduladores, mas os efeitos neuroprotetores ainda não são conhecidos em detalhe (Endres e Laufs, 2004, Liao, 2002). A ATOR reduziu a morte de células estriatais em um modelo de neurodegeneração induzido pela administração crônica de ácido 3-nitropropiónico (3-NIP), uma toxina mitocondrial (Lee et al., 2008). As lesões induzidas pela 6-OHDA no feixe medial do prosencéfalo iniciam a degeneração do sistema dopaminérgico e afetam sobretudo os receptores de dopamina D1 e D2 no córtex pré-frontal. O pré-tratamento com simvastatina por 4 semanas (10 mg/kg/dia) restaurou os níveis de expressão dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (Wang et al., 2005). Portanto, as propriedades anti-inflamatórias das estatinas podem ser úteis evitando a ativação da microglia e ainda modulando negativamente a transmissão glutamatérgica de forma a evitar a perda de neurônios dopaminérgicos.

### **Modulação de receptores adenosinérgicos e MPTP**

Os resultados obtidos no capítulo IV deste estudo demonstram que o bloqueio farmacológico (através do tratamento crônico com o antagonista seletivo dos receptores A<sub>2A</sub>, SCH58261, na dose de 0,3 mg/kg, i.p.) ou a deleção gênica dos receptores A<sub>2A</sub> para ADO, é capaz de prevenir os prejuízos nas memórias de curto prazo e de procedimento, bem como a morte de neurônios dopaminérgicos induzidos pela administração i.n. de MPTP em camundongos. Porém, a manipulação farmacológica ou gênica dos receptores A<sub>2A</sub> para ADO não foi capaz de prevenir os déficits olfatórios induzidos pelo MPTP.

Atualmente, as estratégias farmacoterapêuticas para o tratamento da DP visam restaurar os níveis de dopamina através do uso de um precursor (levodopa) e/ou agonistas dos receptores (pramipexol, bromocriptina, ropirinol) da dopamina, e inibidores da degradação

enzimática de dopamina (inibidores da MAO-B: selegilina e rasagilina; inibidores da COMT: tolcapone e a entacapone). Estas drogas, que interferem principalmente com sintomas motores, apresentam, ao menos, duas limitações importantes: efeitos colaterais a longo prazo (em particular, flutuações motoras, incluindo discinesias e movimentos “liga-desliga”) e incapacidade de interromper ou retardar o processo degenerativo em curso. Já foi observado que o bloqueio farmacológico ou gênico dos receptores  $A_{2A}$  para ADO reduz a perda de células dopaminérgicas e a depleção de dopamina estriatal em modelos experimentais da DP (Chen, et al. 2001; Ikeda, et al. 2002; Pierri, et al. 2005).

A degeneração da via dopaminérgica nigroestriatal promove uma depleção de dopamina estriatal, que consequentemente prejudica a função dos circuitos nos núcleos da base produzindo ascinesia, bradicinesia, tremor e rigidez (Singh et al., 2007). A ADO exerce seus efeitos nos gânglios da base, agindo através dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ . Os receptores  $A_{2A}$  são co-localizados e funcionalmente interagem com os receptores  $D_2$  para dopamina em neurônios. Além disso, os receptores  $A_{2A}$  também interagem negativamente com os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Gerevich et al., 2002; Nereberg et al., 1997). Resultados obtidos em modelos experimentais da DP, demonstram que antagonistas seletivos dos receptores  $A_{2A}$  previnem a neurodegeneração dopaminérgica induzida pelo MPTP em roedores (Carta et al., 2009; Huang et al., 2006), inibindo a ativação astrogliar e microglial (Ikeda et al., 2002; Pierri et al., 2005). De maneira interessante, camundongos que não expressam os receptores  $A_{2A}$  apresentam uma reduzida astrogliose e microgliose (usados como marcadores de neuroinflamação) após a administração repetida de MPTP pela via i.p. (Carta et al., 2009).

Trabalhos prévios da literatura indicam que a administração da cafeína, um antagonista não seletivo dos receptores para ADO, previne a degeneração induzida pelo MPTP nos terminais dopaminérgicos do estriado (Chen et al., 2001; Ikeda, et al. 2002; Xu et al., 2002). Além disso, a deleção gênica dos receptores  $A_{2A}$  previne os prejuízos motores e perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra de camundongos tratados com o MPTP pela via i.p. (Chen et al., 2001). Em adição, a inibição dos receptores  $A_{2A}$  expressos em células gliais também está envolvida em mecanismos de neuroproteção (Xu et al., 2002). O mecanismo exato pelo qual o bloqueio dos receptores  $A_{2A}$  exerce a neuroproteção na DP não foi esclarecido. No entanto, a ativação da microglia tem sido mostrada como um fator primordial no processo neurodegenerativo da DP (Meredith et al., 2005), e o bloqueio microglial em ratos protege neurônios dopaminérgicos da toxicidade aguda do MPTP (Teismann e Fergert, 2001; Wu et al., 2002).

Antagonistas dos receptores  $A_{2A}$  melhoram a função motora em diferentes modelos de DP em roedores e primatas, quando administrados

isoladamente ou co-administrados com drogas dopaminérgicas, levodopa ou agonistas dopaminérgicos (Fenu, et al. 1997; Kanda, et al. 1998; Shiozaki, et al. 1999; Koga, et al. 2000; Hauber, et al. 2001). Quando administrados após o início das discinesias, induzidas pela levodopa, os antagonistas do receptor  $A_{2A}$  auxiliam na melhora dos sintomas motores e não pioram as discinesias (Kanda, et al. 1998; Grondin, et al. 1999; Kanda, et al. 2000; Jenner, 2003; Lundblad, et al. 2003). Xiao e colaboradores (2011) demonstraram em camundongos com lesão unilateral induzida por 6-OHDA que a deleção gênica e o bloqueio farmacológico com antagonistas de receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  reduzem o risco de desenvolvimento de discinesias induzidas por L-DOPA. Estes efeitos foram confirmados em um recente estudo de clínico de coorte, no qual foi observada uma redução no desenvolvimento de discinesias após o consumo de cafeína (Wills, et al., 2013).

Estudos pré-clínicos com istradefilina (um antagonista seletivo dos receptores  $A_{2A}$ ) tem demonstrado um controle no desenvolvimento de discinesias induzidas por agonistas dopaminérgicos (Bibiane et al., 2003). Adicionalmente, a co-administração de istradefilina com baixas doses de levodopa potencializa a melhora motora, sem prejudicar a discinesia (Bara-Jimenez, et al. 2003). Estudos clínicos envolvendo pacientes em esquemas terapêuticos de baixa dose de levodopa são necessários para esclarecer o potencial adjuvante dos antagonistas do receptor  $A_{2A}$ , uma vez que a maioria dos resultados foram avaliados em pacientes sob doses de levodopa ideal e podem minimizar o potencial terapêutico dos antagonistas dos receptores  $A_{2A}$  (para revisão, ver Morelli, Carta, Jenner, 2009). Chen et al. (2013) realizaram recentemente um estudo randomizado onde foram comparados o uso de istradefilina com placebo em pacientes parkinsonianos que utilizavam levodopa e apresentavam discinesias. Foi demonstrado que o uso de istradefilina se mostrou eficaz como um tratamento adjuvante ao uso de levodopa.

O alívio sintomático por antagonistas dos receptores para ADO em pacientes com a DP pode ser facilmente entendido a partir da interação funcional de ADO-dopamina. Além disso, antagonistas dos receptores adenosinérgicos  $A_1$  e  $A_{2A}$  podem ser utilizados tanto nos estágios iniciais da DP, como em estágios avançados devido a existência de interações específicas entre  $A_1$  e  $D_1$  e entre  $A_{2A}$  e  $D_2$  (Ferré et al., 2001). A colocalização dos receptores adenosinérgicos  $A_{2A}$  e dos receptores dopaminérgicos  $D_2$  nos neurônios estriato-palidais fornece uma base anatômica para a existência de uma boa interação funcional entre estes receptores (Pinna et al., 2005). A primeira evidência bioquímica de uma interação entre receptores  $A_{2A}$  e  $D_2$  foi observada por Ferré e colaboradores (2001) as quais mostraram que a estimulação dos receptores adenosinérgicos  $A_{2A}$  diminuem a afinidade dos receptores dopaminérgicos



D<sub>2</sub>. A interação A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> parece ser mais potente no estriado sem inervação dopaminérgica e com os receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> supersensibilizados (Ferré et al., 1992).

No entanto, é importante notar que a neurodegeneração após a infusão de MPTP é reduzida com o uso de antagonistas dos receptores A<sub>2A</sub>, bem como em camundongos com deleção gênica deste receptor (Chen et al., 2001). Em conjunto, estes resultados indicam o potencial dos receptores A<sub>2A</sub> para ADO como um alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DP.

Portanto, os resultados do presente estudo demonstram que a ação de novos compostos com caráter neuroprotetores (lítio, valproato, atorvastatina e bloqueio dos receptores A<sub>2A</sub> para adenosina) apresentam um potencial efeito neuroprotetor na prevenção de prejuízos cognitivos, emocionais e motores induzidos pela administração i.n. de MPTP, consolidando ainda mais a utilização deste modelo para a investigação de novos tratamentos para a DP. Além disto, realizamos a padronização de um modelo *in vitro* de toxicidade aguda induzida pela 6-OHDA em fatias cerebrais, sendo esse modelo também uma possível ferramenta eficaz na utilização de novas estratégias de neuroproteção na DP. Estes resultados confirmam e estendem a importância da busca e do desenvolvimento de novas ferramentas e estratégias que ajudem a minimizar os efeitos motores e não motores presentes na DP. Além disso, os nossos resultados sugerem o que os efeitos de neuroproteção encontrados a partir destes novos compostos podem estar envolvidos com três amplos sistemas de neurotransmissão: o glutamatérgico, adenosinérgico e dopaminérgico. Sendo assim, os resultados do presente estudo nos encorajam a realizar novos estudos para investigar os valores terapêuticos destas substâncias avaliadas, e também buscar uma melhor padronização do modelo *in vitro* da DP, recentemente iniciado.

## 6. CONCLUSÕES

O pré-tratamento com Li (47,5 mg/kg, i.p.) e VPA (200 mg/kg, i.p.) durante 7 dias previne os prejuízos induzidos pela administração i.n. de MPTP (0,1 mg/narina) nos testes de discriminação olfatória, memória social e esQUIVA inibitória (memória de curto prazo), além de prevenir a deleção nos níveis de dopamina no bulbo olfatório e estriado.

O pré-tratamento com ATOR (10 mg/kg, v.o.) durante 7 dias previne os déficits induzidos pela administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) nos testes de memória social, nado forçado (avaliação de efeito tipo-antidepressivo) e atividade locomotora, além de prevenir a redução na expressão da enzima tirosina hidroxilase na substância negra.

A incubação de 6-OHDA *in vitro* induz redução da viabilidade celular em fatias estriatais, hipocâmpais e corticais, acompanhada de um aumento na formação de espécies reativas do oxigênio e redução na captação de glutamato.

A ATOR (*in vitro*, 10  $\mu$ M) apresenta um efeito neuroprotetor similar ao antagonista do receptor NDMA para glutamato, MK-801, prevenindo a redução de viabilidade celular e a formação de espécies reativas do oxigênio após a indução de toxicidade *in vitro* pela 6-OHDA em fatias cerebrais.

O antagonista de receptores A<sub>2A</sub> para adenosina (SCH58261, 0,3 mg/kg, i.p.), ou a deleção gênica do receptor A<sub>2A</sub> em camundongos, previne os déficits induzidos pela administração i.n. de MPTP nos testes de discriminação olfatória, memória social, realocação do objeto (memória de curto prazo), labirinto aquático versão de procedimento e rota rod (memória de procedimento), além de prevenir a redução da expressão da enzima tirosina hidroxilase na substância negra e estriado.

## 7. PERSPECTIVAS

Investigar se o pré-tratamento com Li, VPA, ou ATOR previne a formação de neuroinflamação e EROs após a infusão de MPTP.

Investigar se o pré-tratamento com Li, VPA, e ATOR pode modular a expressão de transportadores de glutamato (GLAST e GLT-1) e dopamina (DAT) após a infusão de MPTP.

Investigar se existe uma interação entre receptores de glutamato e adenosina após a infusão de MPTP.

Investigar se o pré-tratamento com Li, VPA, ou ATOR previne os efeitos induzidos pela 6-OHDA *in vivo*, após a sua administração intraestriatal em ratos.

Investigar se os antagonistas de adenosina previnem os efeitos induzidos pela 6-OHDA *in vitro*.

**REFERÊNCIAS**

ALBERS MW, TABERT MH, DEVANAND DP. Olfactory dysfunction as a predictor of neurodegenerative disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 6: 379-386; 2006.

ALTSCHULER E. Aluminum-containing antacids as a cause of idiopathic Parkinson's disease. *Med. Hypotheses.* 53: 22-23, 1999.

ALVAREZ G, MUÑOZ-MONTAÑO JR, SATRÚSTEGUI J, AVILA J, BOGÓNEZ E, DÍAZ-NIDO J. Lithium protects cultured neurons against beta- amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 453(3): 260-4, 1999.

AMARENCO P, BOGOUSSLAVSKY J, CALLAHAN A, GOLDSTEIN LB, HENNERICI M, RUDOLPH AE, SILLESEN H, SIMUNOVIC L, SZAREK M, WELCH KM, ZIVIN JA; STROKE PREVENTION BY AGGRESSIVE REDUCTION IN CHOLESTEROL LEVELS (SPARCL) INVESTIGATORS. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med.* 2006;355:549-59.

AMIN-HANJANI S, STAGLIANO NE, YAMADA M, HUANG PL, LIAO JK, MOSKOWITZ MA. Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke.* 32:980-6, 2001.

AMPUERO I, VIDAL L, HOENICKA J, RODRIGUEZ O, ATARES B, LLORENS V, TORTOSA EG, DEL SER T, MUNOZ, DG, DE YEBENES JG. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55: 164-173, 2004.

ARAI N, MISUGI K, GOSHIMA Y, MISU Y. Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for parkinsonism. *Brain Res.* May 7; 515(1-2):57-63, 1990.

ARAKI T, MIKAMI T, TANJI H, MATSUBARA M, IMAI Y, MIZUGAKI M, ITOYAMA Y. Biochemical and immunohistological changes in the brain of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mouse. *Eur J Pharm Sci.* Jan12 (3):231-8, 2001.

ARNIN-HANJANI, S; STAGLIANO, NE; YAMADA, M; HUANG, PL; LIAO, JK; MOSKWITZ, MA; Mevastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Reduces Stroke Damage and Upregulates Endothelial Nitric Oxide Synthase in Mice. *Stroke.* 32: 980-986, 2001.

ASCHERIO A, ZHANG SM, HERNÁN MA, KAWACHI I, COLDITZ GA, SPEIZER FE, WILLETT WC. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women *Ann Neurol* 50, 56–63, 2001.

ASSINI FL, DUZZIONI, M, TAKAHASHI, RN. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav Brain Research*, v.204, p.206-11. 2009.

BALLARD PA, TETRUD JW, LANGSTON JW. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*. Jul; 35(7):949-56, 1985.

BANDMANN O, MARSDEN CD, WOOD NW. Genetic aspects of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 13: 203-211, 1998.

BARA-JIMENEZ W, SHERZAI A, DIMITROVA T, FAVIT A, BIBBIANI F, GILLESPIE M, MORRIS MJ, MOURADIAN MM, CHASE TN. Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease, *Neurology* 61; 293–296, 2003.

BARRIO JR, HUANG SC, PHELPS ME. Biological imaging and the molecular basis of dopaminergic diseases. *Biochem. Pharmacol.* 54: 341–348; 1997.

BATTAGLIA G, BUSCETI CL, MOLINARO G, BIAGIONI F, STORTO M, FORNAI F, NICOLETTI F, BRUNO V. Endogenous activation of mGlu5 metabotropic glutamate receptors contributes to the development of nigro-striatal damage induced by 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *J Neurosci.* 24: 828-35, 2004.

BATTAGLIA G, BUSCETI CL, PONTARELLI F, BIAGIONI F, FORNAI F, PAPARELLI A, BRUNO V, RUGGIERI S, NICOLETTI F. Protective role of group-II metabotropic glutamate receptors against nigro-striatal degeneration induced by 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6- tetrahydropyridine in mice. *Neuropharmacology*; 45: 155-66, 2003.

BEAL MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nature Rev Neurosci.* 2, 325-334; 2001.

BECKER G, MULLER A, BRAUNE S, BUTTNER T, BENECKE R, GREULICH W, KLEIN W, MARK G, RIEKE J, THUMLER R. Early diagnosis of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 249 (Suppl. 3): 40-48, 2002.

BERENDSE HW, BOOIJ J, FRANCOY CM, BERGMANS PL, HIJMAN R, STOOFF JC, WOLTERS EC. Subclinical dopaminergic dysfunction in asymptomatic Parkinson's disease patients' relatives with a decrease sense of smell. *Ann. Neurol.* 50: 34-41, 2001.

BERGER K, PRZEDBORSKI S, CADET JL. Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. *Brain Res Bull.* 26: 301-7, 1991.

BIAN Q, SHI T, CHUANG DM, QIAN Y. Lithium reduces ischemia-induced hippocampal CA1 damage and behavioral deficits in gerbils. *Brain Research* 1184: 270-6; 2007.

BIBBIANI F, OH JD; PETZER JP, CASTAGNOLI NJR, CHEN JF, SCHWARZSCHILD MA, CHASE TN. A2A antagonist prevents dopamine agonist-induced motor complications in animal models of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 184, 285-294, 2003.

BIJUR GN, DE SARNO P, JOPE RS. Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Facilitates Staurosporine and Heat Shock-induced Apoptosis: protection by lithium. *Journal of Biological Chemistry.* 275: 7583-90; 2000.

BLADINI F, ARMENTERO MT, MARTIGNONI E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism. Relat Disord.* 14, 124-129, 2008.

BLANDINI F, ARMENTERO MT, MARTIGNONI E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord.* 14 Suppl 2:S124-9, 2008.

BLANDINI F, NAPPI G, TASSORELLI C, MARTIGNONI E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 62: 63 - 88, 2000.

BONIFATI V, RIZZU P, VAN BAREN MJ, SCHAAP O, BREEDVELD GJ, KRIEGER E, DEKKER MC, SQUITIERI F, IBANEZ P, JOOSSE M, VAN DONGEN, JW, VANACORE N, VAN SWIETEN JC, BRICE A, MECO G, VAN DUIJN CM, OOSTRA BA, HEUTINK P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299: 256- 259, 2003.

BOSBOOM JL, STOFFERS D, WOLTERS E. Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 111:1303-15, 2004.

BOSEL J, GANDOR F, HARMS C, SYNOWITZ M, HARMS U, DJOUFACK PC, MEGOW D, DIRNAGL U, HÖRTNAGL H, FINK KB, ENDRES M. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem.* 2005;92:1386-98.

BOURIN M, CHENU F, RIPOLL N, DAVID DJP. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. *Behav. Brain Res.* v. 164, p. 266-269, 2005.

BRAAK H, BOHL JR, MULLER CM, RUB U, DE VOS RA, DEL TREDICI K., Stanley Fahn Lecture 2005: the staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord.* 21: 2042–51; 2006.

BRAAK H, GHEBREMEDHIN E, RUB U, BRATZKE H, DEL TREDICI K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 318: 121–134; 2004.

BREYSSE N, BAUNEZ C, SPOOREN W, GASPARINI F, AMALRIC M. Chronic but not acute treatment with a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist reverses the akinetic deficits in a rat model of parkinsonism. *J Neurosci.* 22: 5669-78, 2002.

BROEKKAMP CL, DE GRAAF JS, VAN DELFT AM. Behavioural pharmacology of trans-5-chloro-2-methyl-2,3,3a,12b-tetrahydro-1H-dibenz[2,3:6,7]oxepino-[4,5c] pyrrolidine maleate, a compound interacting with dopaminergic and serotonergic receptors. *Arzneimittelforschung* 40: 544–549, 1990.

BROWN RM, SHORT JL. Adenosine A(2A) receptors and their role in drug addiction. *J Pharm Pharmacol*, v. 60, n. 11, p. 1409-30, Nov 2008.

BUCHER HC, GRIFFITH LE, GUYATT GH. Systematic review on the risk and benefit of different cholesterol-lowering interventions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*19:187-95, 1999.

BURN DJ, MARK MH, PLAYFORD ED, MARAGANORE DM, ZIMMERMAN TR, DUVOISIN RC, HARDING AE, MARSDEN CD, BROOKS DJ. Parkinson's disease in twins studied with <sup>18</sup>F-DOPA and positron tomography. *Neurology*, 42: 1894-1900, 1992.

BURNS RS, CHIUEH CC, MARKEY SP, EBERT MH, JACOBOWITZ DM, KOPIN IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of

dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jul; 80(14):4546-50, 1983.

CADET JL, LAST R, KOSTIC V, PRZEDBORSKI S, JACKSON-LEWIS V. Long-term behavioral and biochemical effects of 6-hydroxydopamine injections in rat caudate-putamen. *Brain Res Bull*; 26:707–13, 1991.

CANAS, PM, PORCIÚNCULA LO, CUNHA GM, SILVA CG, MACHADO NJ, OLIVEIRA JM, OLIVEIRA CR, CUNHA RA. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci*, v.29, n.47, p.14741- 51, Nov 2009.

CARDOSO SM, MOREIRA PI, AGOSTINHO P, PEREIRA C, OLIVEIRA CR. Neurodegenerative pathways in Parkinson's disease: therapeutic strategies. *Curr Drug Targets CNS Neurolog Disord* 4: 405–419; 2005.

CARTA AR, KACHROO A, SCHINTU N, XU K, SCHWARZSCHILD MA, WARDAS J, MORELLI M. Inactivation of neuronal forebrain A receptors protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 111(6):1478-89. Epub Oct 8, 2009.

CHAUDHURI KR, HEALY DG, SCHAPIRA AH. National Institute for Clinical Excellence. *Lancet Neurol* 5, 235-245, 2006.

CHEN JF, XU K, PETZER JP, STAAL R, XU YH, BEILSTEIN M.,SONSALLA PK, CASTAGNOLI K, CASTAGNOLI N JR, SCHWARZSCHILD MA. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J. Neurosci*. 21, RC143, 2001.

CHEN JF. The adenosine A(2A) receptor as an attractive target for Parkinson's disease treatment. *Drug News Perspect*. 16, 597–604, 2003.

CHEN L, HAUGHT WH, YANG B, SALDEEN TGP, PARTHASARATHY S, MEHTA JL. Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. *J. Am. Coll. Cardiol*. 30: 569-575, 1997.

CHEN PS, PENG GS, LI G, YANG S, WU X, WANG CC, WILSON B, LU RB, GEAN PW, CHUANG DM, HONG JS. Valproate protects

dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. *Mol Psychiatry*.11:1116–25, 2006.

CHEN RW, CHUANG DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem* 274:6039–42,1999.

CHEN W, WANG H, WEI H, GU S, WEI H. Istradefylline, an adenosine A(2A) receptor antagonist, for patients with Parkinson's Disease: A meta-analysis. *J.Neurol Sci*. Jan 15;324 (1-2):21-8., 2013.

CHIN MH, QIAN WJ, WANG H, PETRYUK VA, BLOOM JS, SFORZA DM, LACÁN G, LIU D, KHAN AH, CANTOR RM, BIGELOW DJ, MELEGA WP, CAMPND DG, SMITH RD, SMITH DJ. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis revealed by proteomic and transcriptomic analyses of the striata in two mouse models of Parkinson's disease. *J. Proteome Res*. 7, 666–677, 2008.

CHIUEH CC, MARKEY SP, BURNS RS, JOHANNESSEN JN, JACOBOWITZ DM, KOPIN IJ. Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) in rat, guinea pig, and monkey. *Psychopharmacol Bull*. Summer;20(3):548-53, 1984.

CHOI DW. Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. *J. Neurosci*. 7(2): 369-379, 1987.

CHUANG DM, CHEN RW, CHALECKA-FRANASZEK E, REN M, HASHIMOTO R, SENATOROV V, KANAI H, HOUGH C, HIROI T, LEEDS P. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord*. 4:129–36, 2002.

COLLOCA L, LOPIANO L, LANOTTE M, BENEDETTI F. Overt versus covert treatment for pain; anxiety; and Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 11; 679-684, 2004.

CORTI C, BATTAGLIA G, MOLINARO G, RIOZZI B, PITTALUGA A, CORSI M, MUGNAINI M, NICOLETTI F, BRUNO V. The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/ neuroprotection. *J Neurosci*; 27: 8297-308, 2007.

COSTA A, PEPPE A, DELL'AGNELLO G, CARLESIMO GA, MURRI L, BONUCCELLI U, CALTAGIRONE C. Dopaminergic modulation of visual



spatial working memory in Parkinson's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord*, 15: 55-66, 2003.

CRUCIAN GP, OKUN MS, Visual-spatial ability in Parkinson's disease. *Front. Biosci*. 8: s992-997, 2003.

CRYAN JF, MOMBÉREAU C, VASSOUT A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, n. 29, p. 571-625, 2005.

CUCCHIARA B, KASNER SE. Use of statins in CNS disorders. *J Neurol Sci*.187:81-9, 2001.

CUMMINGS JL, MASTERMAN DL. Depression in patients with Parkinson's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*; 14: 711-8, 1999.

CUMMINGS JL. Depression and Parkinson's disease: a review. *Am. J. Psychiatry*. 149: 443-454, 1992.

CUNHA, RA, FERRÉ S, VAUGEOIS JM, CHEN JF. Potential therapeutic interest of adenosine A2A receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des*, v. 14, n. 15, p. 1512-24, 2008.

CUNHA, RA, JOHANSSON B, FREDHOLM BB, RIBEIRO JA, SEBASTIÃO AM. Adenosine A2A receptors stimulate acetylcholine release from nerve terminals of the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, v. 196, n. 1-2, p. 41-4, Aug 18 1995.

CUNHA, RA, JOHANSSON B, VAN DER PLOEG I, SEBASTIÃO AM, RIBEIRO JA, FREDHOLM BB. Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus. *Brain Res*, v. 649, n. 1-2, p. 208-16, Jun 27 1994.

CUTSURIDIS V, PERANTONIS S. A neural network model of Parkinson's disease bradykinesia. *Neural Netw*. May; 19(4): 354-74; 2006.

DAIMON M, AOMI S, KAWAMATA T, KUROSAWA H, Pravastatin, a 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, reduces delayed neuronal death following transient forebrain ischemia in the adult rat hippocampus. *Neurosci. Lett*. 362: 122-126, 2004.

DANIEL SE, HAWKES CH. Preliminary diagnosis of Parkinson's disease using olfactory bulb pathology. *Lancet* 18: 186, 1992.

DANTZER R, BLUTHE RM, KOOB GF, LE MOAL M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophysial peptides. *Psychopharmacology* 91, 363–368, 1987.

DASH PK, ORSI SA, ZHANG M, GRILL RJ, PATI S, ZHAO J, MOORE AN. Valproate administered after traumatic brain injury provides neuroprotection and improves cognitive function in rats. *PLoS ONE* 5:e11383, 2010.

DAUER W, PRZEDBORSKI S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. Sep 11;39(6):889-909. Review, 2003.

DAVIS GC, WILLIAMS AC, MARKEY SP, EBERT MH, CAINE ED, REICHERT CM, KOPIN IJ. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res*. Dec;1(3): 249-54, 1979.

DAVIS LE, ADAIR JC. Parkinsonism from methanol poisoning: benefit from treatment with anti-Parkinson drugs. *Mov. Disord*. 14: 520-522, 1999.

DAWSON TM. New animal models for Parkinson's disease. *Cell*. 101: 115-118; 2000.

DEKOSKY ST. Statin therapy in the treatment of Alzheimer disease: what is the rationale? *Am. J. Med*. 118(Suppl. 12A), 48– 53, 2005.

DELLU F, MAYO W, CHERKAoui J, LE MOAL M, SIMON H. A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. *Brain Res*, v.588, n.1, p.132-9, Aug 1992.

DI NAPOLI P, TACCARDI AA, OLIVER M, DE CATERINA R. Statins and stroke: evidence for cholesterol-independent effects. *Eur Heart J*. 23:1908-21, 2002.

DIAZ-CABIALE Z, HURD Y, GUIDOLIN D, FINNMAN UB, ZOLI M, AGNATI LF, VANDERHAEGHEN JJ, FUXE K, FERRE S. Adenosine A2A agonist CGS 21680 decreases the affinity of dopamine D2 receptors for dopamine in human striatum. *NeuroReport*, 12: 1831–1834, 2001.

DIXON, AK, GUBITZ AK, SIRINATHSINGHJI DJ, RICHARDSON PJ, FREEMAN TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol*, v. 118, n. 6, p. 1461-8, Jul 1996.

DLUZEN DE, KEFALAS G. The effects of intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) upon catecholamine concentrations within olfactory bulbs and corpus striatum of male mice. *Brain Res.* Nov 25;741(1-2):215-9, 1996.

DLUZEN DE, KREUTZBERG JD. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) disrupts social memory/recognition processes in the male mouse. *Brain Res* 1993;609:98–102.

DOTY RL, BROMLEY SM, STERN M. Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. *Neurodegeneration*, 4: 93–97, 1995.

DOTY RL, DEEMS D, STELLAR S. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease: A general deficit unrelated to neurologic signs, disease state, or disease duration. *Neurology*, 38: 1237–1244, 1988.

DOTY RL, RISSER JM. Influence of the D2 dopamine receptor agonist quinpirole on the odor detection performance of rat before and after spiperone administration. *Psychopharmacology*. 98:310–5, 1989.

DOTY RL, SHAMAN P, DANN M. Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test: a standardized microencapsulated test of olfactory function. *Physiol. Behav.* 32: 489-502, 1984.

DUBOIS B, PILLON B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 244, 2–8; 1997.

DUVOISAN RC. Genetics of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 45: 307-312, 1987.

EDEN RJ, COSTALL B, DOMENEY AM, GERRARD PA, HARVEY CA, KELLY ME, NAYLOR RJ, OWEN DA, WRIGHT A. Preclinical pharmacology of ropinirole (SK&F 101468-A) a novel dopamine D2 agonist. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 147–154, 1991.

EMRE M. Dementia in Parkinson's disease: cause and treatment. *Curr. Opin. Neurol.* 17: 399-404, 2004.

ENDRES M, LAUFS U, HUANG Z, NAKAMURA T, HUANG P, MOSKOWITZ M A, LIAO JK. Stroke protection by 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8880-8885, 1998.

ENDRES M, LAUFS U. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke*. 35:2708-11, 2004.

ENNACEUR A, NEAVE N, AGGLETON JP. Spontaneous object recognition and object location memory in rats, the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res*. v.113, p.509–19. 1997.

FALL PA, FREDRIKSON M, AXELSON O, GRANERUS AK. Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden. *Mov. Disord*. 14: 28-37, 1999.

FARACO G, PANCANI T, FORMENTINI L, MASCAGNI P, FOSSATI G, LEONI F, et al. Pharmacological inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene expression and reduces ischemic injury in the mouse brain. *Mol Pharmacol*. 70:1876–84, 2006.

FENU S, PINNA A, ONGINI E, MORELLI M. Adenosine A2A receptor antagonism potentiates L-DOPA-induced turning behaviour and c-fos expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats, *Eur. J. Pharmacol*. 321; 143–147, 1997.

FERRARO FR, BALOTA DA, CONNOR LT. Implicit memory and the formation of new association in nondemented Parkinson's disease individuals and individuals with senile dementia of the Alzheimer type: a serial reaction time (SRT) investigation. *Brain Cogn*. 21: 163-180, 1993.

FERRÉ S, BORYCZ J, GOLDBERG SR, HOPE BT, MORALES M, LLUIS C, FRANCO R, CIRUELA F, CUNHA R. Role of adenosine in the control of homosynaptic plasticity in striatal excitatory synapses. *J Integr Neurosci*, v. 4, n. 4, p. 445-64, Dec 2005.

FERRÉ S, CIRUELA F, QUIROZ C, LUIÁN R, POPOLI P, CUNHA RA, AGNATI LF, FUXE L, WOODS AS, LLUIS C, FRANCO R. Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *ScientificWorld Journal*. 2;7:48-57, 2007.

FERRÉ S, FREDHOLM BB, MOELLI M, POPOLI P, FUXE K. Adenosinedopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci*. 20: 482-487, 1997.

FERRÉ S, POPOLI P, GIMÉNEZ-LLORT L, RIMONDINI R, MÜLLER CE, STRÖMBERG I, OGREN SO, FUXE K. Adenosine/dopamine

interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 7: 235-241, 2001.

FLOWERS KA, PEARCE I, PEARCE JMS. Recognition memory in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 47: 1174-1181, 1984.

FORNO LS, DELANNEY LE, IRWIN I, LANGSTON JW. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol.* 1993;60:600-8.

FRANCO J, PREDIGER RD, PANDOLFO P, TAKAHASHI RN, FARINA M, DAFRE AL. Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb. *Life Sci.* Apr 24;80(20):1906-14, 2007.

FRANCO R, FERRE S, AGNATI L, TORVINEN M, GINES S, HILLION J, CASADO V, LLEDO P, ZOLI M, LLUIS C, FUXE K. Evidence for adenosine/dopamine receptor interaction: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology*, 23 (Suppl. 4): S50-59, 2000.

FREDHOLM BB. Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacol. Toxicol.* 76: 228-239, 1995.

FREDHOLM, BB, IJZERMAN AP, JACOBSON KA, KLOTZ KN, LINDEN J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, v. 53, n. 4, p. 527-52, Dec 2001.

FREY BN, MARTINS MR, PETRONILHO FC, DAL-PIZZOL F, QUEVEDO J, KAPCZINSKI F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disorders* 8: 275-280; 2006a.

FREY BN, VALVASSORI SS, RÉUS GZ, MARTINS MR, PETRONILHO FC, BARDINI K, DAL-PIZZOL F, KAPCZINSKI F, QUEVEDO J, Effects of lithium and valproate on amphetamine induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *Rev Psychiatry and Neuroscience* 31(5); 2006b.

FUKUZAKI K, KAMENOSONO T, NAGATA R. Effects of ropinirole on various Parkinsonian models in mice, rats, and cynomolgus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 503-508, 2000.

FUXE K, FERRE S, ZOLI M, AGNATI, LF. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res. Rev.*, 26: 258-273, 1998.

GARCIA-ROMAN N, ALVAREZ AM, TORO MJ, MONTES A, LORENZO MJ. Lovastatin induces apoptosis of spontaneously immortalized rat brain neuroblasts: involvement of nonsterol isoprenoid biosynthesis inhibition. *Mol Cell Neurosci.*17:329-41, 2001.

GARVER DL, CEDARBAUM J, MAAS JW. Blood-brain barrier to 6-hydroxydopamine: uptake by heart and brain. *Life Sci.* 17:1081-4, 1975.

GEREVICH Z, WIRKNER K, ILLES P. Adenosine A2A receptors inhibit the N-methyl-D-aspartate component of excitatory synaptic currents in rat striatal neurons. *Eur. J. Pharmacol.*; 451, 161- 164, 2002.

GERLACH M, RIEDERER P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural Transm.* 103: 987-1041, 1996.

GHASEMI M, SADEGHIPOUR H, POORHEIDARI G, DEHPOUR AR. A role for nitrenergic system in the antidepressant-like effects of chronic lithium treatment in the mouse forced swimming test. *Behav Brain Res.* 200:76-82, 2009.

GHOSH A, ROY A, LIU X, KORDOWER JH, MUFSON EJ, HARTLEY DM, and others. Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(47): 18754-9, 2007.

GHOSH A, ROY A, MATRAS J, BRAHMACHARI S, GENDELMAN HE, PAHAN K. Simvastatin inhibits the activation of p21ras and prevents the loss of dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 29(43):13543-56, 2009.

GIOVANNI A, SONSALLA PK, HEIKKILA RE. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Pharmacol Exp Ther*; 270(3):1008-1014, 1994.

GOMES, CA, SIMÕES PF, CANAS PM, QUIROZ C, SEBASTIÃO AM, FERRÉ S, CUNHA RA, RIBEIRO JA. GDNF control of the glutamatergic

cortico-striatal pathway requires tonic activation of adenosine A receptors. *J Neurochem*, v. 108, n. 5, p. 1208-19, Mar 2009.

GOMEZ-LAZARO M, BONEKAMP NA, GALINDO MF, JORDAN J, SCHRADER M. 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med*. 44:1960-9, 2008.

GOMEZ-LAZARO M, GALINDO MF, CONCANNON CG, SEGURA MF, FERNANDEZ-GOMEZ FJ, LLECHA N, COMELLA JX, PREHN JH, JORDAN J. 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. *J Neurochem*. Mar;104 (6):1599-612, 2008.

GOOD, P.F.; OLANOW, C.W.; PERL, D.P. Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain Res.*; 593: 343-346, 1992.

GORELL, J.M.; JOHNSON, C.C.; RYBICKI, B.A.; PETERSON, J.L.; KORTSHA, G.X.; BROWN, G.G.; RICHARDSON, R.J. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 20: 239-247, 1999.

GORELL, J.M.; JOHNSON, C.C.; RYBICKI, B.A.; PETERSON, E.L.; RICHARDSON, R.J. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*, 50: 1346-1350, 1998.

GREENAMYRE JT, O'BRIEN CF. N-methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease. *Arch Neurol*. 48:977-81, 1991.

GREENAMYRE JT, PORTER RH. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology; Suppl* 44: 7-13, 1994.

GRONDIN R, BÉDARD PJ, TAHAR AH, GRÉGOIRE L, MORI A, KASE H. Antiparkinsonian effect of a new selective adenosine A2A receptor antagonist in MPTP-treated monkeys. *Neurology* 52; 1673-1677, 1999.

HAGAN, J.J.; MIDDLEMISS, D.N.; SHARPE, P.C.; POSTE, G.H. Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. *Trends Pharmacol. Sci.*, 18: 156-163, 1997.

HAGEMAN, G.; VAN DER HOEK, J.A.F.; VAN HOUT, M.; VAN DER LAAN, G.; STEUR, E.J.; DE BRUIN, W.; HERHOLZ, K. Parkinsonism,

pyramidal signs, polyneuropathy, and cognitive decline after long-term occupational solvent exposure. *J. Neurol.*, 246: 198-206.

HALASZ N, SHEPHERD GM. Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience* 1983;10:579–619.

HAMELIN BA, TURGEON J. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 19:26-37, 1998.

HARRISON, P.J.; PEARSON, R.C.A. Environmental toxins and Parkinson's disease. *Trends. Neurosci.*, 12: 182, 1989.

HASHIMOTO, R.; TAKEI, N.; SHIMAZU, K.; CHRIST, L.; LU, B.; CHUANG, D.M.; Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity; *Neuropharmacology* 43(7): 1173-9; 2002.

HAUBER W, NEUSCHELER P, NAGEL J, MÜLLER CE. Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A(2A) receptors in the caudate-putamen of rats, *Eur. J. Neurosci.* 14; 1287–1293, 2001.

HAWKES, CH; SHEPHARD, BC; DANIEL, SE; Is Parkinson's disease a primary olfactory disorder? *Q. J. Med.* 92; 473-480; 1999.

HEIKKILA RE, CABBAT FS, MANZINO L, DUVOISIN RC. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice. *Neuropharmacology.* Jun;23(6):711-3, 1984.

HEIKKILA RE, CABBAT FS, MANZINO L, DUVOISIN RC. Potentiation by deprenil of 1-dopa induced circling in nigral-lesioned rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 15: 75–79, 1981.

HEMPEL SL, BUETTNER GR, O'MALLEY YQ, WESSELS DA, FLAHERTY DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 27:146-59, 1999.

HERNÁNDEZ-ROMERO MC, ARGUELLES S, VILLARÁN RF, DE PABLOS RM, DELGADO-CORTÉS MJ, SANTIAGO M, HERRERA AJ, CANO J, MACHADO A. Simvastatin prevents the inflammatory process



and the dopaminergic degeneration induced by the intranigral injection of lipopolysaccharide. *J. Neurochem*;105, 445–459, 2008.

HERTZMAN, C.; WIENS, M.; SNOW, B.; KELLY, S.; CALNE, D. A case-control study of Parkinson's disease in a horticultural region of British Columbia. *Mov. Disord.*, 9: 69-75, 1994.

HIRSCH, EC; MOUATT, A; FAUCHEUX, B; BONNET, AM; JAVOY-AGID, F; GRAYBIEL, AM; AGID, Y; Dopamine, tremor, and Parkinson's disease. *Lancet*, 340: 125-126; 1992.

HOUGHOGHI V, REZAYOF A, ZYAIAN S, ZARRINDAST MR. Intra dorsal hippocampal microinjection of lithium reverses morphine-induced impairment of memory in mice: interactions with dopamine receptor mechanism(s). *Behav Pharmacol.* 20:680–7, 2009.

HUANG QY, WEI C, YU L, COELHO JE, SHEN HY, KALDA A, LINDEN J, CHEN JF. Adenosine A2A receptors in bone marrow-derived cells but not in forebrain neurons are important contributors to 3-nitropropionic acid-induced striatal damage as revealed by cell-type-selective inactivation. *J Neurosci.* 1;26(44):11371-8, 2006.

HUNOT S, DUGAS N, FAUCHEUX B, HARTMANN A, TARDIEU M, DEBRÉ P, AGID Y, DUGAS B, HIRSCH EC FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* 19, 3440-3447, 1999.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo Demográfico, Rio de Janeiro: IBGE; 2000.

ICHITANI Y, OKAMURA H, MATSUMOTO Y, NAGATSU I, IBATA Y. Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. *Brain Res*; 549:350–3, 1991.

IKEDA K, KUROKAWA M, AOYAMA S, KUWANA Y. Neuroprotection by adenosine A2A receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 80:262-70, 2002.

IKEDA Y, TSUJI S, SATOH A, ISHIKURA M, SHIRASAWA T, SHIMIZU T. Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 107:1730-40, 2008.

INDEN M, TAIRA T, KITAMURA Y, YANAGIDA T, TSUCHIYA D, TAKATA K, YANAGISAWA D, NISHIMURA K, TANIGUCHI T, KISO Y, YOSHIMOTO K, AGATSUMA T, KOIDE-YOSHIDA S, IGUCHI-ARIGA SM, SHIMOHAMA S, ARIGA H. PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. *Neurobiol Dis.* 24:144-58, 2006.

IRWIN I, DELANNEY LE, LANGSTON JW. MPTP and aging. Studies in the C57BL/6 mouse. *Adv Neurol.* 1993;60:197-206.

IRWIN I, FINNEGAN KT, DELANNEY LE, DI MONTE D, LANGSTON JW. The relationships between aging, monoamine oxidase, striatal dopamine and the effects of MPTP in C57BL/6 mice: a critical reassessment. *Brain Res.* 1992 Feb 14;572(1-2):224-31.

ISELLA V, IURLARO S, PIOLTI R, FERRARESE C, FRATTOLA L, APPOLONIO I. Physical anhedonia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry,* 74:1308–1311, 2003.

JACOBSON, KA, GAO, ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov,* v. 5, n. 3, p. 247-64, Mar 2006.

JAKOPEC, S.; KARLOVIC, D.; DUBRAVCIC, K.; BATINIC, D.; SORIC, J.; BROZOVIC, A.; BULJAN, D.; OSMAK, M.; Lithium effect on glutamate induced damage in glioblastoma cells. *CollAntropol* 32: 87-91; 2008.

JICK H, ZORNBERG GL, JICK SS, SESHADRI S, DRACHMAN DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet.* 356:1627-31, 2000.

JOHNSON AM, LOEW DM, VIGOURET JM. Stimulant properties of bromocriptine on central dopamine receptors in comparison to apomorphine, (+)-amphetamine and L-DOPA. *Br J Pharmacol* 56: 59–68, 1976.

JUNG KH, CHU K, JEONG SW, HAN SY, LEE ST, KIM JY, ROH JK. HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes sensorimotor recovery, suppressing acute inflammatory reaction after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 35:1744-9, 2004.

JUNG, KH; CHU, K; JEONG, SW; HAN, SY; LEE, ST; KIM, JY; KIM, M; ROH, JK; HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes sensorimotor recovery, suppressing acute inflammatory reaction after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 35, 1744–1749; 2004.

KALARIA RN, MITCHELL MJ, HARIK SI. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(10):3521-5.

KANDA T, JACKSON MJ, SMITH LA, PEARCE RK, NAKAMURA J, KASE H, KUWANA Y, JENNER P. Combined use of the adenosine A(2A) antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys. *Exp. Neurol*. 162; 321–327, 2000.

KANDA T, TASHIRO T, KUWANA Y, JENNER P. Adenosine A2A receptors modify motor function in MPTP-treated common marmosets. *NeuroReport* 9; 2857–2860, 1998.

KHEIRBEK MA, BRITT JP, BEELER JA, ISHIKAWA Y, MCGEHEE DS, ZHUANG X. Adenylyl cyclase type 5 contributes to corticostriatal plasticity and striatum-dependent learning. *J Neurosci*; Sep 30; 29(39):12115-24, 2009.

KIDD SK, SCHNEIDER JS. Protective effects of valproic acid on the nigrostriatal dopamine system in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*.194:189–94, 2011.

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*; 152:259–77, 1998.

KITADA, T.; ASAKAWA, S.; HATTORI, N.; MATSUMINE, H.; YAMAMURA, Y.; MINOSHIMA, S.; YOKOCHI, M.; MIZUNO, Y.; SHIMIZU, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392: 605- 608, 1998.

KLAIDMAN LK, ADAMS JD JR, LEUNG AC, KIM SS, CADENAS E. Redox cycling of MPP<sup>+</sup>: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med*. 1993 Aug;15(2):169-79.

KLAWANS, H.L.; STEIN, R.W.; TANNER, C.M.; GOETZ, C.G. A pure parkinsonian syndrome following acute carbon monoxide intoxication. *Arch.Neurol.*, 39: 302- 304, 1982.

KLOCKGETHER T, TURSKI L, HONORE T, ZHANG ZM, GASH DM, KURLAN R, GREENAMYRE JT. The AMPA receptor antagonist NBQX has antiparkinsonian effects in monoamine-depleted rats and MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol.* 30:717-23, 1991.

KNOWLTON, BJ; MANGELS, JA; SQUIRE, LR; A neostriatal habit learning system in humans. *Science*, 273: 1399-1402, 1996.

KOGA K, KUROKAWA M, OCHI M, NAKAMURA J, KUWANA Y. Adenosine A(2A) receptor antagonists KF17837 and KW-6002 potentiate rotation induced by dopaminergic drugs in hemi-Parkinsonian rats, *Eur. J. Pharmacol.* 408; 249–255, 2000.

KOPIN IJ, MARKEY SP. MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* 1988;11:81-96. Review.

KRUGER, R.; KUHN, W.; MULLER, T.; WOITALLA, D.; GRAEBER, M.; KOSEL, S.; PRZUNTEK, H.; EPPLIN, J.T.; SCHOLS, L.; RIESS, O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.*, 18: 106- 108, 1998.

KUMAR A, SHARMA N, GUPTA A, KALONIA H, MISHRA J. Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. *Brain Research*, XX-XX, 2012.

KWAK B, MULHAUPT F, MYIT S, MACH F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med.* 6:1399-402, 2000.

LANGSTON JW, BALLARD P, TETRUD JW, IRWIN I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*.Feb 25;219(4587):979-80, 1983.

LANGSTON JW, IRWIN I, LANGSTON EB, FORNO LS. Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science.* Sep 28;225(4669):1480-2, 1984.

LANGSTON JW, Irwin I. MPTP: current concepts and controversies. *Clin Neuropharmacol.* 1986;9(6):485-507. Review.

LANGSTON JW, LANGSTON EB, IRWIN I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl.*100:49-54, 1984.

LANGSTON JW. MPTP neurotoxicity: an overview and characterization of phases of toxicity. *Life Sci.* Jan 21;36(3):201-6, 1985.

LANGSTON, J.W. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology*, (Suppl. 3), 47: S153-S160; 1996.

LATINI S, PAZZAGLI M, PEPEU G, PEDATA F. A2 adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system. *Gen Pharmacol*, v. 27, n. 6, p. 925-33, Sep 1996.

LAUFS U, GERTZ K, HUANG P, NICKENIG G, BOHM M, DIRNAGL U, ENDRES M. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke*. 31:2442-9, 2000.

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

LEE ST, CHU K, PARK JE, HONG NH, IM WS, KANG L, HAN Z, JUNG KH, KIM MW, KIM M. Atorvastatin attenuates mitochondrial toxin-induced striatal degeneration, with decreasing iNOS/c-Jun levels and activating ERK/Akt pathways. *J Neurochem*. 104:1190-200, 2008.

LEFER AM, SCALIA R, LEFER DJ. Vascular effects of HMG CoA-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 49:281-7, 2001.

LEHMENSIEK V, TAN EM, LIEBAU S, LENK T, ZETTLMEISL H, SCHWARZ J, STORCH A. Dopamine transporter-mediated cytotoxicity of 6-hydroxydopamine in vitro depends on expression of mutant  $\alpha$ -synucleins related to Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 48, 329-340, 2006.

LEHMENSIEK V, TAN EM, LIEBAU S, LENK T, ZETTLMEISL H, SCHWARZ J, STORCH A. Dopamine transporter-mediated cytotoxicity of 6-hydroxydopamine in vitro depends on expression of mutant  $\alpha$ -synucleins related to Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 48:329-40, 2006.

LENOX RH, HAHN C. Overview of the Mechanism of Action of Lithium in the Brain: Fiftyyear Update. *Journal of Clinical Psychiatry* 61: 5-15; 2000.

LI L, CAO D, KIM H, LESTER R, FUKUCHI K. Simvastatin enhances learning and memory independent of amyloid load in mice. *Ann Neurol.* 60:729-39, 2006.

LI L, CAO D, KIM H, LESTER R, FUKUCHI K. Simvastatin enhances learning and memory independent of amyloid load in mice. *Ann. Neurol.* 60, 729–739; 2006.

LIAO JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol.* 86:5-18, 2002.

LIEBERMAN A. Depression in Parkinson's disease: a review. *Acta Neurol Scand;* 113: 1-8, 2006.

LINCOLN S, CRA WLEY A, HANSON M, MARAGANORE D, ADLER C, COOKSON MR, MUENTER M, BAPTISTA M, MILLER D, BLANCATO J, HARDY J, GWINN-HARDY K. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302: 841, 2003.

LINDNER MD, CAIN CK, PLONE MA, FRYDEL BR, BLANEY TJ, EMERICH DF, HOANE MR. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behav. Brain Res.* 102: 1–16; 1999.

LIU HH, TSAI MC, CHEN CJ, JENG JS, CHANG YC, CHEN SY, CHEN RC. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology*, 48: 1583-1588, 1997.

LISTER RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180–185, 1987.

LOPES LV, REBOLA N, PINHEIRO PC, RICHARDSON PJ, OLIVEIRA CR, CUNHA RA. Adenosine A3 receptors are located in neurons of the rat hippocampus. *Neuroreport*, v. 14, n. 12, p. 1645-8, Aug 26 2003.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*193:265-75, 1951.

LU D, GOUSSEV A, CHEN J, PANNU P, LI Y, MAHMUD A, CHOPP M. Atorvastatin Reduces Neurological Deficit and Increases Synaptogenesis, Angiogenesis, and Neuronal Survival in Rats Subjected to Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 21(1): 21-32, 2004.

LUNDBLAD M, VAUDANO E, CENCI MA. Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *J. Neurochem.* 84; 1398–1410, 2003.

MARDER K, LOGROSCINO G, ALFARO B, MEJIA H, HALIM A, LOUIS E, COTE L, MAYEUX R. Environmental risk factors for Parkinson's disease in an urban multiethnic community. *Neurology*, 50: 279-281, 1998.

MARIANI E, POLIDORI MC, CHERUBINI A, MECOCCHI P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci* 827: 65–75; 2005.

MARIÉ RM, BARRÉ L, DUPUY B, VIADER F, DEFER G, BARON JC. Relationships between striatal dopamine denervation and frontal executive tests in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 260: 77-80, 1999.

MARIN RS. Apathy, a neuropsychiatric syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neuosci* 1991;3:243–254.

MATHEUS FC, AGUIAR AS JR, CASTRO AA, VILLARINHO JG, FERREIRA J, FIGUEIREDO CP, WALZ R, SANTOS AR, TASCA CI, PREDIGER RD. 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.* Dec 1;235(2):263-72, 2012.

MAYEUX R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci.* 26:81-104. Epub 2003 Jan 24. Review; 2003.

MCGEER PL, MCGEER EG. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 10, S3-7, 2004.

MEARA J, HOBSON P. Depression, anxiety and hallucinations in Parkinson's disease. *Elder Care*, 10: suppl 4-5; 1998.

MELDRUM BS. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J. Nutr.* 130: 1007S-1015S, 2000.

MENESES MS, TEIVE HÁ. Doença de Parkinson. Aspectos Clínicos e cirúrgicos. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

MEREDITH GE, DERVAN AG, TOTTERDELL S. Activated microglia persist in the substantia nigra of a chronic MPTP mouse model of

Parkinson's disease. In: *The basal ganglia VIII*. Singapore: Springer Science. Ed: Bolam, Ingham, Magill, 2005.

MEREDITH GE, TOTTERDELL S, POTASHKIN JA, SURMEIER DJ. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism Relat Disord* 14(suppl 2): S112–5, 2008.

MIERAU J, SCHINGNITZ G. Biochemical and pharmacological studies on pramipexole, a potent and selective dopamine D2 receptor agonist. *Eur J Pharmacol*. 215: 161–170, 1992.

MONTI B, GATTA V, PIRETTI F, RAFFAELLI SS, VIRGILI M, CONTESTABILE A. Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein. *Neurotox Res*. 17:130–41, 2010.

MONTI B, POLAZZI E, BATTI L, CROCHEMORE C, VIRGILI M, CONTESTABILE A. Alpha- synuclein protects cerebellar granule neurons against 6-hydroxydopamine- induced death. *J Neurochem*. 103:518–30, 2007.

MORANO A, JIMENEZ-JIMENEZ FJ, MOLINA JA, ANTOLIN MA. Risk- factors for Parkinson's disease: a case-control study in the province of Caceres, Spain. *Acta Neurol. Scand.*, 89: 164-170, 1994.

MOREAU JL, HUBER G. Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 31, n. 1, p. 65-82, Dec 1999.

MOREIRA EL, RIAL D, AGUIAR AS JR, FIGUEIREDO CP, SIQUEIRA JM, DALBÓ S, HORST H, DE OLIVEIRA J, MANCINI G, DOS SANTOS TS, VILLARINHO JG, PINHEIRO FV, MARINO-NETO J, FERREIRA J, DE BEM AF, LATINI A, PIZZOLATTI MG, RIBEIRO-DO-VALLE RM, PREDIGER RD. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. *J Neural Transm*. Dec;117(12):1337-51, 2010.

MORELLI M, CARTA AR, JENNER P. Adenosine A2A receptors and Parkinson's disease, *Handb. Exp. Pharmacol*; 589–615, 2009.

MORRIS RGM, GARRUD P, RAWLINS JN, O'KEEFE J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683, 1982.



MOSES D, GROSS A, FINBERG JP. Rasagiline enhances L-DOPA-induced contralateral turning in the unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned guinea-pig. *Neuropharmacology* 47: 72–80, 2004.

MU X, HE G, CHENG Y, LI X, XU B, DU G. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro. *Pharmacol Biochem Behav.* Jun;92(4):642-8, 2009.

MULLER A, REICHMANN H, LIVERMORE A, HUMMEL T. Olfactory function in idiopathic Parkinson's disease (IPD): results from cross-sectional studies in IPD patients and long-term follow-up of de-novo IPD patients. *J. Neural Transm.* 109: 805–811; 2002.

MÜLLER T, KUHN W, BÜTTNER T, EISING E, COENEN H, HAAS M, PRZUNTEK H. Colour vision abnormalities do not correlate with dopaminergic nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *J Neurol.* Oct; 245(10): 659-64, 1998.

MURAI T, OKUDA S, TANAKA T, OHTA H. Characteristics of object location memory in mice: behavioral and pharmacological studies. *Physiol Behav.* v.90, p.16–24. 2007.

NEDERGAARD M, TAKANO T, HANSEN AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature Rev. Neurosci.* 3: 748-755, 2002.

NELSON DL, COX MM. *Lehninger principles of biochemistry – 3<sup>rd</sup> ed.* New York, Worth Publishers, 799-814, 2000.

NOCJAR C, HAMMONDS MD, SHIM SS. Chronic lithium treatment magnifies learning in rats. *Neuroscience* 150:774–88, 2007.

NORENBERG W, WIRKNER K, ILLES P. Effect of adenosine and some of its structural analogues on the conductance of NMDA receptor channels in a subset of rat neostriatal neurones. *Br. J. Pharmacol.*; 122, 71-80, 1997.

NUUTILA J, KAAKKOLA S, MANNISTO PT. Potentiation of central effects of L-dopa by an inhibitor of catechol-O-methyltransferase. *J Neural Transm.* 70: 233–240, 1987.

OBRENOVITCH TP, URENJAK J. Altered Glutamatergic Transmission in Neurological Disorders: From High Extracellular Glutamate to Excessive Synaptic Efficacy. *Progr. Neurobiol.* 51: 39-87, 1997.

ODUNZE IN, KLAIDMAN LK, ADAMS Jr JD. MPTP toxicity in the mouse brain and vitamin E. *Neuroscience Letters* 108 (3), 346–349; 1990.

OFFEN D, BEART PM, CHEUNG NS, PASCOE CJ, HOCHMAN A, GORODIN S, MELAMED E, BERNARD R, BERNARD O. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5789–94, 1998.

OLANOW CW, JENNER P, BEAL MF. Cell death and neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, (Suppl. 1), 44: S1-S196; 1998.

OLANOW CW. Surgical therapy for Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 9 Suppl 3:31-9, 2002.

OSSOWSKA K, LORENC-KOCI E, WOLFARTH S. Antiparkinsonian action of MK-801 on the reserpine-induced rigidity: a mechanomyographic analysis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.*7:143-52, 1994.

OVADIA A, ZHANG Z, GASH DM. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys. *Neurobiol Aging.* Nov-Dec;16(6):931-7, 1995.

OWEN AM, SAHAKIAN BJ, HODGES JR, SUMMERS BA, POLKEY CE, ROBINS TW. Dopamine-dependent frontostriatal planning in early Parkinson's disease. *Neuropsychology*, 9: 126–140, 1995.

PAGONOPOULOU O, ANGELATOU F. Reduction of A1 adenosine receptors in cortex, hippocampus and cerebellum in ageing mouse brain. *Neuroreport*, v. 3, n. 9, p. 735-7, Sep 1992.

PAHAN K, SHEIKH FG, NAMBOODIRI AMS, SINGH I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J. Clin. Invest.* 100: 2671-2679, 1997.

PASCUAL T, GONZALEZ JL. A protective effect of lithium on rat behaviour altered by ibotenic acid lesions of the basal forebrain cholinergic system. *Brain Res* 695:289–92, 1995.

PERRY TL, YONG VW, CLAVIER RM, JONES K, WRIGHT JM, FOULKS JG, WALL RA. Partial protection from the dopaminergic neurotoxin Nmethyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by four different antioxidants in the mouse. *Neuroscience Letters* 60 (2), 109–114; 1985.

PEZZOLI G, STRADA O, SILANI V, ZECCHINELLI A, PERBELLINI L, JAVOY-AGID F, GHIDONI P, MOTTI ED, MASINI T, SCARLATO G, AGID Y, HIRSCH EC. Clinical and pathological features in hydrocarbon-induced parkinsonism. *Ann. Neurol.*, 40: 922-925, 1996.

PIERMARTIRI TC, FIGUEIREDO CP, RIAL D, DUARTE FS, BEZERRA SC, MANCINI G, DE BEM AF, PREDIGER RD, TASCA CI. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- beta(1-40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp Neurol* 226:274-284; 2010.

PIERMARTIRI TC, VANDRESEN-FILHO S, DE ARAUJO HERCULANO B, MARTINS WC, DAL'AGNOLO D, STROEH E, CARQUEJA CL, BOECK CR, TASCA CI. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid- induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res* 16:106-115; 2009.

PIERRI M, VAUDANO E, SAGER T, ENGLUND U. KW-6002 protects from MPTP induced dopaminergic toxicity in the mouse. *Neuropharmacology* 48:517-24, 2005.

PINNA, A.; VOLPINI, R.; CRISTALLI, G.; MORELLI, M. New adenosine A2A receptor antagonists: actions on Parkinson's disease models. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 512, p. 157-164, 2005.

POLYMEROPOULOS MH, LAYDEN C, LEROY E, IDE SE, DEHEJIA A, DUTRA A, PIKE B, ROOT H, RUBENSTEIN J, BOYER R, STENROOS ES CHANDRASEKHARAPP A S, A THANASSIADOU A, PAPAPETROPOULOS T, JOHNSON WG, LAZZARINI AM, DUVOISIN RC, DI IORIO, G.; GOLBE, L.I.; NUSSBAUM, R.L. Mutation in the alpha- synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276: 2045- 2047, 1997.

PORSOLT RD, LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 266, 730; 1977.

PREDIGER RD, AGUIAR AS JR, MOREIRA EL, MATHEUS FC, CASTRO AA, WALZ R, DE BEM AF, LATINI A, TASCA CI, FARINA M, RAISMAN-VOZARI R. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.*17(5): 489-507. Review, 2011.

PREDIGER RD, AGUIAR AS JR, ROJAS-MAYORQUIN AE, FIGUEIREDO CP, MATHEUS FC, GINESTET L, CHEVARIN C, BEL ED, MONGEAU R, HAMON M, LANFUMEY L, RAISMAN-VOZARI R. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* Feb; 17(2):114-29, 2010.

PREDIGER RD, BATISTA LC, MIYOSHI E, TAKAHASHI RN. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. *Behav Brain Res*153:149–57, 2004.

PREDIGER RD, BATISTA LC, TAKAHASHI RN. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol Aging* 26, 957-964, 2005.

PREDIGER RD, DA CUNHA C, TAKAHASHI RN. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behav Pharmacol.* 16:209–18, 2005.

PREDIGER RD, RIAL D, MEDEIROS R, FIGUEIREDO CP, DOTY RL, TAKAHASHI RN. Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* Jul. 1170: 629-36, 2009.

PREDIGER RDS, BATISTA LC, MEDEIROS R, PANDOLFO P, FLORIO JC, TAKAHASHI RN. The risk is in the air: intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 202:391-403, 2006.

PRIKHOJAN A, BRANNAN T, YAHR MD. Comparative effects of repeated administration of dopamine agonists on circling behavior in rats. *J Neural Transm.*107: 1159–1164, 2000.

PRZEDBORSKI S, KOSTIC V, JACKSON-LEWIS V, NAINI AB, SIMONETTI S, FAHN S, CARLSON E, EPSTEIN CJ, CADET JL. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Journal of Neuroscience* 5: 1658–1667; 1992.

PRZEDBORSKI S, LEVIVIER M, JIANG H, FERREIRA M, JACKSON-LEWIS V, DONALDSON D, et al. Dose-dependent lesions of the

dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*; 67: 631–47, 1995.

QING H, HE G, LY PT, FOX CJ, STAUFENBIEL M, CAI F, ZHANG Z, WEI S, SUN X, CHEN CH, ZHOU W, WANG K, SONG W. Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 205:2781–9, 2008.

QUIROZ C, LUJÁN R, UCHIGASHIMA M, SIMOES AP, LERNER TN, BORYCZ J, KACHROO A, CANAS PM, ORRU M, SCHWARZSCHILD MA, ROSIN DL, KREITZER AC, CUNHA RA, WATANABE M, FERRÉ S. Key modulatory role of presynaptic adenosine A2A receptors in cortical neurotransmission to the striatal direct pathway. *Scientific World Journal*, v. 9, p. 1321-44, 2009.

RAMSAY RR, SALACH JI, SINGER TP. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD+-linked substrates by MPP+. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 29;134(2):743-8, 1986.

RANG HP, DALE MM, RITTER JM, MOORE PK. *Farmacologia*, 5a edição; Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.

REAVILL C, JENNER P, MARSDEN CD. Differentiation of dopamine agonists using drug-induced rotation in rats with unilateral or bilateral 6-hydroxydopamine destruction of ascending dopamine pathways. *Biochem Pharmacol*. 32: 865–870, 1983.

REBOLA N, SEBASTIÃO AM, DE MENDONCA A, OLIVEIRA CR, RIBEIRO JA, CUNHA RA. Enhanced adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *J Neurophysiol*, v. 90, n. 2, p. 1295-303, Aug 2003.

REDROBE JP, BOURIN M. The effect of lithium administration in animal models of depression: a short review. *Fundam Clin Pharmacol*13:293–9, 1999.

RIBEIRO JA, SEBASTIAO AM, DE MENDONCA A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol*, v. 68, n. 6, p. 377-92, Dec 2002.

RICHARD IH. Depression and apathy in Parkinson's disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 7: 295-391; 2007.

ROBERTS E. Alzheimer disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicates. *Neurobiol. Aging*, 7: 561-567, 1986.

RODRIGUEZ MC, OBESO JA, OLANOW CW. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol*. 44:S175-88, 1998.

ROJO AI, CAVADA C, DE SAGARRA MR, CUADRADO A. Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats. *Exp Neurol*. Nov; 208(1):120-6, 2007

ROJO AI, MONTERO C, SALAZAR M, CLOSE RM, FERNÁNDEZ-RUIZ J, SÁNCHEZ-GONZÁLEZ MA, DE SAGARRA MR, JACKSON-LEWIS V, CAVADA C, CUADRADO A. Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. *Eur J Neurosci*. 2006 Oct; 24(7):1874-84.

RONCACCI S, TROISI E, CARLESIMO GA, NOCENTINI U, CALTAGIRONE C. Implicit memory in Parkinsonian patients: evidence for deficits skill learning. *Eur. Neurol.*, 36: 154-159, 1996.

ROSS GW, ABBOTT RD, PETROVITCH H, MORENS DM, GRANDINETTI A, TUNG KH, TANNER CM, MASAKI KH, BLANCHETTE PL, CURB JD, POPPER JS, WHITE LR. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson's disease. *JAMA*, 283: 2674-2679, 2000.

ROWE MK, CHUANG DM. Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 6(21): 1-18; 2004.

RYZHOV S, GOLDSTEIN AE, BIAGGIONI I, FEOKTISTOV I. Cross-talk between G(s)- and G(q)-coupled pathways in regulation of interleukin-4 by A(2B) adenosine receptors in human mast cells. *Mol Pharmacol*, v. 70, n. 2, p. 727-35, Aug 2006.

SALLAZ M, JOURDAN F. Apomorphine disrupts odour-induced patterns of glomerular activation in the olfactory bulb. *Neuroreport* 1992;3:833-6.

SANTIAGO RM, BARBIEIRO J, LIMA MM, DOMBROWSKI PA, ANDREATINI R, VITAL MA. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 34:1104-14, 2010.

SAUER H, OERTEL WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*; 59:401–15, 1994.

SCHINTU N, FRAU L, IBBA M, GARAU A, CARBONI E, CARTA AR. Progressive dopamin-ergic degeneration in the chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2009;16:127–39.

SCHMIDT N, FERGER B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 2001;108(11):1263-82. Review.

SCHMIDT WJ, LEBSANFT H, HEINDL M, GERLACH M, GRUENBLATT E, RIEDERER P, MAYERHOFER A, SCHELLER DK. Continuous versus pulsatile administration of rotigotine in 6-OHDA-lesioned rats: contralateral rotations and abnormal involuntary movements. *J Neural Transm*. 115: 1385–1392, 2008.

SCHRAG A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease: an update. *J Neurol*; 251: 795-804, 2004.

SEBASTIÃO AM, RIBEIRO JA. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol*; (193):471-534, 2009.

SEBASTIÃO AM, RIBEIRO JA. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci*; Sep;21(9):341-6, 2000.

SEDELIS M, HOFELE K, AUBURGER GW, MORGAN S, HUSTON JP, SCHWARTING RK. Evidence for resistance to MPTP in C57BL/6 x BALB/c F1 hybrids as compared with their progenitor strains. *Neuroreport*. 2000 Apr 7;11(5):1093-6.

SEDELIS M, HOFELE K, AUBURGER GW, MORGAN S, HUSTON JP, SCHWARTING RK. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet*. 2000 May;30(3):171-82.

SEDELIS M, SCHWARTING RK, HUSTON JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2001 Nov 1;125(1-2):109-25. Review.

SEIDLER A, HELLENBRAND W, ROBRA BP, VIEREGGE P, NISCHAN P, JOERG J, OERTEL WH, ULM G, SCHNEIDER E. Possible

environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology*, 46: 1275-1284.

SELLEY ML. Simvastatin prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced striatal dopamine depletion and protein tyrosine nitration in mice. *Brain Res.* 1037:1-6, 2005.

SEMCHUK KM, LOVE EJ, LEE RG. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiology hypothesis. *Neurology* 43: 1173-1180; 1993.

SGADÒ P, VIAGGI C, PINNA A, MARRONE C, VAGLINI F, PONTIS S, MERCURI NB, MORELLI M, CORSINI GU. Behavioral, neurochemical, and electrophysiological changes in an early spontaneous mouse model of nigrostriatal degeneration. *Neurotox Res.* Aug; 20(2):170-81, 2011.

SGOBIO C, GHIGLIERI V, COSTA C, BAGETTA V, SILIQUINI S, BARONE I, DI FILIPPO M, GARDONI F, GUNDELFINGER ED, DI LUCA M, PICCONI B, CALABRESI P. Hippocampal synaptic plasticity, memory, and epilepsy: effects of long-term valproic acid treatment. *Biol Psychiatry* 67:567-74, 2010.

SHAO L, YOUNG LT, WANG JF. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biological Psychiatry* 58: 879-884; 2005.

SHIM SS, HAMMONDS MD, GANOCY SJ, CALABRESE JR. Effects of sub-chronic lithium treatment on synaptic plasticity in the dentate gyrus of rat hippocampal slices. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 31:343-7, 2007.

SHIMOHAMA S, SAWADA H, KITAMURA Y, TANIGUCHI T. Disease model: Parkinson's disease. *Trends Mol. Med.*, 9: 360-365, 2003.

SHIOZAKI S, ICHIKAWA S, NAKAMURA J, KITAMURA S, YAMADA K, KUWANA Y. Actions of adenosin A2A receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP, *Psychopharmacology (Berl)* 147; 90-95, 1999.

SHIPLEY MT, HALLORAN FJ, DE LA TORRE J. Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* 329:294-9, 1985.



SINGH N, PILLAY V, CHOONARA YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.*; 81, 29-44, 2007.

SINGLETON AB, FARRER M, JOHNSON J, SINGLETON A, HAGUE S, KACHERGUS J, HULIHAN M, PEURALINNA T, DUTRA A, NUSSBAUM R, STARR MS. Antiparkinsonian actions of glutamate antagonists--alone and with L-DOPA: a review of evidence and suggestions for possible mechanisms. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.*10:141-85, 1995.

SNAITH RP, HAMILTON M, MORLEY S, HUMAYAN A, HARGREAVES D, TRIGWELL P. A scale for the assessment of hedonic tone: the Snaith-Hamilton Pleasure Scale. *Br J Psychiatry.*167:99– 103, 1995.

SRIRAM K, PAI KS, BOYD MR, RAVINDRANATH V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Research* 749: (1), 44–52 1997.

STAMBOLIC V, RUEL L, WOODGETT JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Current Biology* 6: 1664–1668; 1996.

STARR MS. Antiparkinsonian actions of glutamate antagonists— alone and with L-DOPA: a review of evidence and suggestions for possible mechanisms. *J Neural Transm Park Dis Dement.* 10: 141-85, 1995.

STEBBINS GT, GABRIELI JDE, MASCHIARI F, MONTI L, GOETZ CG. Delayed recognition memory in Parkinson's disease: a role for working memory? *Neuropsychol.*, 37: 503-510, 1999.

STEPIEN K, TOMASZEWSKI M, CZUCZWAR SJ. Neuroprotective properties of statins. *Pharmacol. Rep.* 57, 561–569; 2005.

STERU L, CHERMAT R, THIERRY B, SIMON P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*;85(3):367-70, 1985.

STOOF JC, WINOGRODZKA A, VAN MUISWINKEL FL, WOLTERS EC, VOORN P, GROENEWEGEN HJ, BOOIJ J, DRUKARCH B. Leads for the development of neuroprotective treatment in Parkinson's disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. *Eur. J. Pharmacol.* 375: 75-86; 1999.

TADAIESKY MT, DOMBROWSKI PA, FIGUEIREDO CP, CARGNIN-FERREIRA E, DA CUNHA C, TAKAHASHI RN. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a pre-motor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156:830-40, 2008.

TAKAHASHI RN, PAMPLONA FA, PREDIGER RD. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. *Front Biosci*, v. 13, p. 2614-32, 2008.

TAKEMOTO M, LIAO JK. Pleiotrophic Effects of 3-Hydroxi-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:1712-1719, 2001.

TANAKA T, TATSUNO I, UCHIDA D, MOROO I, MORIO H, NAKAMURA S, NOGUCHI Y, YASUDA T, KITAGAWA M, SAITO Y, HIRAI A. Geranylgeranyl-pyrophosphate, an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary cultured cortical neurons to protect the cell death induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. *J Neurosci.* 20:2852-9, 2000.

TANDBERG E, LARSEN JP, AARSLAND D, CUMMINGS JL. The occurrence of depression in Parkinson's disease. A community-based study. *Arch Neurol* 53: 175-9, 1996.

TANNER CM, OTTMAN R, ELLENBERG JH, GOLDMAN SM, MAYEUX R, CHAN P, LANGSTON JW. Parkinson's disease (PD) concordance in elderly male monozygotic (MZ) and dizygotic (DZ) twins. *Neurology (Suppl.)*, 48: 42002, 1997.

TANNER CM. The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 12: 49-54, 1989.

TEISMANN P, FERGER B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 39:167-74, 2001.

TIPTON KF, SINGER TP. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem.* 1993 Oct;61(4):1191-206. Review.

TOLOSA E, COMPTA Y, GAIG C. The premotor phase of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*; 13: 2-7, 2007.

TORNWALL M, MANNISTO PT. Effects of three types of catechol O-methylation inhibitors on L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced circling behaviour in rats. *Eur J Pharmacol.* 250: 77–84, 1993.

TSALTAS E, KONTIS D, BOULOUGOURIS V, PAPADIMITRIOU GN. Lithium and cognitive enhancement: leave it or take it. *Psychopharmacology.* 202:457–76, 2009.

TSALTAS E, KYRIAZI T, POULOPOULOU C, KONTIS D, MAILLIS A. Enhancing effects of lithium on memory are not by-products of learning or attentional deficits. *Behav Brain Res.* 180:241–5, 2007.

TURSKI L, BRESSLER K, RETTIG KJ, LOSCHMANN PA, WACHTEL H. Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature.* 349:414-8, 1991.

UITTI RJ, SNOW BJ, SHINOTOH H, VINGERHOES FJG, HAYWARD M, HASHIMOTO S, RICHMOND J, MARKEY SP, MARKEY CJ, CALNE DB. Parkinsonism induced by solvent abuse. *Ann. Neurol.*, 35: 616-619, 1994.

UMKA J, MUSTAFA S, ELBELTAGY M, THORPE A, LATIF L, BENNETT G, WIGMORE PM. Valproic acid reduces spatial working memory and cell proliferation in the hippocampus. *Neuroscience* 166:15–22, 2010.

VAJDA FJ. Valproate and neuroprotection. *Journal of Clinical Neuroscience* 9(5): 508-14; 2002.

VAN DER BURGER JC, VAN WEGEN EE, RIETBERG MB, KWAKKEL G, VAN DIEËN JH. Postural control of trunk during unstable sitting in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 12: 492-498, 2006.

VANACORE N, NAPPO A, GENTILE M, BRUSTOLIN A, PALANGE S, LIBERATI A, DI REZZE S, CALDORA G, GASPARINI M, BENEDETTI F, BONIFATI V, FORASTIERE F, QUERCIA A, MECO G. Evaluation of risk of Parkinson's disease in a cohort of licensed pesticide users. *Neurol. Sci.*, (Suppl. 2): S119-S120, 2002.

VARASTET M, RICHE D, MAZIERE M, HANTRAYE P. Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 1994 Nov;63(1):47-56.

VAUGHAN CJ. Prevention of Stroke and Dementia with Statins: Effects Beyond Lipid Lowering. *Am. J. Cardiol.* 91(suppl): 23B-29B; 2003.

VULETIC S, RIEKSE RG, MARCOVINA SM, PESKIND ER, HAZZARD WR, ALBERS JJ. Statins of different brain penetrability differentially affect CSF PLTP activity. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22(5-6):392-8, 2006.

WAGNER AH, KOHLER T, RUCKSCHLOSS U, JUST I, HECKER M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:61-9, 2000.

WANG JF, AZZAM JE, YOUNG LT. Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. *Neuroscience* 116: 485- 489; 2003.

WANG Q, WANG PH, MCLACHLAN C, WONG PT. Simvastatin reverses the downregulation of dopamine D1 and D2 receptor expression in the prefrontal cortex of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats. *Brain Res.*1045:229-33, 2005.

WANG Q, ZENGIN A, DENG C, LI Y, NEWELL KA, YANG GY, LU Y, WILDER-SMITH EP, ZHAO H, HUANG XF. High dose of simvastatin induces hyperlocomotive and anxiolytic-like activities: The association with the up-regulation of NMDA receptor binding in the rat brain. *Exp Neurol.* Mar;216(1):132-8, 2008.

WEBER MS, PROD'HOMME T, STEINMAN L, ZAMVIL SS. Drug Insight: using statins to treat neuroinflammatory disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 1:106-12, 2005.

WELDON DA, TRAVIS ML, KENNEDY DA. Posttraining D1 receptor blockade impairs odor conditioning in neonatal rats. *Behav Neurosci.*105:450-8, 1991.

WHITE HD, SIMES RJ, ANDERSON NE, HANKEY GJ, WATSON JD, HUNT D, COLQUHOUN DM, GLASZIOU P, MACMAHON S, KIRBY AC, WEST MJ, TONKIN AM. Pravastatin therapy and the risk of stroke. *N Engl J Med.* 343:317-26, 2000.

WILLIAMS-GRAY CH, FOLTYNIE T, BRAYNE CE, ROBBINS TW, BARKER RA. Evolution of cognitive dysfunction in an incident Parkinson's disease cohort. *Brain* 130; 1787-1798, 2007.

WOLOZIN B, KELLMAN W, RUOSSEAU P, CELESIA GG, SIEGEL G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57: 1439-1443, 2000.

WOLOZIN B, WANG SW, LI NC, LEE A, LEE TA, KAZIS LE. Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *BMC Med* 5:20, 2007.

WU DC, JACKSON-LEWIS V, VILA M, TIEU K, TEISMANN P, VADSETH C, CHOI DK, ISCHIROPOULOS H, PRZEDBORSKI S. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22:1763-71, 2002.

XU K, XU YH, CHEN JF, SCHWARZSCHILD MA. Caffeine's neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity shows no tolerance to chronic caffeine administration in mice. *Neurosci Lett*; Mar 29; 322(1):13-6, 2002.

YAMAMOTO A, HOSHI K, ICHIHARA K. Fluvastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Eur J Pharmacol.* 361:143-9, 1998.

YAMANOUCHI H, NAGURA H. Neurological signs and frontal white matter lesions in vascular parkinsonism. *Stroke* 28; 965-969, 1997.

YANG L, MATTHEWS RT, SCHULZ JB, KLOCKGETHER T, LIAO AW, MARTINOU JC, PENNEY JB JR, HYMAN BT, BEAL MF. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J Neurosci.* 18:8145-52, 1998.

YOUDIM MB, ARRAF Z. Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: involvements of Bcl-2 and Bax. *Neuropharmacology.* 46: 1130-40, 2004.

YU L, SHEN HY, COELHO JE, ARAÚJO IM, HUANG QY, DAY YJ, REBOLA N, CANAS PM, RAPP EK, FERRARA J, TAYLOR D,

MÜLLER CE, LINDEN J, CUNHA RA, CHEN JF. Adenosine A2A receptor antagonists exert motor and neuroprotective effects by distinct cellular mechanisms. *Ann Neurol* 63, 338-346, 2008.

YUAN, P.X.; HUANG, L.D.; JIANG, Y.M.; GUTKIND, J.S.; MANJI, H.K.; CHEN, G.; The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *Journal of Biological Chemistry* 276(34): 31674-83; 2001.

ZACCO A, TOGO J, SPENCE K, ELLIS A, LLOYD D, FURLONG S, PISER T. 3-Hydroxi-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Protect Cortical Neurons from Excitotoxicity. *J. Neurosci.* 23: 1104-11111, 2003.

ZARRANZ JJ, ALEGRE J, GÓMEZ-ESTEBAN JC, LEZCANO E, ROS R, AMPUERO I, VIDAL L, HOENICKA J, RODRIGUEZ O, ATARÉS B, LLORENS V, GOMEZ TORTOSA E, DEL SER T, MUÑOZ DG, DE YEBENES JG. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* Feb;55(2):164-73, 2004.

ZGALJARDIC DJ, BOROD JC, FOLDI NS, MATTIS P. A review of the cognitive and behavioral sequelae of Parkinson's disease: relationship to frontostriatal circuitry. *Cogn Behav Neurol.* 16:193-210, 2003.

ZHANG X, HENG X, LI T, LI L, YANG D, ZHANG X, DU Y, DOODY RS, LE W. Long-term treatment with lithium alleviates memory deficits and reduces amyloid-beta production in an aged Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis.* 24:739-49, 2011.

ZHU ZF, WANG QG, HAN BJ, WILLIAM CP. Neuroprotective effect and cognitive outcome of chronic lithium on traumatic brain injury in mice. *Brain Res Bull* 83:272-7, 2010.