



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO INSULINOTRÓPICO DEPENDENTE DE GLICOSE (GIP) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS

CLÁUDIA PINTO FIGUEIREDO

Orientador: Prof. Dr. Roger Walz

Co-orientador: Prof. Dr. Rui D. S. Prediger

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Neurociências

Florianópolis/SC
2009

“Além da mente humana e como um impulso livre, cria-se a ciência. Esta se renova, assim como as gerações, frente a uma atividade que constitui o melhor jogo do homo ludens: a ciência é, no mais estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa diversão”

Jacques Barzun

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Célia e Orestes, que me deram asas e raízes para que eu conseguisse voar até aqui.

A Tia Hilda (em memoriam) por me amar, e me fazer acreditar que na vida nada devemos temer, além de ter se dedicado a ensinar-me o exercício do perdão, do amor e da fé em Deus.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho, iluminar minha vida, me consolar nos momentos difíceis que enfrentei durante este período e perdoar-me pelos inúmeros erros que cometo frequentemente. Obrigada por fortalecer minha fé a cada dia.

Ao meu orientador professor Dr. Roger Walz, por ter me encaminhado para o mundo da Neurociências, onde pude me fascinar e me embrenhar cada vez mais. Obrigada Roger, o verdadeiro mestre é aquele que aponta caminhos.

Ao professor Dr. Rui Daniel Prediger, orientador e amigo por excelência, que foi meu porto seguro na finalização deste trabalho de Tese. Obrigada Rui, junto com meu grande amigo Dr. Rodrigo Medeiros, pelas inúmeras oportunidades de colaborações científicas realizadas durante este período.

A professora Dra. Célia Regina Barardi, inesquecível por ter se tornado minha mãe científica, pelo amor mútuo, pela sua valiosa orientação durante o meu mestrado e principalmente por sempre me acolher com ternura e cientificismo.

Muito obrigada de coração ao professor Dr. João B. Calixto, por ter me adotado e aberto as portas do seu Laboratório e principalmente pelo exemplo de competência e dedicação, que guardarei por toda a vida.

A minha amiga e parceira Dra. Tânia L. Mazzuco que despertou meu interesse pelo peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), no qual se tornou o foco do presente trabalho de Tese. Obrigada pelo carinho, amizade e paciência a mim dedicada.

Aos meus pais, Célia e Orestes, porque me permitiram chegar bem mais longe do que eu poderia imaginar um dia. Pelo amor e presença constante e principalmente por acreditaram nos meus sonhos e me apoiarem em todas as minhas decisões (mesmo as mais malucas).

Ao amigo de todas as horas Rodolfo João Ramos que longe das lides do meu dia-a-dia é o suporte familiar por escolha e adoção imprescindível.

Às minhas irmãs, Ana e Carolina, aos meus amados sobrinhos Luís Eduardo e Ana Luísa, e meus cunhados, Alcir e Richart, que são parte integrante desse processo e que buscam compreender as minhas seguidas ausências familiares pela busca dos meus objetivos científicos.

À minha grande amiga Gabriella Di Giunta, uma profissional admirável, pela confiança, carinho e acolhida nos conflitos e alegrias partilhados no desempenho de nossas atividades profissionais no Hospital Universitário. Obrigada por tudo que você me ensinou, desde os conhecimentos histológicos, anatomopatológicos, imunológicos que são impossíveis de mensurar. Até os conselhos sábios e cheios de amor que a mim foram dispensados durante alguns momentos difíceis que enfrentei durante este período de minha vida.

Ao meu amigo Victor Leão da Silva Antunes, pelos dias e noites que nos divertimos estudando juntos os conteúdos das disciplinas do meu doutorado. Obrigada por tornar minha vida mais fácil, divertida e cheia de emoções.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e/ou Centro de Ciências Biológicas, em especial aos professores Adair Roberto Soares dos Santos, Alcir Luiz Dafré, Alexandra S. Latini, Andréia Gonçalves Trentin, Andreza F. de Bem, Carla I. Tasca, Carlos Zanetti, Cláudia Maria Simões, Eduardo Cargnin Ferreira, Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, Marcelo Farina, Mariana Terenzi, Mário Steindel, Odival Gasparotto e Rodrigo Bainy Leal, pelos conhecimentos preciosos obtidos durante as disciplinas e/ou pelas dúvidas solucionadas durante os diversos experimentos, e principalmente pelo carinho a mim dedicado.

Aos amigos do LAFEX (“Calixtolândia”) pela convivência fraterna e boas risadas. Em especial a Alice, Allisson, Andrey, Dani Leite, Diogo, Edinéia, Eliziane, Emerson, Flávia Carla, Fernanda, Gecioni, Jarbas, Juliana Chaves, Juliana Fabris, Kathryn, Maíra Bicca, Maíra Cola, Marianne, Natália, Rafael, Raquel, Ricardo, Robson, Rodrigo Marcon e Stefânia.

Aos amigos e colaboradores, Allisson de Bento, Edinéia Lemos Andrade, Eliziane Patrício, Fabrício Pamplona, Filipe C. Matheus, Flávia Carla, Gecioni Loch Neckel, Giselle Passos, Lucas Nogueira, Maíra Bicca, Marcelo Duzzioni, Nelson de Mello, Rafael Dutra, Rodrigo Medeiros e Tetsade Piermartiri, com os quais os conhecimentos científicos evoluíram, tornando-se corpo e realidade nesta Tese e demais artigos científicos publicados neste período. Em especial a Alice Viana, Aderbal S. Aguiar, Jessie Reyes Carmona e Robson Costa que ficaram literalmente de “plantão” para me auxiliar na finalização da Tese e/ou Qualificação.

Aos colegas do programa de Pós-Graduação em Neurociências, em especial a Diana Sakae, Ezequiel Peyer, Fabiano Córdoba, Fernanda Rosene Melo, Marcelo Libório, Péricles Aruda Mitozo, Renata Pietsch Ribeiro, Simone Molz, Sueli Melo, Tiago Souza dos Santos e Vanessa Valgas, pelo carinho e pelos bons momentos de convivência.

Aos professores Marcelo Farina, Carla Inês Tasca, Alexandra Latini, Flávia Carla Meotti e Ana Lúcia Severo Rodrigues por terem aceitado avaliar este trabalho, no momento da qualificação ou na defesa da tese. Agradeço, também, aos professores doutores João Quevedo e Emílio Streck, por terem se disponibilizado a participar da banca. Certamente, seus conhecimentos irão engrandecer este trabalho.

Aos funcionários do LAFEX, Pedro, Patrícia, Juliana Gonçalves e Aline, que tornaram essa empreitada mais suave. Obrigada pelo carinho, amizade e disponibilidade dispensados.

Ao curso de Pós-Graduação em Neurociências, em especial ao Sr. Nivaldo que esteve sempre disponível para esclarecer dúvidas e encontrar soluções, de forma dedicada e carinhosa.

Resumo

Estudos prévios têm relatado um aumento na proliferação de células progenitoras neuronais, no giro denteado e no bulbo olfatório (BO) de roedores submetidos a diferentes modelos experimentais de epilepsia e doença de Parkinson. Entretanto, os fatores que controlam a proliferação e migração dos progenitores neuronais, bem como sua integração com os circuitos cerebrais não estão totalmente esclarecidos. O peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e seu receptor (GIPR) estão amplamente expressos no hipocampo e no BO do sistema nervoso central (SNC) de animais adultos e parecem estar envolvidos na modulação dos processos de potenciação sináptica, neuroproteção e neurogênese. Sendo assim, o envolvimento do GIP e seu receptor nos mecanismos de neuroplasticidade sugerem uma possível participação dos mesmos na fisiopatologia de doenças como epilepsia, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. O presente estudo demonstrou um aumento na expressão do GIPR no hipocampo e neocórtex, e no BO de ratos submetidos ao *status epilepticus* (SE) induzido pela pilocarpina, ou pela infusão intranasal de MPTP (modelo experimental da doença de Parkinson), respectivamente. Além disso, foi possível caracterizar a presença do GIPR no hipocampo de um paciente com epilepsia de lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo (ELTM-HS), tratado cirurgicamente. O padrão de expressão do GIPR no hipocampo humano foi semelhante ao observado em animais submetidos ao SE induzido pela pilocarpina, sacrificados durante a fase crônica do modelo. De maneira interessante, o pré-tratamento com o agonista do GIPR (GIP₁₋₄₂) foi capaz de prevenir os prejuízos cognitivos e sinápticos induzidos pela administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (modelo experimental da doença de Alzheimer), através da diminuição da expressão das enzimas iNOS e nNOS. Nossos resultados sugerem um possível envolvimento do GIPR nos eventos de neuroplasticidade relacionados com ELTM-HS, doença de Parkinson e com a toxicidade induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀.

Abstract

Previous studies with experimental models of epilepsy and Parkinson's disease (PD) have reported increased proliferation of neural progenitor cells in the dentate gyrus of hippocampus and olfactory bulb (OB). However, the factors controlling the proliferation and migration of adult-born neurons and their connectivity remain essentially unknown. The glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) and its receptor (GIPR) are highly expressed in the hippocampus and OB of rodent's adult brain and have been implicated with synaptic potentiation, neuroprotection and neurogenesis. The GIP and GIPR have been implicated with neuroplasticity and may be related to pathologic mechanisms observed in epilepsy, PD and Alzheimer's disease (AD). In the present study, we demonstrated an increase in GIPR expression in the hippocampus and neocortex, and in the OB of rats submitted to pilocarpine induced *status epilepticus* and intranasal MPTP infusion (an experimental model of PD), respectively. Furthermore, we also demonstrated the GIPR expression, with similar patterns observed in chronic pilocarpine induced *status epilepticus* animals, in one patient with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS) treated surgically. In addition, the pre-treatment of mice with GIPR agonist (GIP₁₋₄₂) was able to prevent the cognitive and synaptic impairment induced by intracerebroventricular A β ₁₋₄₀ infusion (an experimental model of AD), by decrease in iNOS and nNOS enzymes. Our findings suggest a possible role for the GIPR in the neuroplasticity events of MTLE-HS and PD as well as in the toxicity induced by peptide A β ₁₋₄₀.

APRESENTAÇÃO

A presente Tese de Doutorado foi estruturada da seguinte maneira: **Introdução, Objetivos, Artigos científicos publicados, submetidos ou em fase de submissão, Resultados preliminares, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.**

A **Introdução** apresenta um embasamento teórico para a compreensão geral do trabalho. Os Materiais e Métodos, Resultados e Referências Bibliográficas específicas, encontram-se no corpo de cada manuscrito, os quais estão apresentados no formato de **Artigos Científicos** em três capítulos. O quarto capítulo descreve resultados preliminares que serão complementados posteriormente para redação de mais um Artigo Científico.

Na seção **Discussão** buscou-se integrar os resultados obtidos nos diferentes experimentos apresentados nos quatro capítulos do presente trabalho de Tese.

A seção **Referências Bibliográficas** apresenta as referências citadas na Introdução, Discussão e nos Capítulos 1, 2 e 3 da presente Tese.

Os experimentos contidos nesta tese foram desenvolvidos no Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) coordenado pelo Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger e no Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) coordenado pelo Prof. Dr. João Batista Calixto, ambos do Departamento de Farmacologia, CCB/UFSC, sob orientação do Prof. Dr. Roger Walz e co-orientação do Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger.

Parte dos resultados da presente Tese estão contidos nos artigos:

FIGUEIREDO CP, Antunes VLS, De Mello N, Medeiros R, Di Giunta G, Lobão-Soares B, Lin K, Linhares, MN, Mazzuco TL, Prediger RDS, Walz R. Glucose-dependent insulinotropic peptide receptor expression in the hippocampus and neocortex of mesial temporal lobe epilepsy patient and rats submitted to pilocarpine model. Epilepsia, 2009 (submetido).

Prediger RD, Rial D, Medeiros R, FIGUEIREDO CP, Doty RL, Takahashi RN (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.

FIGUEIREDO CP, Viana AF, Aguiar Jr. AS, Costa R, Matheus FC, Mazzuco TL, Walz R, Calixto JB, Prediger RD. The expression of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor (GIPR) in the olfactory bulb of rats infused intranasally with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): Further evidence for the role of GPR in neurogenesis. J Neurochem, 2009 (artigo em preparação para submissão).

Outros trabalhos desenvolvidos durante o período:

Prediger RD, Aguiar AS, Jr., Rojas-Mayorquin AE, FIGUEIREDO CP, Matheus FC, Ginestet L, Chevarin C, Bel ED, Mongeau R, Hamon M, Lanfumey L and Raisman-Vozari R. (2009). "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 (No prelo).

Passos GF, FIGUEIREDO CP, Prediger RD, Pandolfo P, Duarte FS, Medeiros R and Calixto JB (2009). "Role of the macrophage inflammatory protein-1alpha/CC chemokine receptor 5 signaling pathway in the neuroinflammatory response and cognitive deficits induced by beta-amyloid peptide". Am J Pathol 175, 1586-1597.

Tadaiesky MT, Dombrowski PA, FIGUEIREDO CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN (2008). "Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease." Neuroscience 156(4): 830-40.

Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, Dafre AL, Di Giunta G, FIGUEIREDO CP, Takahashi RN, Campos MM, Calixto JB (2007). "Connecting TNF-alpha

signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein." J Neurosci 27(20): 5394-404.

Prediger RD, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, FIGUEIREDO CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL (2007). "Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response." Behav Brain Res 177(2): 205-13.

Rial D, Duarte FS, Xikota JC, Schmitz AE, Dafre AL, FIGUEIREDO CP, Walz R, Prediger RD (2009). "Cellular prion protein modulates age-related behavioral and neurochemical alterations in mice." Neuroscience.

FIGUEIREDO CP, Vitor CE, Hara DB, Bento AF, Mazzuco TL, Calixto JB (2009). "Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, alpha- and beta-amyrin, in a mouse model of colitis." Br J Pharmacol 157(6): 1034-44.

Xikota JC, Rial D, Ruthes D, Pereira R, FIGUEIREDO CP, Prediger RD, Walz R (2008). "Mild cognitive deficits associated to neocortical microgyria in mice with genetic deletion of cellular prion protein." Brain Res 1241: 148-56.

Medeiros R, FIGUEIREDO CP, Passos GF, Calixto JB (2009). "Reduced skin inflammatory response in mice lacking inducible nitric oxide synthase." Biochem Pharmacol 78(4): 390-5.

Rogério AP, Andrade EL, Leite DF, FIGUEIREDO CP, Calixto JB (2009). "Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene alpha-humulene in experimental airways allergic inflammation." Br J Pharmacol.

Medeiros R, Rodrigues GB, FIGUEIREDO CP, Rodrigues EB, Grumman A, Jr., Menezes-de-Lima O, Jr., Passos GF, Calixto JB (2008). "Molecular mechanisms of topical anti-inflammatory effects of lipoxin A(4) in endotoxin-induced uveitis." Mol Pharmacol 74(1): 154-61.

Bolan M, Lima DA, FIGUEIREDO CP, Di Giunta G, Rocha MJ (2008). "Immunohistochemical study of presence of T cells, B cells, and macrophages in periradicular lesions of primary teeth." J Clin Pediatr Dent 32(4): 287-93.

Rodrigues GB, Passos GF, Di Giunta G, FIGUEIREDO CP, Rodrigues EB, Grumman A, Jr., Medeiros R, Calixto JB (2007). "Preventive and therapeutic anti-inflammatory effects of systemic and topical thalidomide on endotoxin-induced uveitis in rats." Exp Eye Res 84(3): 553-60.

Passos GF, FIGUEIREDO CP, Prediger RD, Duarte FS, Leal PC, Medeiros R and Calixto JB (2009). "Involvement of phosphoinositide 3-kinase γ in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by β -amyloid 1-40 peptide in mice". J Pharmacol Exp Ther (JPET), 2009 (**submetido**).

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- β_{1-40} administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. Neurobiology of Disease, 2009 (**submetido**).

Medeiros R, FIGUEIREDO CP, Prediger RD, Pandolfo P, Duarte FS, Passos GF, Prediger RD Calixto JB. The role of TNF- α signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by β -amyloid peptide. British Journal of Pharmacology, 2009 (**submetido**).

Nogueira L., Cardoso FC, Mattos AM, Bordignon J, FIGUEIREDO, CP, Dahlstrom P, Frota CC, Duarte dos Santos CN, Chalhoub, M, Cavada BS, Teixeira HC, Oliveira SC, Barral-Netto M, and Báfica A. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1419 encodes a secreted 13-kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. Eur J Immunology, 2009 (**submetido**).

Dutra RC, Leite DFP, Manjavachi MN, Patrício ES, FIGUEIREDO CP, Bento EF, Pesquero JB, Calixto JB. The role of Kinin B₁ Receptor in the reduction of neuroinflammation and clinical severity in experimental autoimmune encephalomyelitis model mice. Science, 2009 (**submetido**).

Índice

1	Introdução	1
1.1	Peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP): um breve histórico de sua descoberta	1
1.2	Efeitos periféricos do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose	2
1.3	Efeitos centrais do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose	4
1.4	Epilepsia	6
1.5	Doença de Parkinson	10
1.6	Doença de Alzheimer	16
2	Objetivos	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
	CAPÍTULO 1	22
	CAPÍTULO 2	48
	CAPÍTULO 3	57
	CAPÍTULO 4	86
3	Discussão Geral	115
4	Conclusões	125
5	Referências Bibliográficas	127

1 Introdução

1.1 Peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP): um breve histórico de sua descoberta

O peptídeo gástrico insulíntrópico dependente de glicose (GIP) foi a primeira incretina (ou hormônio gastrointestinal) descrita (Brown, 1971). Alguns anos depois, uma segunda incretina foi caracterizada, o peptídeo intestinal denominado peptídeo semelhante ao glucagom do tipo 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide-1*), o qual também apresenta atividade insulíntrópica (Schmidt, Siegel et al., 1985). De forma similar ao GIP, a atividade insulíntrópica do GLP-1 também depende da glicose e ambos atuam de forma sinérgica para a manutenção da liberação da insulina pelo pâncreas.

O GIP é um peptídeo composto por 42 aminoácidos, sintetizado pelas células K do duodeno (Polak, Bloom et al., 1973) e está associado a respostas anabólicas (Beck, 1989). Brown e colaboradores (1974) demonstraram que a administração exógena deste peptídeo, oriundo de extratos intestinais, causava inibição da secreção gástrica, nomeando-o de polipeptídeo inibitório gástrico (GIP, *gastric inhibitory polypeptide*). Posteriormente, este mesmo grupo demonstrou a atividade insulíntrópica desse peptídeo, sugerindo a modificação da nomenclatura do mesmo para polipeptídeo insulíntrópico dependente de glicose (*glucose-dependent insulínotropic peptide*), mantendo o acrônimo GIP (Dupre, Ross et al., 1973). Esses estudos não demonstraram apenas a atividade insulíntrópica do GIP, mas também a dependência da glicose nesta atividade, ou seja, a elevação dos níveis glicêmicos estimula a liberação de insulina mediada pelo GIP (Dupre, Ross et al., 1973; Cataland, Crockett et al., 1974).

1.2 Efeitos periféricos do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose

O receptor do GIP (GIPR) é um membro da família dos receptores acoplados à proteína G e está amplamente distribuído nos órgãos periféricos e no sistema nervoso central (SNC) (Usdin, Mezey et al., 1993; Kaplan e Vigna, 1994). Nas células β do pâncreas, a ligação do GIP aos seus receptores resulta em aumento do AMPc intracelular, seguido de mobilização de cálcio (Ca^{++}) e exocitose das vesículas de insulina, levando, conseqüentemente, ao aumento dos níveis séricos de insulina (Wahl, Plehn et al., 1992). Além disso, evidências mais recentes sugerem que o GIP estimula a transcrição e tradução de genes pró-insulina, podendo ser considerado um fator de crescimento e/ou um agente anti-apoptótico das células β do pâncreas (Trumper, Trumper et al., 2001; Gault, Irwin et al., 2005). O efeito insulíntrópico do GIP sobre as células β do pâncreas parece ser o principal efeito fisiológico deste peptídeo (Yip e Wolfe, 2000), entretanto, a caracterização do GIPR em diferentes tecidos sugere a existência de mecanismos adicionais, extra-pancreáticos, do peptídeo sobre o metabolismo da glicose (Irwin, Green et al., 2006).

Entre os principais efeitos extra-pancreáticos do GIP na manutenção da glicemia, podem-se destacar sua capacidade de inibir a secreção gástrica (Brown, 1974; Brown, Cleator et al., 1974; Brown, Dryburgh et al., 1975), atenuar a produção hepática de glicose (Gault, Irwin et al., 2005), estimular a captação de glicose no tecido muscular (O'Harte, Gray et al., 1998) e aumentar tanto a síntese de ácidos graxos como a atividade da lipase lipoproteica em adipócitos (Oben, Morgan et al., 1991; Knapper, Puddicombe et al., 1993). Adicionalmente, estudos utilizando camundongos transgênicos com expressão aumentada do gene do GIP sugerem que o mesmo possui outros efeitos não associados ao metabolismo da glicose (pelo menos de forma direta), como aumento da reabsorção óssea (Xie, Cheng et al.,

2005; Xie, Zhong et al., 2007) e melhor desempenho nos testes comportamentais para avaliação da atividade motora e de exploração (Ding, Zhong et al., 2006).

A seqüência de aminoácidos do GIP (Tseng, Jarboe et al., 1993) sugere que este polipeptídeo é membro de uma família de hormônios estruturalmente relacionados, incluindo a secretina glucagom, e os peptídeo semelhantes ao glucagom do tipo 1 e 2 (*glucagon-like peptides* 1 e 2) (GLP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), fator liberador do hormônio do crescimento (GHRF), e do polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP). É importante ressaltar que ambas as incretinas, GIP e GLP, são rapidamente degradadas por uma enzima chamada Dipeptidil Peptidase do tipo 4 (DPP4) depois de liberadas na circulação sanguínea (Daousi, Wilding et al., 2009; Havale e Pal, 2009; Nuche-Berenguer, Moreno et al., 2009; Salvatore, Carbonara et al., 2009; Siddiqui, 2009).

A ausência da secreção dessas incretinas ou um aumento na sua degradação, não parece ser um fator importante na patogenicidade do diabetes. Estudos relatam que as concentrações plasmáticas do GIP no diabetes do tipo 2 (DM2), são normais ou elevadas (Ross, Brown et al., 1977; Vilsboll, Krarup et al., 2001), mas seu efeito insulínico é deficiente, mesmo em concentrações supra-fisiológicas (farmacológicas). Apesar dos mecanismos relacionados à reduzida resposta do GIP na estimulação das células β do pâncreas não sejam claros, alguns estudos sugerem que a hiperglicemia altera a resposta fisiológica desse peptídeo, resultando em uma diminuição da expressão e/ou atividade do GIPR (Lynn, Pamir et al., 2001; Zhou, Livak et al., 2007). Um estudo recente demonstrou que a manutenção da glicemia em níveis próximos da normalidade resulta em uma melhora da resposta à insulina induzida pelos peptídeos GIP e GLP-1 em pacientes portadores de DM2 (Hojberg, Vilsboll et al., 2009)

1.3 Efeitos centrais do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose

O metabolismo normal da glicose é mantido não só pelos hormônios pancreáticos, insulina e glucagon, mas também pelos hormônios gastrointestinais, como GIP e GLP (Baggio e Drucker, 2007; Salehi, Aulinger et al., 2008). Durante muito tempo, a insulina foi conhecida pelo seu importante efeito no metabolismo energético periférico. Entretanto, nos últimos 25 anos, fortes evidências sugerem que a insulina também desempenha um papel fundamental no metabolismo energético do SNC (Havrankova, Roth et al., 1978; Unger, Livingston et al., 1991; Reagan, Gorovits et al., 2001). A insulina, os receptores de insulina, e os transportadores de glicose sensíveis à insulina (GLUTs) foram identificados em estruturas temporais mesiais do SNC, relacionadas com fenômenos cognitivos, as quais são comprometidas pela doença de Alzheimer (Unger, Livingston et al., 1991; Unger, Moss et al., 1991; Braak e Braak, 1997; Apelt, Mehlhorn et al., 1999) e pela epilepsia de lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo.

Curiosamente, estudos recentes descreveram um papel importante das incretinas intestinais, GIP e GLP, em fenômenos relacionados com o desenvolvimento e/ou regeneração de nervos e mecanismos de sobrevivência neuronal (Rayan, Johnson et al., 1995; Waschek, 1995; Klimaschewski, 1997; Lioudyno, Skoglosa et al., 1998; Zhang, Liu et al., 2002; Martin, Lopez de Maturana et al., 2005; Pavelock, Girard et al., 2007).

Abankwa e colaboradores (2002) demonstraram modificações temporais nos padrões de expressão gênica do GIP após a transecção do fórnix comissural. Curiosamente, observou-se que um aumento significativo da expressão do gene que codifica o GIP após a lesão de fórnix (Abankwa, Kury et al., 2002). Adicionalmente, o mesmo grupo de pesquisadores confirmou estes resultados utilizando um modelo de

lesão de nervo ciático. Esta lesão promoveu um aumento na regulação do mRNA que codifica o GIP e GIPR no gânglio da raiz dorsal (DRG) e nos segmentos da medula espinhal acometidos pela lesão, bem como nas regiões proximal e distal do nervo (Buhren, Gasis et al., 2009). De maneira interessante, estudos *in vivo* utilizando animais transgênicos com deficiência no gene do GIPR sugerem um papel crítico da via de sinalização GIP/GIPR na indução da regeneração espontânea após lesão traumática do nervo ciático. Neste experimento, os animais nocautes para o gene do GIPR apresentaram prejuízos na regeneração axonal quando comparados com os animais do tipo selvagem (Abankwa, Kury et al., 2002; Buhren, Gasis et al., 2009).

Um estudo recente descreveu a participação do GLP-1 na manutenção da estimulação de neurônios corticais em modelos experimentais de isquemia e doença de Parkinson e culturas de neurônios dopaminérgicos (Li, Perry et al., 2009). Este mesmo estudo demonstrou que o tratamento com exendina-4 (Ex-4), um agonista do receptor do GLP-1, foi capaz de proteger a degeneração dos neurônios dopaminérgicos com manutenção dos níveis de dopamina induzida pela administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), melhorando os prejuízos motores de camundongos (Li, Perry et al., 2009).

Gault e colaboradores (Gault e Holscher, 2008) descreveram a participação direta do GIP na liberação de neurotransmissores e na indução da potenciação de longa duração (LTP, *Long-term potentiation*) em fatias de hipocampo. Adicionalmente, foi demonstrado que o GIP protege as sinapses da toxicidade induzida pela forma agregada do peptídeo $A\beta_{1-42}$ (Gault e Holscher, 2008; Gault e Holscher, 2008), e que as incretinas GLP-1 e GIP apresentam propriedades neuroprotetoras, sugerindo uma possível utilização desses peptídeos na redução

dos processos degenerativos característicos da doença de Alzheimer (DA) (Holscher e Li, 2008).

No entanto, não existem estudos *in vivo* que avaliem a modulação da expressão do GIPR ou o possível efeito do GIP tanto nos prejuízos cognitivos e sinápticos quanto nos mecanismos de plasticidade sináptica, e principalmente nos mecanismos neurodegenerativos característicos de algumas doenças neurológicas. Embora tenha sido demonstrada a existência de grandes quantidades de GIP e do seu receptor (GIPR) em diferentes estruturas cerebrais (incluindo o hipocampo e o bulbo olfatório) de mamíferos, com demonstração da sua possível associação com os fenômenos de neurogênese, as funções exercidas por esse peptídeo no SNC ainda não estão esclarecidas (Usdin, Mezey et al., 1993; Kaplan e Vigna, 1994). Diante disto, no presente estudo investigamos possíveis alterações na expressão do GIPR no SNC frente à indução de modelos experimentais de doenças neurológicas aonde sabidamente existe um processo neurodegenerativo associado, em destaque, a epilepsia de lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH) e as doenças de Parkinson e Alzheimer.

1.4 Epilepsia

As epilepsias são transtornos neurológicos caracterizados pela ocorrência de crises epiléticas espontâneas e recorrentes (Morrell e deToledo-Morrell, 1999; Engel, 2001). As crises epiléticas são distúrbios transitórios caracterizados por disfunção cerebral, devido à descarga neural excessiva, com manifestações clínicas que podem variar desde manifestações complexas de comportamento, sendo as últimas com grau variável de comprometimento da consciênciav (Lothman, Bertram et al., 1991; McNamara, 1994; Delgado-Escueta, Wilson et al., 1999; McNamara,

1999). A epilepsia de lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH) é o tipo mais freqüente de epilepsia refratária ao tratamento farmacológico, sendo caracterizada pela ocorrência de crises parciais complexas (Kale, 1997; Hauser, Rich et al., 1998). O sistema límbico, principalmente o hipocampo, parece ser responsável pelo início e pela propagação das crises epilépticas da ELTM-EH.

Em relação aos padrões neuroquímicos, a epilepsia de lobo temporal é caracterizada tanto por disfunções neuronais quanto das células gliais (astrócitos e microglias) (Connors e Gutnick, 1990; Ullah, Cressman et al., 2009). As crises epilépticas são o resultado de descargas recorrentes em neurônios excitatórios, gerando um desequilíbrio nos circuitos neuronais das regiões acometidas, e hiperexcitabilidade (Coutinho-Netto, Abdul-Ghani et al., 1981; Reynolds, 1995). Este desequilíbrio parece estar associado em parte a alterações nos sistemas de neurotransmissão, como o comprometimento da transmissão inibitória (mediada por GABA), e/ou estimulação da transmissão excitatória (glutamatérgica) (Dichter e Ayala, 1987; Meldrum, Akbar et al., 1999; Coulter, 2001). Conseqüentemente, o aumento dos níveis extracelulares de glutamato pode resultar em hiperexcitabilidade dos circuitos neuronais com modificações, tanto estruturais como funcionais, no fenômeno de plasticidade sináptica, além de excitotoxicidade e perda neuronal (Cavalheiro, Leite et al., 1991; Coulter, 2001).

A avaliação histopatológica do hipocampo de pacientes com ELTM-EH evidencia uma perda neuronal seletiva, em especial na região CA1, CA3 e giro denteado (GD), associada com reorganização sináptica com brotamento das fibras musgosas (Murray, Lopez et al., 1994; Kale, 1997). Estudos clínicos e experimentais indicam que a epileptogênese na ELTM-EH é, em uma grande parte dos casos,

deflagrada por um insulto cerebral precipitante na infância (crise epiléptica febril, crise epiléptica prolongada, meningite), seguido de um período silente variável, até o surgimento de crises recorrentes, em geral na segunda década de vida. Um modelo clássico de indução de ELTM-EH é o do *Status Epilepticus* (SE) induzido por injeção sistêmica de pilocarpina (Cavalheiro, Leite et al., 1991; Leite, Garcia-Cairasco et al., 2002) ou ácido caínico (Ben-Ari, 1985). O uso desses modelos tem permitido a elucidação de possíveis mecanismos envolvidos na gênese, manutenção e evolução das diversas epilepsias (Bonan, Walz et al., 2000; Leite, Garcia-Cairasco et al., 2002; Walz, Castro et al., 2002). A pilocarpina, geralmente administrada por via sistêmica, produz um estado de mal epiléptico (EME) relacionado à excitotoxicidade glutamatérgica (Cavalheiro, Leite et al., 1991), indução dos processos oxidativos celulares, necrose e/ou apoptose (Dal-Pizzol, Klamt et al., 2000).

O modelo animal de ELTM-EH induzida pela pilocarpina reproduz de forma bastante satisfatória as manifestações comportamentais, eletrofisiológicas e histopatológicas da ELTM-EH em humanos. Nesse modelo, o insulto precipitante inicial é uma crise convulsiva prolongada ou EME (Kale, 1997). Esse insulto, por sua vez, promove modificações estruturais e funcionais no cérebro dos animais, os quais invariavelmente passam a apresentar crises epilépticas límbicas espontâneas, em sua grande maioria, originadas no hipocampo e propagadas para o córtex (período crônico). As crises surgem em média 15 dias (variando de 5 a 45 dias, com DP \pm 12 dias) após o EME. O modelo é bastante útil para o estudo das diferentes fases do processo de epileptogênese induzido por uma crise epiléptica prolongada.

Lesões corticais e hipocampais (Connors e Gutnick, 1990; Prince e Tseng, 1993; Hoffman, Salin et al., 1994) são capazes de modificar as características dos circuitos neuronais da região lesada ou mais distantes, e induzir alterações na

fisiologia intrínseca do neurônio, levando ao surgimento de “neurônios epiléticos”. Os mecanismos responsáveis pela epileptogênese não são plenamente compreendidos (Cavalheiro, Leite et al., 1991). Inúmeras hipóteses têm sido sugeridas para explicar a fisiopatologia da doença, entre elas a que estabelece uma relação entre crises epiléticas, ativação e/ou inibição de diferentes vias de sinalização celular e dano neuronal.

Outro aspecto relevante na fisiopatologia da ELTM-EH é a ocorrência de neurogênese no hipocampo, principalmente na região do GD. A relação entre neurogênese e epileptogênese tem sido amplamente investigada (Prince e Tseng, 1993; Hoffman, Salin et al., 1994; Parent, Yu et al., 1997; Yang, Liu et al., 2009). Estudos recentes demonstraram que as crises epiléticas aumentam a neurogênese no hipocampo de ratos adultos (Varodayan, Zhu et al., 2009; Yang, Liu et al., 2009). Entretanto, as crises prolongadas resultam em neurogênese aberrante no hipocampo o que, na maioria das vezes, leva a um circuito excitatório recorrente que contribui para a epileptogênese (Yang, Liu et al., 2009).

Nyberg e colaboradores (2005) demonstraram que o aumento na expressão do gene que codifica o GIP está associado com o aumento da proliferação celular no giro denteado do hipocampo de roedores. Sabendo que o GIPR está amplamente distribuído nas estruturas do sistema límbico e que a função deste receptor no hipocampo ainda é desconhecida (Nyberg, Jacobsson et al., 2007), o presente estudo investigou os níveis de expressão protéica do GIPR no hipocampo e córtex nas diferentes fases do modelo de ELTM-EH induzido pela pilocarpina, e sua associação com a perda neuronal ocorrida neste modelo. Como a expressão do GIP ainda não foi demonstrada em tecido cerebral humano, nós investigamos a presença

ou não de expressão de GIP no hipocampo e neocórtex de um paciente portador de ELTM-EH tratado cirurgicamente.

1.5 Doença de Parkinson

A DP é caracterizada, histologicamente, pela diminuição no número de neurônios dopaminérgicos, localizados na substância negra parte compacta (SNc). Esses neurônios são responsáveis por enviar projeções ao neocortex e regiões subcorticais incluindo, os gânglios da base, regiões em que se observa uma marcada redução nos níveis de dopamina (DA) na DP (Jellinger, 1988; Lindner, Cain et al., 1999; Blandini, Nappi et al., 2000; Araki, Mikami et al., 2001). A segunda característica neuropatológica da DP é o aparecimento de inclusões eosinofílicas citoplasmáticas denominadas corpos de *Lewy*, compostas principalmente pelo acúmulo das proteínas α -sinucleína e ubiquitina (Korczyn, 1995; Hagan, Middlemiss et al., 1997; Blandini, Nappi et al., 2000). Estas inclusões parecem se acumular em neurônios que se encontram em processo de degeneração, particularmente em neurônios dopaminérgicos da SNc, sendo por esta razão utilizadas como um dos marcadores histopatológicos da DP (Korczyn, 1995; Hagan, Middlemiss et al., 1997). Embora os corpos de *Lewy* possam também ser encontrados no cérebro de idosos normais, verificou-se a presença destas inclusões em aproximadamente 85% das autópsias de pacientes clinicamente diagnosticados como portadores da DP (REF).

Desde a sua descrição inicial, feita pelo médico inglês James Parkinson (1817) em seu estudo "*Essay on the shaking palsy*" (Ensaio da Paralisia Agitante), a DP vinha sendo caracterizada como um distúrbio exclusivamente do movimento, sendo o seu diagnóstico baseado na presença de dois ou mais sintomas motores (ex: rigidez, bradicinesia, tremor e perda do reflexo postural) (Parkinson, 1817).

Entretanto, os pacientes parkinsonianos somente desenvolvem esses critérios clínicos quando aproximadamente 60-70% dos neurônios da SNc encontram-se degenerados e os níveis estriatais de DA são reduzidos em 70-80% (Riederer e Wuketich, 1976; Jellinger, Braak et al., 1991; Barrio, Huang et al., 1997; Lindner, Cain et al., 1999). A baixa efetividade clínica de diversas drogas e agentes neuroprotetores testados no tratamento da DP deve-se, em parte, ao diagnóstico tardio, quando o processo neurodegenerativo encontra-se bastante avançado. A identificação dos pacientes nos estágios iniciais da DP parece ser essencial para o sucesso de novas estratégias terapêuticas.

Posteriormente, o francês Jean Marie Charcot, um dos fundadores da neurologia moderna, sugeriu a mudança de nome da enfermidade, de “Paralisia Agitante”, para doença de Parkinson (*“la maladie de Parkinson”*), em homenagem à descrição clássica de James Parkinson. Além disso, Charcot acrescentou outras informações clínicas relevantes, como a presença de alteração postural, micrografia, rigidez muscular e bradicinesia, de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico diferencial e conseqüente tratamento da doença (Duvoisin, 1991). Ainda, Charcot discordou da descrição inicial de James Parkinson, que relatava preservação das funções corticais superiores nos pacientes portadores da doença, sendo caracterizada, pela primeira vez, a presença de perda da memória e disfunção cognitiva na DP (Meneses e Teive, 1996).

Atualmente, o tratamento farmacológico utilizado na DP consiste no restabelecimento da disfunção dopaminérgica através da administração de precursores de dopamina (ex: L-DOPA), agonistas dopaminérgicos (ex: bromocriptina) e inibidores da degradação da mesma (ex: selegilina), além de antagonistas colinérgicos (Hely, Fung et al., 2000; Hely, Morris et al., 2005).

Entretanto, esses fármacos representam alternativas meramente paliativas para o tratamento da DP, uma vez que não interferem diretamente no processo neurodegenerativo. Adicionalmente, os fármacos atualmente utilizados causam efeitos colaterais agudos e tardios, com efeitos periféricos incluindo distúrbios gastrintestinais, hipotensão ortostática, bradicardia, taquicardia, arritmia, boca seca e cefaléias; e efeitos centrais como ataxia, distúrbios motores e do sono, e deficiências cognitivo-psiquiátricas (Hely, Fung et al., 2000; Kariya, Takahashi et al., 2005). Um estudo clínico duplo-cego recente (Olanow, Rascol et al., 2009), avaliou os possíveis efeitos do tratamento com Rasagilina (1 mg ou 2 mg/dia) sobre a progressão da DP. Nesse estudo foram incluídos 1.176 indivíduos com DP não tratada, sendo distribuídos de acordo com o estágio da doença, ou seja, um grupo foi tratado precocemente e outro tardiamente com Rasagilina, um inibidor da monoamina oxidase (IMAO), ou placebo durante 36 semanas consecutivas (Olanow, Rascol et al., 2009). A efetividade do tratamento foi analisada de acordo com a “Escala Unificada de Estadiamento da Doença de Parkinson” (UPDRS, *Unified Parkinson’s Disease Rating Scale*) (Fahn e Elton, 1987). Olanow e colaboradores concluíram que o tratamento precoce com Rasagilina (1 mg/dia) apresenta benefícios quando comparado com o grupo placebo, entretanto o mesmo não ocorreu com a dose de 2 mg/dia (Olanow, Rascol et al., 2009).

A causa primária da DP é ainda desconhecida, entretanto, a visão geral é de que ela se trata de uma doença multifatorial, ocorrendo uma possível interação entre fatores genéticos e ambientais. A maioria dos casos de DP é esporádica e estudos epidemiológicos têm revelado que além da idade avançada, alguns fatores ambientais estão associados a um aumento na sua incidência, como por exemplo, vida no meio rural, exposição a herbicidas, pesticidas e algumas toxinas presentes

no ambiente (Gorell, Johnson et al., 1998). Neste contexto, é importante ser enfatizada a potencial toxicidade de contaminantes ambientais que alcançam o SNC através do sistema olfatório. Estudos prévios têm demonstrado que a administração intranasal (i.n.) de vírus (Barnett e Perlman, 1993) ou cádmio (Hastings e Evans, 1991), bem como a inalação de alumínio (Zatta, Favarato et al., 1993) ou manganês (Gorell, Johnson et al., 1997; Normandin, Ann Beaupre et al., 2004) resultam na sua deposição no SNC e produzem efeitos neurotóxicos que podem estar associados à etiologia da DP (Gorell, Johnson et al., 1997).

Além do envolvimento de fatores ambientais no desenvolvimento da DP, desde meados dos anos 90, com o progresso da biologia molecular, foram identificados alterações genéticas específicas associadas à DP (Latourelle, Pankratz et al., 2009). Mutações em genes que codificam para a proteína α -sinucleína (PARK1) e para duas enzimas do sistema ubiquitina-proteossoma (SUP), parkina (PARK 2) e ubiquitina hidrolase C-terminal L1 (UCH-L1), têm sido envolvidas com a neurodegeneração observada em algumas formas de DP familiar (Hattori, 2002; Hilker, Klein et al., 2002; McNaught, Belizaire et al., 2003; Latourelle, Pankratz et al., 2009). A maioria dos casos familiares da DP está associada com mutações no gene da parkina (PARK 2) (Kitada, Asakawa et al., 1998; Hilker, Klein et al., 2002), o que resulta na forma mais comum de parkinsonismo autossômico recessivo (Lucking e Brice, 2000), sendo responsável por aproximadamente 15% dos casos de DP com desenvolvimento precoce (antes dos 45 anos de idade) (Periquet, Latouche et al., 2003). Uma das principais funções de PARK2 parece depender de sua interação com uma serina/treonina proteína quinase mitocondrial conhecida como PINK1 ou PARK6 (Clark, Dodson et al., 2006; Park, Choi et al., 2006). Defeitos no gene que

codifica para esta proteína são também responsáveis por formas familiares, embora menos freqüentes, da DP (Park, Kim et al., 2009).

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 compostos como reserpina, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), MPTP, paraquate, manebe, rotenona e ferro (Gerlach e Riederer, 1996; Dawson, 2000; Shimohama, Sawada et al., 2003; Prediger, Batista et al., 2006; Prediger, Aguiar et al., 2009; Prediger, Rial et al., 2009). Um importante avanço no desenvolvimento dos modelos animais da DP, bem como no entendimento dos mecanismos relacionados ao processo neurodegenerativo desta doença, ocorreu com a descoberta do MPTP no início da década de 80 (Langston e Ballard, 1983). De maneira interessante, o uso do MPTP foi um dos raros casos em que os efeitos da neurotoxina foram descobertos primeiramente em humanos, sendo posteriormente desenvolvido o modelo animal. A capacidade do MPTP em 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, Williams et al., 1979; Langston e Ballard, 1983; Ballard, Tetrud et al., 1985) a partir desse momento, a administração do MPTP à animais de laboratório (principalmente roedores e primatas) passou a ser utilizado como um modelo para o estudo da DP (Gerlach e Riederer, 1996; Dawson, 2000; Dauer e Przedborski, 2003; Shimohama, Sawada et al., 2003; Prediger, Batista et al., 2006; Prediger, Aguiar et al., 2009).

Os efeitos do MPTP são dependentes da espécie estudada, sendo que em primatas (homens, macacos e babuínos) o MPTP induz sintomas e alterações neuroquímicas praticamente indistinguíveis da DP (Langston e Ballard, 1983; Kopin e Markey, 1988). Já 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 de tratamento, da linhagem estudada e da idade dos animais (Schmidt e Ferger, 2001; Sedelis, Schwarting et al., 2001).

Em 2006, Prediger e colaboradores demonstraram que a administração i.n. de MPTP em ratos Wistar adultos (3 meses de idade) resulta em prejuízos olfatórios, cognitivos e motores, observados nos testes comportamentais de discriminação olfatória, labirinto aquático de Morris e campo aberto, respectivamente. Além disso, a infusão i.n. de MPTP foi capaz de reduzir a expressão de tirosina hidroxilase (TH) no bulbo olfatório (BO) e SN de ratos, resultando em uma redução significativa na concentração de dopamina no BO, córtex pré-frontal e estriado (Prediger et al., 2006). Esses resultados reforçam a hipótese que considera o sistema olfatório uma via particularmente sensível ao transporte de neurotoxinas para o SNC, podendo estar relacionado com a etiologia da DP (Doty, 2008). Adicionalmente, as disfunções olfatórias, cognitivas e motoras observadas nos ratos submetidos à administração i.n. de MPTP são dependentes do tempo, e parecem estar relacionadas com diferentes estágios da DP em humanos, sugerindo que o modelo do MPTP i.n. seja uma ferramenta importante no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da DP (Prediger, Batista et al., 2006; Prediger, Aguiar et al., 2009; Prediger, Rial et al., 2009).

Sabendo que o GIPR está amplamente distribuído em diferentes estruturas do cérebro, principalmente no BO (Usdin, Mezey et al., 1993; Nyberg, Jacobsson et al., 2007), e que a função desse receptor no SNC ainda é desconhecida, o presente estudo também investigou a expressão do GIPR no BO e SN de ratos submetidos ao modelo experimental da DP induzido pela administração i.n. de MPTP.

1.6 Doença de Alzheimer

A característica clínica proeminente da doença de Alzheimer (DA) é a perda progressiva nas funções cognitivas. Inicialmente, ocorre prejuízo do aprendizado e da memória de curto-prazo, sem alteração em outras funções cognitivas. Em seguida, são observadas mudanças na memória de longo-prazo, na orientação e nas funções executivas como concentração e planejamento. Também podem ocorrer alterações na personalidade e no comportamento, tais como irritabilidade, ansiedade, agitação ou mesmo alucinações. Com a progressão da doença, é observada a deterioração da linguagem, habilidades visuo-espaciais e funções motoras (Teri, Borson et al., 1989; Clark, Bosworth et al., 2000; Petrella, Coleman et al., 2003; Walsh e Selkoe, 2004). A sobrevida média dos pacientes após o diagnóstico inicial é de 5 a 10 anos, podendo chegar a 20 anos em alguns casos (Walsh, Welch et al., 1990).

A doença de Alzheimer é multifatorial, ou seja, resultante de uma combinação de fatores ambientais e genéticos. Além do envelhecimento, que constitui o principal fator de risco associado à doença, outros fatores têm sido sugeridos com base em estudos epidemiológicos. Dentre estes, destacam-se baixa escolaridade, traumatismo craniano associado à perda de consciência, sexo feminino, depressão,

diabetes melitus, hipertensão arterial, tabagismo, hiperinsulinemia, sedentarismo, fibrilação atrial, além de fatores nutricionais e genéticos (Cotman e Berchtold, 2002; Ritchie e Lovestone, 2002; Gorelick, 2004; Luchsinger e Mayeux, 2004; Mattson, 2004).

Do ponto de vista genético, a DA apresenta um caráter heterogêneo, tendo sido descritas as formas familiar e esporádica. A forma familiar da doença tem herança autossômica dominante e o início dos sintomas clínicos geralmente ocorre antes dos 65 anos de idade, sendo considerada a forma mais rara (5–10% do total de casos) (Poirier, 2005). Mutações em genes codificadores para a proteína precursora do peptídeo β -amilóide (APP), e das proteínas associadas com a formação dos fragmentos tóxicos de amilóide, como presenilina 1 (PSEN1), presenilina 2 (PSEN2), apolipoproteína E (especificamente ao alelo $\epsilon 4$), e proteína relacionada ao receptor de LDL, são os principais responsáveis pelos casos da forma familiar da DA (Levy-Lahad, Lahad et al., 1995; Sherrington, Rogaev et al., 1995; Fox, Kennedy et al., 1997; Blennow, de Leon et al., 2006). Todavia, mutações nesses genes, nos casos de doença esporádica, não estão descartadas.

As principais alterações neuropatológicas verificadas no cérebro dos pacientes portadores da DA incluem atrofia cortical difusa, presença de um grande número de placas senis, com acúmulo de peptídeos $A\beta$, e hiperfosforilação da microtubulina tau. Os emaranhados neurofibrilares presentes no cérebro destes pacientes também apresentam hiperfosforilação da proteína tau com conseqüentes modificações oxidativas, além de degenerações grânulo-vacuolares associadas à perda neuronal (Sisodia e Price, 1995; Selkoe, 1999). As placas senis e os emaranhados neurofibrilares estão presentes, principalmente, nas regiões do

cérebro envolvendo aprendizado, memória e comportamento emocional, como o córtex, hipocampo e amígdala (Mattson, 2004).

As placas senis são depósitos extracelulares de fibrilas e agregados amorfos de peptídeo A β , composto essencialmente por 40 ou 42 aminoácidos (Glennner e Wong, 1984). Acredita-se que a concentração desses peptídeos nas placas senis esteja correlacionada ao grau de demência dos indivíduos afetados (Selkoe, 1994). O peptídeo A β é gerado pela clivagem da proteína precursora amilóide (Haass e De Strooper, 1999). A APP é uma proteína transmembranar que, em situações fisiológicas (ou via não-amiloidogênica), sofre duas clivagens enzimáticas; primeiramente pela ação da enzima α -secretase e, em seguida, pela enzima γ -secretase, com conseqüente formação do fragmento p3, atóxico. Na via amiloidogênica (não fisiológica), a APP é inicialmente clivada por uma protease aspártica, denominada β -secretase, gerando proteínas precursoras amilóide β (sAPP β) e resíduos C-terminal (CTF β) do fragmento β . CTF β é então clivado pela γ -secretase que produz CTF γ e fragmentos A β (Haass, 2004; Mattson, 2004; LaFerla, Green et al., 2007).

Diversos componentes parecem estar envolvidos no desenvolvimento e na progressão da doença, em especial o efeito do peptídeo A β nos processos inflamatórios, na modulação das sinapses e indução da potenciação de longa duração (LTP, *Long-term potentiation*), nos fenômenos oxidativos, e na ruptura da homeostase do metabolismo celular. Os mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade da A β são complexos e parecem estar associados com o desequilíbrio nas concentrações intracelulares dos íons cálcio e potássio, perda da função mitocondrial, redução do metabolismo cerebral da glicose, indução de estresse oxidativo, e ativação da morte celular programada (apoptose) (Gomez-Isla,

Hollister et al., 1997; Zhu, Su et al., 2007). A ocorrência de disfunção na neurotransmissão colinérgica, incluindo na enzima acetilcolinesterase (responsável pela degradação da acetilcolina), são freqüentes na doença de Alzheimer (Blennow, de Leon et al., 2006). Além disso, tem sido demonstrado que a ocorrência de um processo neuro-inflamatório crônico contribui de maneira decisiva nos fenômenos neurodegenerativos da doença (McGeer e McGeer, 1998; Minghetti, Ajmone-Cat et al., 2005).

A redução do metabolismo cerebral da glicose na DA é um fato marcante (Gibson, Karuppagounder et al., 2008). Recentemente, Gault e colaboradores (2008b) descreveram a participação direta do GIP na liberação de neurotransmissores e na indução da potenciação de longa duração (LTP) em fatias de hipocampo. Adicionalmente, foi demonstrado que o GIP protege as sinapses da toxicidade induzida pela forma agregada do peptídeo A β ₁₋₄₂ (Gault e Holscher, 2008; Gault e Holscher, 2008), e que as incretinas GLP-1 e GIP apresentam propriedades neuroprotetoras, sugerindo uma possível utilização desses peptídeos na redução dos processos degenerativos característicos da DA (Holscher e Li, 2008). Entretanto, não existem estudos *in vivo* avaliando o possível efeito do GIP nos prejuízos cognitivos e sinápticos, e nos mecanismos inflamatórios e oxidativos induzidos pela A β , bem como a quantidade de informações sobre o possível efeito do GIP no SNC, ainda é limitada.

Diante disso, no presente estudo avaliamos os efeitos do pré-tratamento com GIP, administrado pela via intracerebroventricular (i.c.v.) nos prejuízos cognitivos e sinápticos, no aumento da proteína pró-inflamatória TNF- α , e das enzimas iNOS e nNOS, induzidos pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀, em camundongos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão do GIPR em estruturas cerebrais de roedores submetidos a modelos experimentais de doenças neurológicas, nas quais sabidamente existe um processo neurodegenerativo associado. Além disso, investigar o efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.) do GIP nos déficits cognitivos e mecanismos de sinaptotoxicidade induzidos pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar uma possível modificação no padrão de expressão do GIPR em diferentes sub-regiões do hipocampo e neocórtex de animais submetidos ao modelo experimental de ELTM-EH induzido pela administração sistêmica de pilocarpina.
- Caracterizar a expressão do GIPR em secções histológicas de hipocampo e neocórtex humano retirados de um paciente portador de ELTM-EH após o tratamento cirúrgico.
- Analisar a associação entre a expressão do GIPR e a degeneração neuronal, através da técnica de Fluoro-Jade no hipocampo e neocórtex de animais submetidos ao modelo experimental de ELTM-EH induzido pela administração sistêmica de pilocarpina.

- Analisar a associação entre a expressão do GIPR e degeneração neuronal, através da técnica de Fluoro-Jade no hipocampo e neocórtex de um paciente portador de ELTM-EH tratado cirurgicamente.
- Avaliar os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a expressão da Caspase-3 clivada e da TH em diferentes regiões sub-corticais de ratos.
- Avaliar a existência de modificações na expressão do GIPR em diferentes regiões sub-corticais do encéfalo de ratos submetidos ao modelo de Parkinson induzido pela administração i.n. de MPTP.
- Avaliar o efeito do agonista do GIPR sobre o prejuízo cognitivo e alterações sinápticas induzidas pela administração i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$.
- Avaliar o efeito do agonista do GIPR sobre o aumento na expressão das enzimas iNOS e nNOS e do TNF- α induzido pela administração i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$.

CAPÍTULO 1

*GLUCOSE-DEPENDENT INSULINOTROPIC PEPTIDE RECEPTOR EXPRESSION
IN THE HIPPOCAMPUS AND NEOCORTEX OF MESIAL TEMPORAL LOBE
EPILEPSY PATIENT AND RATS SUBMITTED TO PILOCARPINE MODEL*

Manuscrito submetido à revista *Epilepsia*.

Glucose-dependent insulintropic peptide receptor expression in the hippocampus and neocortex of mesial temporal lobe epilepsy patient and rats submitted to pilocarpine model

Journal:	<i>Epilepsia</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Full length original research paper
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Figueiredo, Claudia; UFSC, SAP/HU Antunes, Victor; UFSC, SAP/HU de Mello, Nelson; UFSC, Pharmacology Medeiros, Rodrigo; UFSC, Pharmacology Di Giunta, Gabriella; UFSC, SAP/HU Lobão-Soares, Bruno; Instituto Internacional e Neurociências de Natal (ELS), Neurociencias Lin, Katia; HGCR, Centro de Epilepsia de Santa Catarina Linhares, Marcelo; HGCR, Centro de Epilepsia de Santa Catarina Mazzuco, Tania; Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Service d'Endocrinologie et Laboratoire de Pathophysiologie Endocrinienne Prediger, Rui; UFSC, Pharmacology Walz, Roger; HGCR, Centro de Epilepsia de Santa Catarina; UFSC, Clinica Medica
Key Words:	Mesial temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, glucose-dependent insulintropic peptide receptor

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

**Glucose-dependent insulinotropic peptide receptor expression in the
hippocampus and neocortex of mesial temporal lobe epilepsy patient and rats
submitted to pilocarpine model**

Running title: GIPR expression in MTLE-HS

Cláudia P. Figueiredo^{1,2}, Victor L.S. Antunes^{1,2}, Nelson de Mello^{2,3}, Rodrigo Medeiros³,
Gabriella Di Giunta¹, Bruno Lobão-Soares⁴, Katia Lin^{6,8}, Marcelo Linhares^{2,5,6}, Tânia L.
Mazzuco⁷, Rui D. S. Prediger^{2,3}, and Roger Walz^{2,6,8*}.

¹ Serviço de Anatomia Patológica, Hospital Universitário (HU), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

² Centro de Neurociências Aplicadas (CeNAp), HU-UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

³ Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Norte e Instituto Internacional e Neurociências de Natal - ELS, Natal, RN, Brazil

⁵ Departamento de Clínica Cirúrgica, HU-UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

⁶ Centro de Epilepsia de Santa Catarina (CEPESC), Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brazil

⁷ Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Service d'Endocrinologie et Laboratoire de Pathophysiologie Endocrinienne, Montréal, Canada

⁸ Departamento de Clínica Médica, HU-UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

Address for correspondence: Prof. Dr. Roger Walz, Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário, 3º andar, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brazil CEP 88.040-970, Phone (55) 48 3721 9149; Fax: (55) 48 3721 9014. E-mail: rogerwalz@hotmail.com

number of text pages: 17

number of words (including title, author information, and Summary): 3709

number and proposed size of figures: 7

number and proposed size of tables: 0

number of references: 32

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Purpose: The glucose-dependent insulinotropic peptide receptor (GIPR) has been implicated with neuroplasticity and may be related to epilepsy.

Methods: GIPR expression was analyzed by immunohistochemistry in the hippocampus (HIP) and neocortex (Cx) of rats submitted to pilocarpine induced *status epilepticus* (Pilo-SE), and in one patient with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS) treated surgically. A combined GIPR immunohistochemistry and Fluoro-Jade staining was carried out to investigate the association between the GIPR expression and neuronal degeneration induced by Pilo-SE.

Results: GIPR was expressed in the cytoplasm of neurons from the HIP CA subfields, dentate gyrus (DG) and Cx of animals and human samples. The GIPR expression after the Pilo-SE induction increases significantly in the HIP after 1 h and 5 days, but not after 12 h or 50 days. In the Cx, the GIPR expression increases after 1 h, 12 h and 5 days, but not 50 days after the Pilo-SE. The expression of GIPR noticed 12 h after Pilo-SE was inversely proportional to the Fluoro-Jade staining intensity. In the human tissue, the GIPR expression patterns were similar to those observed in chronic Pilo-SE animals. No Fluoro-Jade stained cells were observed in the human sample.

Conclusions: The GIPR is highly expressed in human HIP and Cx. There was a time and region dependent increase of GIPR expression in the HIP and Cx after Pilo-SE that was inversely associated to neuronal degeneration. Our findings suggest a possible role for the GIPR in the neuroplasticity events of MTLE-HS.

Keywords: Mesial temporal lobe epilepsy; hippocampal sclerosis; glucose-dependent insulinotropic peptide receptor.

1. INTRODUCTION

Glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) is a 42-amino acid polypeptide initially isolated from endocrine cells in porcine small intestine, originally described as a gastric acid secretion and gastrointestinal motility modulator (Brown et al., 1969, Brown et al., 1975). Its major physiological role is increasing insulin secretion by pancreatic islet cells (Dupre et al., 1973, Ross et al., 1977, Gault et al., 2003), but it is also associated with fat metabolism regulation in adipocytes as well as pancreatic β -cells differentiation, proliferation, and survival (Yip & Wolfe, 2000, Trumper et al., 2002, Trumper et al., 2001). GIP elicits several physiologically relevant glucose lowering actions through a variety of extrapancreatic mechanisms (Irwin et al., 2006). Its actions are mediated through activation of GIP receptor (GIPR), a seven trans-membrane domain G-protein-coupled receptor widely distributed in the brain. GIPR mRNA has been detected at high levels in the olfactory bulb, layers 3 and 5 of the cerebral cortex, hippocampus, and mammillary bodies (Usdin et al., 1993).

The first report demonstrating a possible role of GIP on “non-endocrine” brain function *in vivo* came from transgenic animals for the GIPR gene which presented increased exploratory behavior and motor function (Ding et al., 2006). Recently Gault and Holscher (Gault & Holscher, 2008) demonstrated that GIPR agonists infused intracerebroventricularly increased the long-term potentiation (LTP) in the hippocampal CA1 region of rats (Gault & Holscher, 2008). The same authors also demonstrated that GIP might protect synapses from the detrimental effects of beta-amyloid fragments on LTP formation.

The GIP and its receptor are found on neurons and on neuronal progenitor cells in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus where it is markedly upregulated in association with increased rates of cell proliferation (Nyberg et al., 2005, Nyberg et al., 2007). Experimental evidences showed that postnatal neurogenesis may be modulated by different physiological and non-physiological mechanisms, including chronic epileptic conditions such as the mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampus sclerosis (MTLE-HS) model induced by pilocarpine *status epilepticus* in rats (Parent et al., 1997).

1
2
3 The MTLE-HS is the most common refractory epileptic syndrome in humans and is
4 associated with complex partial seizures that may evolve to secondarily generalization
5 (Engel, 1996). Anterior and mesial temporal lobotomy is an effective and safe procedure for
6 pharmacologically refractory patients with MTLE-HS (Wiebe et al., 2001) and parallel studies
7 using animal models and human tissue obtained from epilepsy surgery may be useful to
8 understand the epileptogenesis process. The pilocarpine model is a valid animal model to
9 investigate the neuroplasticity, neurochemical and neuropathological changes related with
10 MTLE-HS (Bonan et al., 2000). In this model, a prolonged status epilepticus induced by
11 systemic pilocarpine (Pilo-SE) causes neuronal loss, synaptic reorganization, mossy fiber
12 sprouting in hippocampus and spontaneous recurrent seizures initiated in the hippocampus
13 and propagated to the neocortex (Ben-Ari, 1985, Cavalheiro et al., 1991, Mello et al., 1993).

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27 To date, the role of GIP and GIPR in the brain is not clear, and its expression was
28 not demonstrated in the central nervous system in humans. We investigated the expression
29 of GIPR in the hippocampus and neocortex of rats at different times after the Pilo-SE
30 induction and its association with neuronal degeneration. We also analyzed the GIPR
31 expression in the hippocampus and temporal neocortex of one male patient with medically
32 refractory MTLE-HS treated surgically.

33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 **2. Materials and Methods**

43 44 45 *2.1. Animal model*

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Male Wistar rats (age 70-90 days; weight 200-240 g) from our own colony were housed under optimum light, temperature, and humidity conditions (12 h light/dark cycle, 22 ± 1°C, under 60-80% humidity), with food and water provided *ad libitum*. All procedures within this study followed the "Principles of Laboratory Animal Care" from the National Institutes of Health's (NIH) publication number 85-23 and were approved by the Ethics Committee of UFSC.

The pilocarpine model has been previously described (Leite et al., 1990, Cavalheiro et al., 1991, Bonan et al., 2000). In summary, thirty minutes after subcutaneous pretreatment

1
2
3 with scopolamine methyl nitrate 1 mg/kg (to minimize peripheral cholinergic effects), a single
4
5 dose of pilocarpine (300 mg/kg, dissolved in saline) was injected intraperitoneally (i.p.). After
6
7 the pilocarpine injection, the animal became hypoactive; generalized convulsions and limbic
8
9 SE usually occurred 40-80 min after injection. A total of 40 rats were injected with pilocarpine
10
11 and monitored behaviorally for at least 6 h. Total mortality was 37%, and 4% of the rats did
12
13 not develop *status epilepticus* (SE). Only animals that evolved to SE were studied. Control
14
15 animals received the same amount of saline and scopolamine only and were sacrificed at
16
17 similar times after infusions as their respective experimental groups.
18
19

20
21 The animals were sacrificed at 1 h (acute phase) or 12 h after behavior initiation of
22
23 SE (toxic phase), or 5 days (silent period) or 50 days (chronic period) after the SE induction.
24
25 After deeply anesthetized with pentobarbital (70 mg/kg i.p.), they were perfused transcardially
26
27 with saline followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PBS; 0.1 M, pH 7.4) for 5
28
29 min. The brains were rapidly removed, postfixed overnight in 4% paraformaldehyde (Sigma,
30
31 CA) and submitted to conventional histological processing. Animals at the silent and chronic
32
33 period were behaviorally evaluated 6 h before their sacrifice and had no behavioral
34
35 symptoms of spontaneous epileptic seizure during this period.
36
37
38
39

40 2.2. Human samples

41
42 The GIPR expression was investigated by immunohistochemistry (see below) of the
43
44 hippocampus body and middle temporal gyrus of an 18-year-old male patient with medically
45
46 refractory MTLE-HS treated surgically. He had a prolonged non-febrile seizure at age 1 year
47
48 and 6 months and the recurrent epileptic attacks started at 6 years. The video-EEG showed
49
50 all the interictal epileptiform discharges in the left anterior and mesial temporal lobe region
51
52 and the ictal onset was characterized by typical teta activity on the left temporal lobe.
53
54 Seizures were characterized by olfactory aura followed by abdominal discomfort, behavioral
55
56 arrest and impaired consciousness without secondary generalization. A high-resolution
57
58 magnetic resonance imaging showed a left unilateral mesial temporal sclerosis that was
59
60 confirmed by the pathological examination. The pre-surgical seizure frequency was 4 to 8 per

1
2
3 month and he remains seizure-free 5 months after surgery. The last seizure occurred 72 h
4
5 before the surgical procedure.
6
7
8

9 10 *2.3. Immunohistochemistry*

11 Paraffin-embedded tissues from rat brain and pancreas (positive control) were
12 sectioned at 4 μm and immunohistochemistry detection was performed using rabbit anti-
13 GIPR (1:500, kind gift of T.J. Kieffer, University of British Columbia) (Lewis et al., 2000,
14 Buhren et al., 2009). Following quenching of endogenous peroxidase with 1.5% hydrogen
15 peroxide in methanol (v/v) for 20 min, high temperature antigen retrieval was performed by
16 immersion of the slides in a water bath at 95 to 98°C in 10 mmol/L trisodium citrate buffer, pH
17 6.0, for 45 min. The slides were then processed using the Vectastain Elite ABC reagent
18 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) according to the manufacturer's instructions. After the
19 appropriate biotinylated secondary antibody, sections were developed with 3,3-
20 diaminobenzidine (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) in chromogen solution for the exact
21 amount of time and counterstained with Harris's hematoxylin. Positive control (pancreas) and
22 experimental tissues were placed on the same slide and processed under the same
23 conditions. Negative control experiments included omission of primary antibody as well as
24 substitution of the primary antibody by equivalent dilutions of nonimmune rabbit IgG serum,
25 using the same staining protocol, and were devoid of specific immunoreaction product.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 *2.4. Image analysis*

49 The immunostaining was assessed at the 4- μm sections of hippocampus and
50 adjacent neocortex localized between 4.0 and 4.2 mm posterior to the bregma, according to
51 the rat brain atlas of Watson and Paxinos (1986). For GIPR quantification, images of stained
52 hippocampal CA1, CA2, CA3 and dentate gyrus (DG) sub-regions and the neocortex were
53 acquired using a Sight DS-5M-L1 digital camera (Nikon, Melville, NY, USA) connected to an
54 optical microscope (Eclipse 50i; Nikon, Melville, NY, USA) at 400x magnification. We
55 captured one image of each region per section (4 images per section). A threshold optical
56
57
58
59
60

1
2
3 density (O.D.) that best discriminated staining from the background was obtained using the
4
5 NIH ImageJ 1.36b imaging software (NIH, Bethesda, MD, USA). The total pixels intensity was
6
7 determined and data were expressed as O.D. The data represent the average value obtained
8
9 by the analysis of images of hippocampal CA1, CA2, CA3, DG sub-regions, and neocortex.
10
11

12 13 14 *2.5. Combining Fluoro-Jade B with GIPR immunohistochemistry stains*

15
16 The Fluoro-Jade (FJ) histochemistry was used as indicative of neuronal degeneration
17
18 (Poirier et al., 2000, Schmued et al., 1997, Schmued & Hopkins, 2000, Wang et al., 2008).
19
20 The GIPR immunohistochemistry was performed in paraffin-embedded sections from rat
21
22 brain as described above. After developing with chromogen solution, the slides with tissues
23
24 were immersed in Fluoro-Jade B staining solution (10 mL of 0.01% Fluoro-Jade B dye
25
26 aqueous solution to 90 mL of 0.1% acetic acid in distilled water) for 30 min. After staining, the
27
28 sections were rinsed three times with distilled water. Excess water was drained off, and the
29
30 slides were immersed in xylene and then coverslipped with D.P.X. (Aldrich Chem. Co.,
31
32 Milwaukee, WI) mounting media. Sections were examined with an epifluorescence
33
34 microscope (Eclipse 50i; Nikon, Melville, NY, USA) using a filter system suitable for
35
36 visualizing fluorescein (FITC) connected to Sight DS-5M-L1 digital camera (Nikon, Melville,
37
38 NY, USA).
39
40
41

42
43 Previous studies using Fluoro-Jade staining demonstrated massive degenerative
44
45 death of neuronal cells with dense distribution in the hippocampus and cerebral cortex,
46
47 reaching peak levels between 12 h and 3 days, and then gradually diminishing 7-14 days
48
49 after onset of prolonged seizures (Wang et al., 2008). To further investigate the possible
50
51 relation between GIPR expression and neuronal death associated to Pilo-SE, we performed a
52
53 double stain of GIPR with Fluoro-Jade B and histochemistry (Schmued et al., 1997) 12 h after
54
55 Pilo-SE onset and compared with their respective control group.
56
57
58

59 *2.5. Statistical analysis*

60

1
2
3 The statistical analysis of the experimental data is expressed as mean \pm S.E.M. and
4 was carried out using two-way analysis of variance (ANOVA) with treatment and time as the
5 independent variables. Following significant ANOVAs, multiple post-hoc comparisons were
6 performed using the Newman-Keuls test. The accepted level of significance for the tests was
7 $P \leq 0.05$. All tests were performed using the Statistica software package (StatSoft Inc., Tulsa,
8 OK, USA). The findings of the human sample were described qualitatively.
9
10
11
12
13
14
15
16
17

18 3. RESULTS

19 3.1. Expression of GIPR in granular cells of the rat hippocampus and neocortex

20
21 In accordance to previous studies (Nyberg et al., 2005, Nyberg et al., 2007), the
22 hippocampal formation contained a large number of GIPR-immunoreactive cells. The
23 expression was highest in the cytoplasm of cells of the granule cell layer and the polymorph
24 layer (hilus) of the dentate gyrus (DG) as well as CA1, CA2, and CA3 of control animals. In
25 the parietal cortex, the highest density of GIPR-immunoreactive neurons is found in layers II–
26 V, also with a cytoplasmatic distribution pattern. The GIPR immunoreactivity was mostly
27 localized in the DG of hippocampus, where the optical density was almost double of that of all
28 the other investigated regions (data not shown).
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 As showed in Figure 1, Pilo-SE induced a significant increase in the GIPR expression
41 in the hippocampal CA1 sub-region in comparison to the controls [$F(1, 19)=20.95$, $P \leq 0.001$].
42 Conversely, the time and the interaction factors did not present significant effects [time: $F(3,$
43 $19)=1.81$, $P=0.18$]; interaction factor: $F(3, 16)=2.59$, $P=0.09$]. Importantly, post-hoc
44 comparisons revealed higher GIPR expression in the CA1 after 1 h ($P \leq 0.05$) and 5 days
45 ($P \leq 0.01$), but not after 12 h ($P = 0.39$) following Pilo-SE induction when compared with their
46 respective control groups (Figure 1B).
47
48
49
50
51
52
53
54

55 In CA2 sub-region, as illustrated in Figure 2, two-way ANOVA revealed a significant
56 effect on the main factors and their interaction in the GIPR expression [treatment: $F(1,$
57 $16)=24.81$, $P \leq 0.001$; time: $F(3, 16)=4.51$, $P \leq 0.05$; interaction factor: $F(3, 16)=4.83$, $P \leq 0.01$].
58 Subsequent post-hoc comparisons revealed higher GIPR expression in the CA2 after 1 h
59
60

1
2
3 (P \leq 0.05) and 5 days (P \leq 0.05), but not after 12 h (P=0.40) following Pilo-SE induction in
4
5
6 comparison with their respective control groups (Figure 2B).

7
8 Moreover, Pilo-SE increased GIPR expression in the CA3 [treatment: F(1, 16)=39.15,
9
10 P \leq 0.0001] and DG [F(1, 16)=33.31, P \leq 0.0001] (Figures 3 and 4, respectively). Subsequent
11
12 comparisons revealed that in both CA3 and DG, GIPR immunoreactivity was higher after 1 h
13
14 (P<0.001 and P \leq 0.001, respectively) and 5 days (P \leq 0.01 and P \leq 0.05, respectively) following
15
16 Pilo-SE induction in comparison with their respective control groups (Figure 3B and 4B).

17
18 Figure 5 illustrates the expression of GIPR in the neocortex localized over the same
19
20 coronal slices containing the dorsal hippocampus of the same controls and Pilo-SE animals
21
22 described above. The animals submitted to Pilo-SE showed a notably higher staining
23
24 intensity than control animals (Figure 5) [treatment: F(1, 16)=79.93, p \leq 0.001]. The time after
25
26 Pilo-SE induction and the interaction factor also demonstrated significant effects [time: F(3,
27
28 16)=6.13, P \leq 0.005; interaction factor: F(3, 16)=6.19, P \leq 0.005]. The post-hoc comparisons
29
30 revealed higher GIPR expression in the cortex after 1 h (p \leq 0.0001), 12 h (p \leq 0.01) and 5 days
31
32 (p \leq 0.001), but not after 50 days (P=0.40) following Pilo-SE induction in comparison to their
33
34 respective control groups (Figure 5B).

35
36
37 Interestingly, at all the analyzed times, the observed increase of GIP expression in the
38
39 DG was significantly higher (see the figures 1-5) than CA1, CA2, CA3, CA4 and neocortex (P
40
41 \leq 0.05, analysis details not shown).

42 43 44 45 46 47 3.2. *The Fluoro-Jade positive cells did not express the GIPR in rat hippocampus*

48
49 In accordance to previous studies (Wang et al., 2008), the histochemical analysis
50
51 using Fluoro-Jade staining revealed an intense neuronal death during the toxic phase (12 h
52
53 after Pilo-SE induction) when compared with the controls. As is clearly demonstrated in
54
55 Figure 6, the cells strongly labeled for GIPR were not stained for Fluoro-Jade. A similar
56
57 pattern was also observed in the neocortex of the same animals (data not shown).

58 59 60 3.3. *The GIPR is expressed in human hippocampus and neocortex of the MTLE-HS patient*

1
2
3 To investigate the presence of GIPR expression in the human brain, we investigated
4 whether GIPR might be expressed in the hippocampus and temporal neocortex of a MTL-
5 HS patient treated surgically. Figure 7 shows representative photomicrographs of GIPR of the
6 hippocampus granule cell layer of CA1, CA2, CA3 and DG sub-regions (see Figure 7A and
7 B) and middle gyros of temporal lobe neocortex (see Figure 7C and D). The temporal
8 neocortex shows a large number of GIPR immunoreactive cells distributed through layers II
9 to VI (Figure 7C and D).
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

21 4. DISCUSSION

22 The present work demonstrated a time and region dependent increase of GIPR
23 expression in the hippocampus and neocortex of animals submitted to Pilo-SE. The
24 expression of GIPR after the Pilo-SE induction increases significantly in all regions of the
25 hippocampus after 1 h and 5 days, but not after 12 h or 50 days. In the neocortex, the GIPR
26 expression increases significantly after 1 h, 12 h, and 5 days, but not after 50 days following
27 the Pilo-SE. Interestingly, at the baseline, DG cells showed double the amount of GIPR
28 expression than all the other studied regions (data not shown). The increase in the GIPR
29 expression was also more prominent in the DG (15 to 30 times higher than at the baseline)
30 than in the other regions (7 times higher than at the baseline). It was demonstrated that Pilo-
31 SE increases the number of proliferative hippocampal cells in the DG (Parent et al., 1997).
32 Walter and colleagues (2007) have demonstrated a selective vulnerability of these newly
33 generated neurons to disruption in epilepsy, relative to their mature neighbors and thus
34 suggesting that newly generated neurons may contribute significantly to the development of
35 epilepsy (Walter et al., 2007). Considering that GIP is highly expressed in the DG and
36 induces cell proliferation *in vivo* and *in vitro* in non-epileptic animals (Nyberg et al., 2005), the
37 more prominent increase in the expression of GIPR in the DG in comparison to other
38 hippocampal and neocortical regions may be associated with the neurogenesis observed
39 after prolonged Pilo-SE. The importance of all these findings in the epileptogenicity deserves
40 further investigation.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 It was demonstrated that GIP is able to protect synapses from the detrimental effects
4 of beta-amyloid fragments on LTP formation, indicating a neuroprotective role for the GIPR in
5 an animal model of Alzheimer disease (Gault & Holscher, 2008). A recent work suggests a
6 critical role of GIP/GIPR in promoting the peripheral nerve recovery after crush (Buhren et al.,
7 2009). Although the cause-effect relationship between GIPR and neuroprotection remains to
8 be proven, our findings indicate unequivocally an association between the GIPR expression
9 and neuronal survival in the Pilo-SE model. Considering the involvement of GIPR with the
10 metabolic regulation, it is possible that GIPR expression may be associated with the
11 energetic balance of neurons during the acute phase of the pilocarpine model.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 Modifications in the intrinsic physiology of neurons of animals submitted to Pilo-SE
24 may be critical for the epileptogenic mechanisms in the hippocampus and seizure
25 propagation in the neocortex. Sanabria and colleagues (Sanabria et al., 2001) demonstrated
26 that Pilo-SE induced changes in the electrophysiological characteristics in the hippocampus
27 of the chronic epileptic animals. The CA1 region of these animals shows a significant
28 proportion of neurons with intrinsic burst or spontaneous burst cell characteristics (not
29 observed in controls) which are likely to be the initiators of spontaneous population bursts in
30 epileptic slices. The same author also demonstrated a significant increase of intrinsic bursting
31 neurons in the layer V of neocortex of chronic animals submitted to Pilo-SE (Sanabria et al.,
32 2002). Considering that GIPR activation modulates positively "in vivo" the Long-Term
33 Potentiation (LTP) in the CA1 region of the hippocampus (Gault & Holscher, 2008), the early
34 increase of GIPR expression in the hippocampus and neocortex due to Pilo-SE could be
35 involved with the epileptogenic long-term modifications of the intrinsic neuronal physiology
36 and network observed in those animals.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 Although we analyze only one representative case of MTLE-HS, this is the first report
54 instance demonstrating the presence of GIPR immunoreactivity in human brain. The
55 qualitative analysis of the GIPR expression pattern observed in the hippocampus and
56 neocortex of this single human MTLE-HS sample was similar to that observed in the chronic
57 animals submitted to Pilo-SE. No pattern of neuronal degeneration was observed using the
58
59
60

1
2
3 Fluoro-Jade technique in the patient sample. Further studies investigating the association
4
5 between GIPR expression and clinical-demographic variables of patients or comparing them
6
7 with post-mortem controls may be helpful to clarify the role of GIPR in human MTLE-HS.
8
9

10 In summary, there is a time and region dependent increase of GIPR expression in the
11 hippocampus and neocortex of animals submitted to Pilo-SE. The GIPR expression is
12 inversely associated to neuronal degeneration related to Pilo-SE. Human hippocampus and
13 neocortex of a pharmacologically untreatable MTLE-HS revealed expression of GIPR similar
14 to that of chronic animals submitted to Pilo-SE. The exact role of GIPR in the neuroprotection
15 or neuroplasticity events related to epileptogenesis processes deserves further investigation.
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **Acknowledgments**

26
27 The authors are grateful to Timothy J. Kieffer (University of British Columbia,
28 Vancouver, Canada) for the donation of GIPR antibody. Work supported by: Conselho
29 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de
30 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio aos Núcleos
31 de Excelência (PRONEX), Instituto Nacional de Neurociência Translacional, and Fundação
32 de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC). R.Walz and R.D.S.Prediger
33 are supported by research grant from CNPq. The technician work of Shumaia Deguer was
34 supported by CNPq.
35
36
37
38
39

40 We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical
41 publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.
42
43

44 None of the authors has any conflict of interest to disclose.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

- 1
2
3
4
5
6 BEN-ARI, Y. (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms
7
8 and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 14, 375-403.
9
10
11
12 BONAN, C. D., WALZ, R., PEREIRA, G. S., WORM, P. V., BATTASTINI, A. M.,
13
14 CAVALHEIRO, E. A., IZQUIERDO, I. & SARKIS, J. J. (2000) Changes in
15
16 synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy.
17
18 *Epilepsy Res*, 39, 229-38.
19
20
21
22 BROWN, J. C., DRYBURGH, J. R., ROSS, S. A. & DUPRE, J. (1975) Identification and
23
24 actions of gastric inhibitory polypeptide. *Recent Prog Horm Res*, 31, 487-532.
25
26
27
28 BROWN, J. C., PEDERSON, R. A., JORPES, E. & MUTT, V. (1969) Preparation of highly
29
30 active enterogastrone. *Can J Physiol Pharmacol*, 47, 113-4.
31
32
33
34 BUHREN, B. A., GASIS, M., THORENS, B., MULLER, H. W. & BOSSE, F. (2009) Glucose-
35
36 dependent insulintropic polypeptide (GIP) and its receptor (GIPR): cellular
37
38 localization, lesion-affected expression, and impaired regenerative axonal growth. *J*
39
40 *Neurosci Res*, 87, 1858-70.
41
42
43
44 CAVALHEIRO, E. A., LEITE, J. P., BORTOLOTTI, Z. A., TURSKI, W. A., IKONOMIDOU, C.
45
46 & TURSKI, L. (1991) Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the
47
48 brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*, 32, 778-82.
49
50
51
52 DING, K. H., ZHONG, Q., XIE, D., CHEN, H. X., DELLA-FERA, M. A., BOLLAG, R. J.,
53
54 BOLLAG, W. B., GUJRAL, R., KANG, B., SRIDHAR, S., BAILE, C., CURL, W. &
55
56 ISALES, C. M. (2006) Effects of glucose-dependent insulintropic peptide on
57
58 behavior. *Peptides*, 27, 2750-5.
59
60

- 1
2
3 DUPRE, J., ROSS, S. A., WATSON, D. & BROWN, J. C. (1973) Stimulation of insulin
4 secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 37, 826-8.
5
6
7
8
9 ENGEL, J., JR. (1996) Surgery for seizures. *N Engl J Med*, 334, 647-52.
10
11
12
13 GAULT, V. A. & HOLSCHER, C. (2008) Protease-resistant glucose-dependent insulinotropic
14 polypeptide agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP
15 induced by beta-amyloid. *J Neurophysiol*, 99, 1590-5.
16
17
18
19
20
21 GAULT, V. A., O'HARTE, F. P., HARRIOTT, P., MOONEY, M. H., GREEN, B. D. & FLATT,
22 P. R. (2003) Effects of the novel (Pro3)GIP antagonist and exendin(9-39)amide on
23 GIP- and GLP-1-induced cyclic AMP generation, insulin secretion and postprandial
24 insulin release in obese diabetic (ob/ob) mice: evidence that GIP is the major
25 physiological incretin. *Diabetologia*, 46, 222-30.
26
27
28
29
30
31
32
33 IRWIN, N., GREEN, B. D., GAULT, V. A., CASSIDY, R. S., O'HARTE, F. P., HARRIOTT, P.
34 & FLATT, P. R. (2006) Effects on glucose homeostasis and insulin secretion of long
35 term activation of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor by
36 N-AcGIP(LysPAL37) in normal mice. *Peptides*, 27, 893-900.
37
38
39
40
41
42
43 LEITE, J. P., BORTOLOTTI, Z. A. & CAVALHEIRO, E. A. (1990) Spontaneous recurrent
44 seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*,
45 14, 511-7.
46
47
48
49
50
51 LEWIS, J. T., DAYANANDAN, B., HABENER, J. F. & KIEFFER, T. J. (2000) Glucose-
52 dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral
53 glucose in rats: demonstration by a receptor antagonist. *Endocrinology*, 141, 3710-6.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 MELLO, L. E., CAVALHEIRO, E. A., TAN, A. M., KUPFER, W. R., PRETORIUS, J. K., BABB,
4
5 T. L. & FINCH, D. M. (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model
6
7 of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, 34, 985-95.
8
9
10
11 NYBERG, J., ANDERSON, M. F., MEISTER, B., ALBORN, A. M., STROM, A. K.,
12
13 BREDERLAU, A., ILLERSKOG, A. C., NILSSON, O., KIEFFER, T. J., HIETALA, M.
14
15 A., RICKSTEN, A. & ERIKSSON, P. S. (2005) Glucose-dependent insulinotropic
16
17 polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell
18
19 proliferation. *J Neurosci*, 25, 1816-25.
20
21
22
23 NYBERG, J., JACOBSSON, C., ANDERSON, M. F. & ERIKSSON, P. S. (2007)
24
25 Immunohistochemical distribution of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in
26
27 the adult rat brain. *J Neurosci Res*, 85, 2099-119.
28
29
30
31 PARENT, J. M., YU, T. W., LEIBOWITZ, R. T., GESCHWIND, D. H., SLOVITER, R. S. &
32
33 LOWENSTEIN, D. H. (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by
34
35 seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat
36
37 hippocampus. *J Neurosci*, 17, 3727-38.
38
39
40
41 POIRIER, J. L., CAPEK, R. & DE KONINCK, Y. (2000) Differential progression of Dark
42
43 Neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-
44
45 induced status epilepticus. *Neuroscience*, 97, 59-68.
46
47
48
49 ROSS, S. A., BROWN, J. C. & DUPRE, J. (1977) Hypersecretion of gastric inhibitory
50
51 polypeptide following oral glucose in diabetes mellitus. *Diabetes*, 26, 525-9.
52
53
54
55 SANABRIA, E. R., SILVA, A. V., SPREAFICO, R. & CAVALHEIRO, E. A. (2002) Damage,
56
57 reorganization, and abnormal neocortical hyperexcitability in the pilocarpine model of
58
59 temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 43 Suppl 5, 96-106.
60

- 1
2
3 SANABRIA, E. R., SU, H. & YAARI, Y. (2001) Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent
4
5 intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol*, 532,
6
7 205-16.
8
9
10
11 SCHMUED, L. C., ALBERTSON, C. & SLIKKER, W., JR. (1997) Fluoro-Jade: a novel
12
13 fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal
14
15 degeneration. *Brain Res*, 751, 37-46.
16
17
18
19 SCHMUED, L. C. & HOPKINS, K. J. (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker
20
21 for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, 874, 123-30.
22
23
24
25 TRUMPER, A., TRUMPER, K. & HORSCH, D. (2002) Mechanisms of mitogenic and anti-
26
27 apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta(INNS-1)-
28
29 cells. *J Endocrinol*, 174, 233-46.
30
31
32
33 TRUMPER, A., TRUMPER, K., TRUSHEIM, H., ARNOLD, R., GOKE, B. & HORSCH, D.
34
35 (2001) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-
36
37 1) cells by pleiotropic signaling. *Mol Endocrinol*, 15, 1559-70.
38
39
40
41 USDIN, T. B., MEZEY, E., BUTTON, D. C., BROWNSTEIN, M. J. & BONNER, T. I. (1993)
42
43 Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal
44
45 peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain.
46
47 *Endocrinology*, 133, 2861-70.
48
49
50
51 WALTER, C., MURPHY, B. L., PUN, R. Y., SPIELES-ENGEMANN, A. L. & DANZER, S. C.
52
53 (2007) Pilocarpine-induced seizures cause selective time-dependent changes to
54
55 adult-generated hippocampal dentate granule cells. *J Neurosci*, 27, 7541-52.
56
57
58
59
60

1
2
3 WANG, L., LIU, Y. H., HUANG, Y. G. & CHEN, L. W. (2008) Time-course of neuronal death
4
5 in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining.
6
7 *Brain Res*, 1241, 157-67.
8
9

10
11 WIEBE, S., BLUME, W. T., GIRVIN, J. P. & ELIASZIW, M. (2001) A randomized, controlled
12
13 trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med*, 345, 311-8.
14
15

16
17 YIP, R. G. & WOLFE, M. M. (2000) GIP biology and fat metabolism. *Life Sci*, 66, 91-103.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review Only

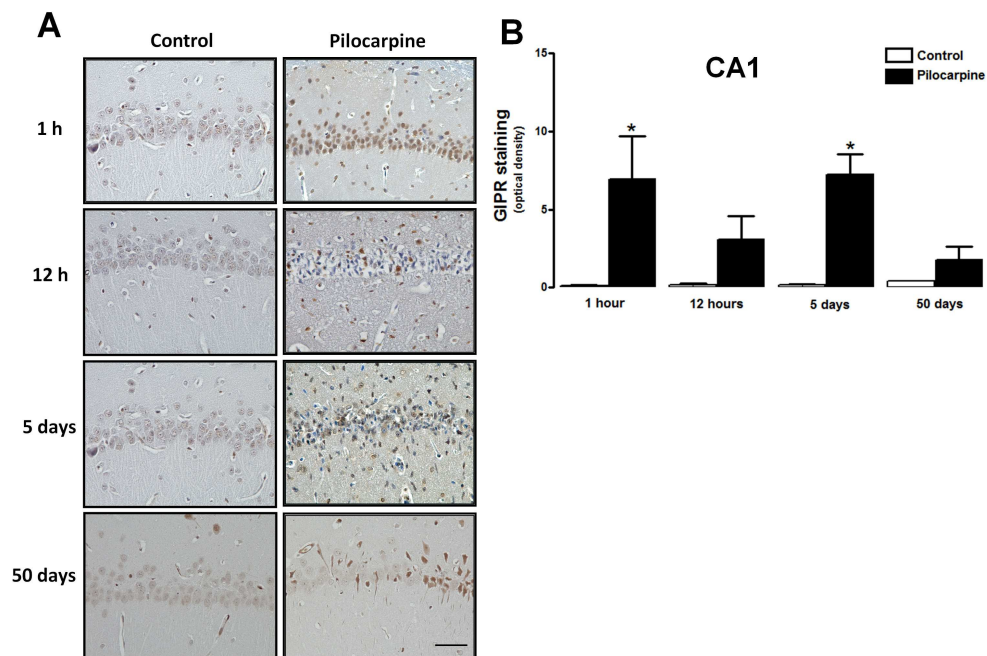


Figure 1 - Expression of GIP receptor in granular cells of the hippocampus CA1 sub region of rat. Immunohistochemical analysis for GIPR was performed 1 h, 12 h, 5 days and 50 days after induction of status epilepticus with pilocarpine (300 mg/Kg) or PBS (i.p.). Rats treated with pilocarpine showed an increased GIPR immunostaining in the hippocampus CA1 sub region after 1 h and after 5 days following SE. (A) Representative images of GIPR immunostaining in the CA1 sub region of the hippocampus. Scale bar = 500 μ m. (B) Graphic representation of the average immunostaining for GIPR evaluated in the CA1 sub region of the hippocampus. Values represent the mean \pm S.E.M. (N = 3 rats per group). *P < 0.05 compared to PBS-treated group.

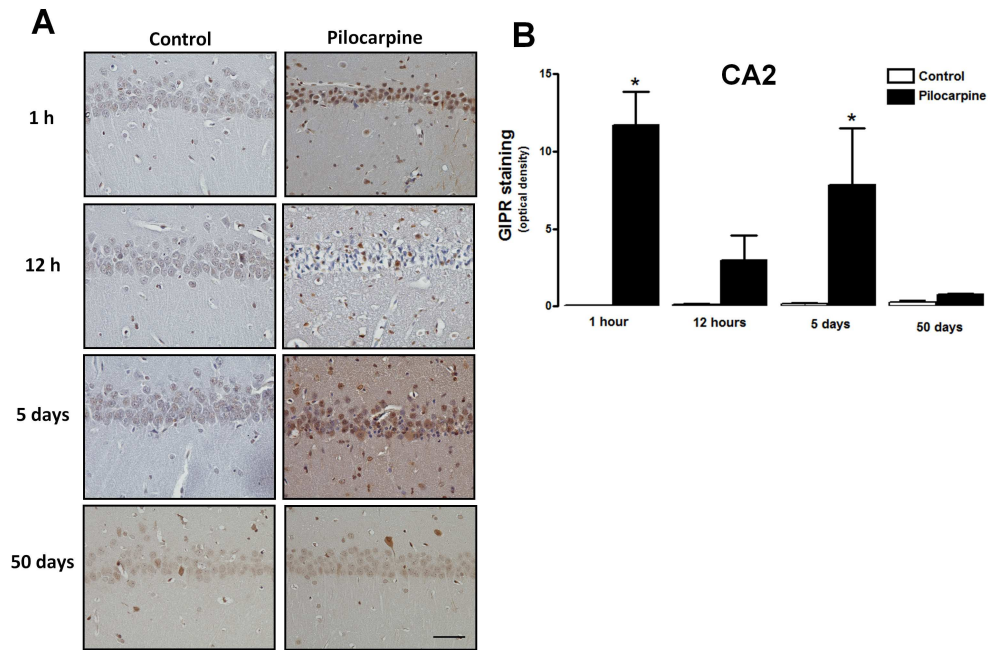


Figure 2 - Expression of GIP receptor in granular cells of the hippocampus CA2 sub region of rat. Immunohistochemical analysis for GIPR was performed 1 h, 12 h, 5 days and 50 days after induction of status epilepticus with pilocarpine (300 mg/Kg) or PBS (i.p.). Rats treated with pilocarpine showed an increased GIPR immunostaining in the hippocampus CA2 sub region after 1 h and after 5 days following SE. (A) Representative images of GIPR immunostaining in the CA2 sub region of the hippocampus. Scale bar = 500 μ m. (B) Graphic representation of the average immunostaining for GIPR evaluated in the CA2 sub region of the hippocampus. Values represent the mean \pm S.E.M. (N = 3 rats per group). *P < 0.05 compared to PBS-treated group.

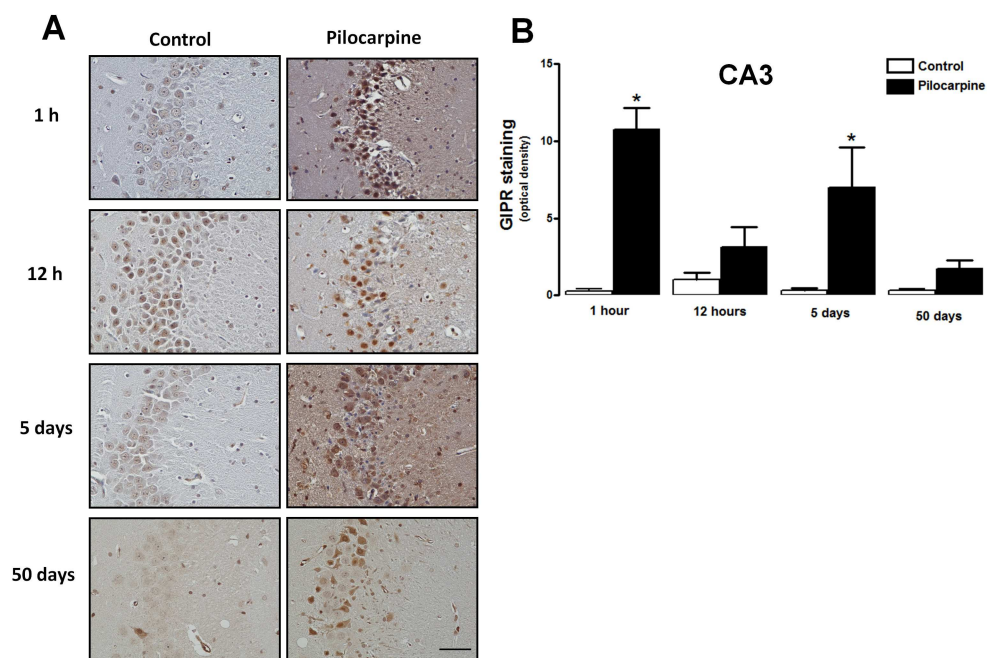


Figure 3 - Expression of GIP receptor in granular cells of the hippocampus CA3 sub region of rat. Immunohistochemical analysis for GIPR was performed 1 h, 12 h, 5 days and 50 days after induction of status epilepticus with pilocarpine (300 mg/Kg) or PBS (i.p.). Rats treated with pilocarpine showed an increased GIPR immunostaining in the hippocampus CA3 sub region after 1 h and after 5 days following SE. (A) Representative images of GIPR immunostaining in the CA3 sub region of the hippocampus. Scale bar = 500 μ m. (B) Graphic representation of the average immunostaining for GIPR evaluated in the CA3 sub region of the hippocampus. Values represent the mean \pm S.E.M. (N = 3 rats per group). *P < 0.05 compared to PBS-treated group.

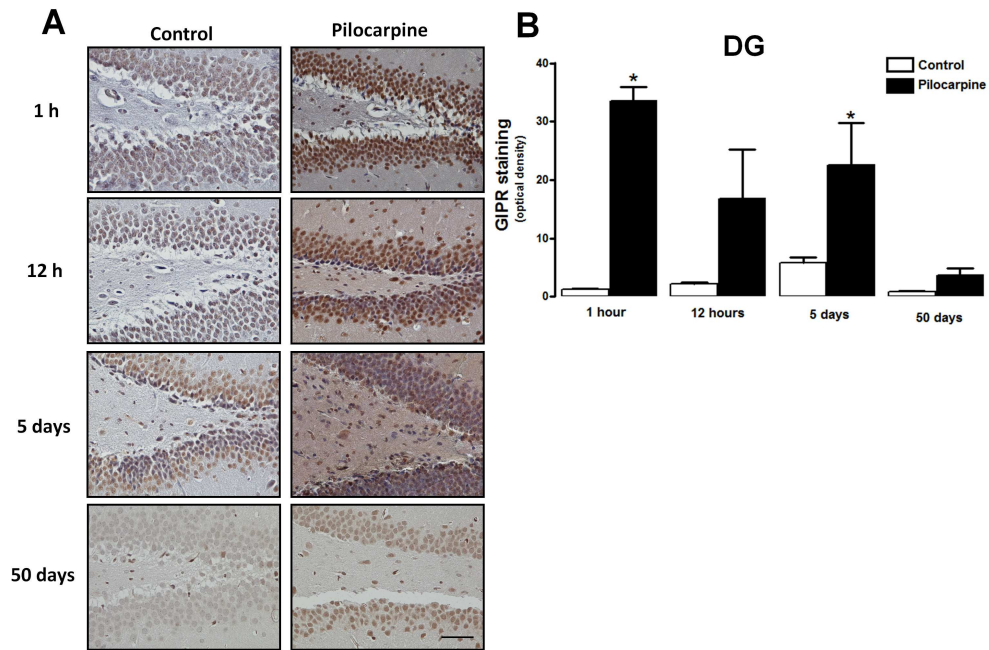


Figure 4 - Expression of GIP receptor in granular cells of the dentate gyrus hippocampus sub region of rat. Immunohistochemical analysis for GIPR was performed 1 h, 12 h, 5 days and 50 days after induction of status epilepticus with pilocarpine (300 mg/Kg) or PBS (i.p.). Rats treated with pilocarpine showed an increased GIPR immunostaining in the hippocampus DG sub region after 1 h and after 5 days following SE. (A) Representative images of GIPR immunostaining in the DG sub region of the hippocampus. Scale bar = 500 μ m. (B) Graphic representation of the average immunostaining for GIPR evaluated in the DG sub region of the hippocampus. Values represent the mean \pm S.E.M. (N = 3 rats per group). *P < 0.05 compared to PBS-treated group.

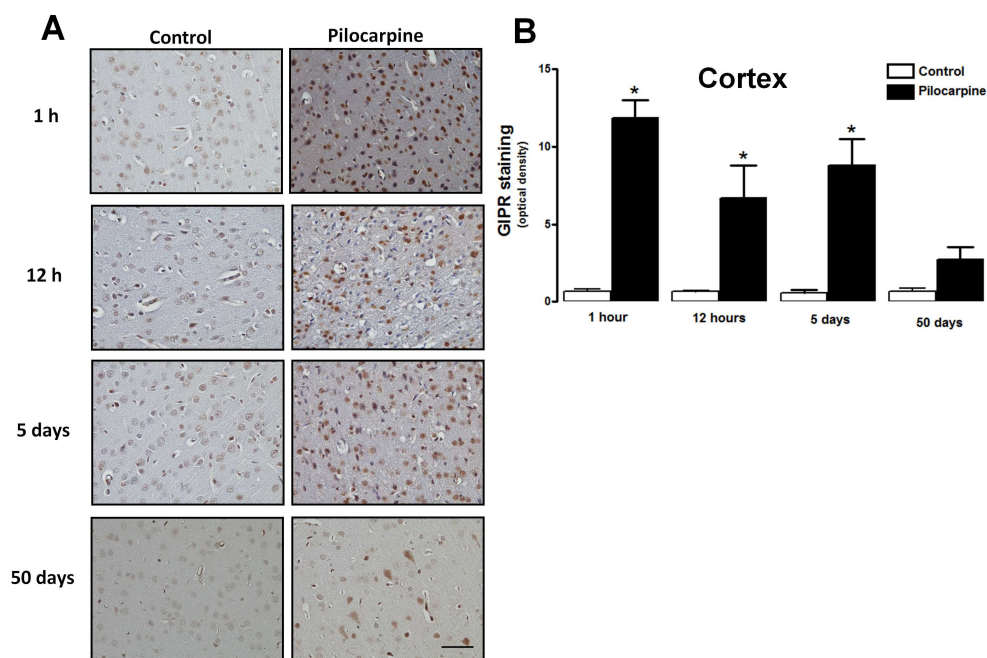


Figure 5 – Expression of GIP receptor in neurons of rat cortex. Immunohistochemical analysis for GIPR was performed 1 h, 12 h, 5 days and 50 days after induction of status epilepticus with pilocarpine (320 mg/Kg) or PBS (i.p.). Rats treated with pilocarpine showed an increased GIPR immunostaining in the parietal cortex after 1 h and after 5 days following SE. (A) Representative images of GIPR immunostaining in the cortex of animals. Scale bar = 500 μ m. (B) Graphic representation of the average GIPR immunostaining of four different fields (magnification 40 \times) of the parietal cortex. Values represent the mean \pm S.E.M. (N = 3 rats per group). *P < 0.05 compared to PBS-treated group.

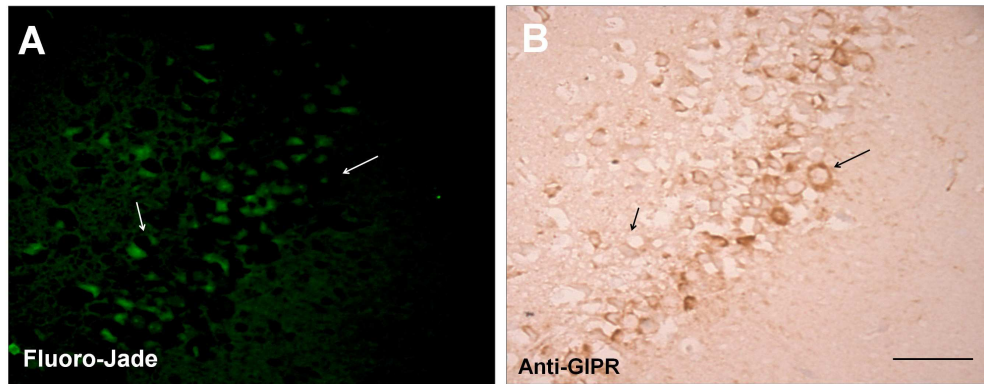


Figure 6 – The Fluoro-Jade positive cells did not express the GIP receptor in rat hippocampus. Double staining of GIPR through immunohistochemistry and Fluoro-Jade histochemistry (degenerative neurons) was performed 12 h after induction of status epilepticus with pilocarpine (300 mg/Kg). (A) Representative image of the Fluoro-Jade histochemically stained CA3 sub region of the hippocampus, and (B) the same field as in (A) immunostained for GIPR. The arrows indicate the inverse correlation of the negative and positive cells for Fluoro-Jade and GIPR. Scale bar = 500 μ m.

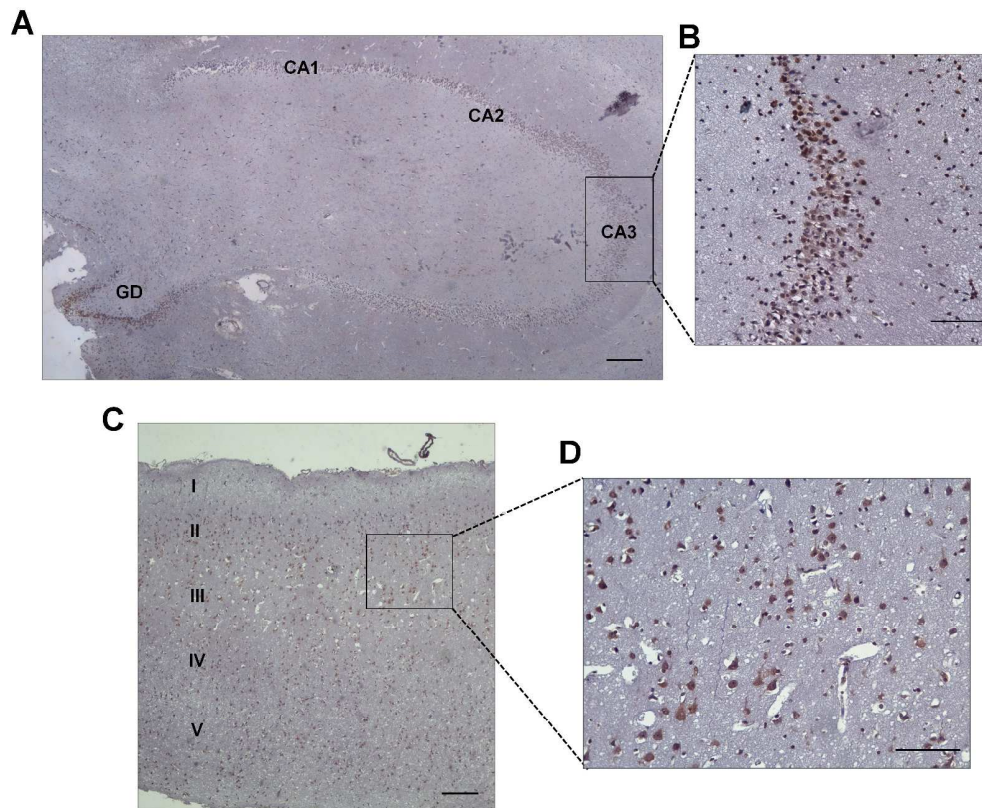


Figure 7 –The GIP receptor is expressed in human neocortex and hippocampus from patient with mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampus sclerosis (MTLE-HS).

Immunohistochemical analysis for GIPR was performed on slices of human neocortex and hippocampus from patient with MTLE-HS. (A) Representative images of GIPR immunostaining in the hippocampus of patient with MTLE-HS (scale bar = 2000 μm), and (B) higher magnification of the GIPR positive neurons in the CA3 sub region of the hippocampus (scale bar = 1000 μm). (C) Representative images of GIPR immunostaining in layers I-V of neocortex from patient with MTLE-HS (Scale bar = 3000 μm) and (D) higher magnification of the GIPR positive neurons in the CA3 sub region of the hippocampus (scale bar = 1000 μm).

CAPÍTULO 2

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 (2009).

Risk is in the Air

An Intranasal MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine) Rat Model of Parkinson's Disease

Rui D. S. Prediger,^a Daniel Rial,^a Rodrigo Medeiros,^a
Cláudia P. Figueiredo,^a Richard L. Doty,^b
and Reinaldo N. Takahashi^a

^a*Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis-SC, Brazil*

^b*Smell and Taste Center, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, USA*

The presence of smell loss and the early pathological involvement of the olfactory pathways in the early stages of some neurodegenerative disorders are in accord with the tenants of the olfactory vector hypothesis. This hypothesis postulates that some such diseases may be caused or catalyzed by agents that enter the brain via the olfactory mucosa. In this study, rats infused intranasally (i.n.) with a low concentration of the proneurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) subsequently suffered olfactory, cognitive, and motor function impairments conceivably analogous to those observed during different stages of the development of Parkinson's disease (PD). Such infusion decreased the expression of the enzyme tyrosine hydroxylase in the olfactory bulb and substantia nigra by means of apoptotic mechanisms, reducing dopamine levels in different brain structures, such as the olfactory bulb, striatum, and prefrontal cortex. These findings reinforce the suggestion that the olfactory system may be a particularly sensitive route for the penetration of xenobiotic agents into the central nervous system and that the i.n. MPTP rat model may provide insight into the underlying mechanisms of PD pathogenesis, potentially leading to the development of new therapeutic strategies for this devastating disease.

Key words: Parkinson's disease; olfactory system; MPTP; intranasal; dopaminergic neurodegeneration; rat

Although the cause of Parkinson's disease (PD) is presently unknown, epidemiological and experimental studies suggest that exposure to several environmental agents, including agricultural chemicals, may contribute to its pathogenesis.^{1,2} Sometimes such agents may enter the brain via the olfactory neuroepithelium, a concept termed the *olfactory vector hypothesis*.³

In accordance with this hypothesis, several studies have shown that intranasal (i.n.) infusion of viruses⁴ or cadmium,⁵ or inhalation of aluminum⁶ or manganese,⁷ can result in the invasion of these agents into the brain, sometimes severely damaging central brain structures. Also in accordance with this hypothesis are the observations that approximately 90% of patients with early-stage PD exhibit olfactory dysfunction unrelated to disease stage or the use of anti-PD medications (e.g., L-dopa, dopamine (DA) agonists, anticholinergic compounds)^{3,8} and that the olfactory bulb is among

Address for correspondence: Rui D. S. Prediger, PhD, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88049-900, Florianópolis, SC, Brazil. Voice: +55 48 3721 9491; fax: +55 48 3337 5479. ruidsp@hotmail.com

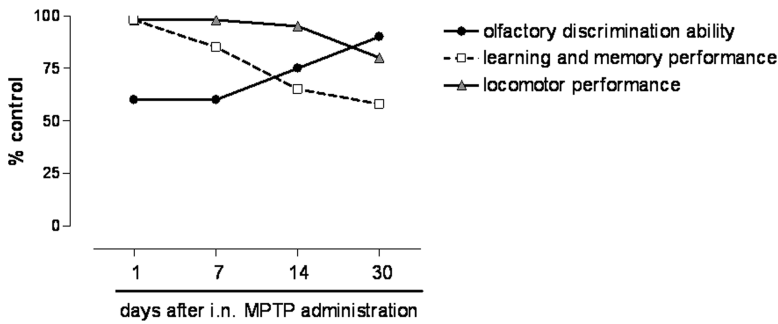


Figure 1. Time course of olfactory, cognitive, and motor symptoms observed in the intranasal MPTP rat model of Parkinson's disease.

the first brain structures to exhibit PD-related pathology, occurring preclinically before the classic disease motor signs.⁹

In humans and nonhuman primates, the proneurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) causes a severe and irreversible PD-like syndrome.¹⁰ However, unlike patients with PD, individuals who received their MPTP intravenously have little or no smell loss, raising the question of whether the olfactory loss of PD reflects the transit of a xenobiotic agent from the nose to the brain via the olfactory receptors.¹¹

In contrast to primates, rodents are less sensitive to MPTP toxicity.¹² Nevertheless, the C57BL/6 mouse strain is sensitive to the systemic injection of MPTP and is significantly more susceptible than other mouse strains in terms of affecting mesencephalic dopaminergic neurons.¹³ Largely because of the economic, logistic, and ethical constraints related to experimental research in primates, the MPTP mouse model has become the most commonly used animal model of PD.¹²

In contrast, the MPTP model is not widely used in rats largely because systemic doses comparable to those used in mice do not produce significant dopaminergic degeneration.^{14,15} Recent work has shown, however, that infusion of MPTP directly into the rat substantia nigra pars compacta causes a partial loss of dopaminergic neurons and depletion of striatal DA, resulting in sensorial and memory deficits with no major motor impairments, thereby

modeling the early phase of PD.¹⁶ Hence it is conceivable that the rat liver and blood-brain barrier are largely responsible for minimizing the amount of MPTP that reaches the brain. If so, then i.n. administration of MPTP, which is not constrained by such factors, may be more effective in getting higher levels of MPTP into the brain.³

To date, most studies performed with animal models of PD have focused on their ability to induce nigrostriatal dopaminergic pathway damage and motor alterations associated with advanced phases of PD. Because PD is accompanied by alterations in a variety of functions, including memory deficits^{17,18} and olfactory dysfunction,^{3,19} evaluating whether the proposed animal models of PD alter any of these functions seems important. We therefore investigated the occurrence of olfactory, cognitive, and motor alterations in rats over a 21-day period after one bilateral i.n. administration of a low dose of MPTP (0.1 mg/nostril; for more protocol details see Prediger *et al.*²⁰). The test battery included tests of odor discrimination, locomotion, and memory, as measured by step-down inhibitory avoidance, social recognition, and three versions of the Morris water maze.

Figure 1 summarizes the time course of performance on the olfactory, cognitive, and motor test measures. Mimicking the clinical condition, the rats exhibited an early disruption in olfactory discrimination ability during the first 2 weeks after MPTP treatment. An inability to discriminate between familiar and unfamiliar

test cage compartments was not due to locomotor impairment because no behavioral alterations in the open field and activity chambers were observed in the first posttreatment week. Interestingly, 21 days after the MPTP administration, the olfactory function of the animals, as well as the expression of tyrosine hydroxylase (TH) and DA levels in the olfactory bulb, returned to normal, conceivably reflecting enhanced neurogenesis of bulbar dopaminergic neurons.²¹

Our results are in accordance with several lines of evidence that strongly suggest the involvement of DA 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.^{22,23} Most data indicate that these dopaminergic cells constitute the entire DA content in the bulb, although there is a report of a minor projection from the ventral tegmental area.^{24,25} One systemic injection of a dopaminergic agonist can reduce odor detection *in vivo*²⁶ and can abolish the odor-induced metabolic activation pattern in the olfactory bulb.²⁷ Olfactory deprivation, from either unilateral olfactory nerve transection or unilateral nostril occlusion, reduces olfactory bulb DA content in the ipsilateral bulb,²⁸ increases DA receptor density in the olfactory bulb,²⁹ and enhances bulb responsiveness to single odors.^{30,31} Together, these data indicate that DA might exert an inhibitory control on olfactory input. Moreover, DA appears to be necessary for olfactory memory because its release increases during olfactory learning,^{32,33} whereas DA receptor antagonists³⁴⁻³⁶ or treatments that reduce the dopaminergic neurotransmission, such as MPTP³⁷ and reserpine,^{35,36} inhibit olfactory memory.

However, a possible involvement of norepinephrine (NE) in the MPTP-related olfactory deficits of this study cannot be ruled out because the rat olfactory bulb receives a prominent noradrenergic input from the locus coeruleus.^{38,39} Indeed, NE has been implicated as playing

an important role in olfactory memory,^{40,41} and MPTP administration can induce olfactory bulb NE depletion in rodents.^{42,43} That being said, however, 6-hydroxydopamine depletion of olfactory bulb NE has no demonstrable effect on the rat's ability to detect odors.⁴⁴

In addition to the characteristic motor symptoms, subtle cognitive impairments are often present even during the earlier phases of PD.^{17,18} Such impairments include a dysexecutive syndrome that involves attentional and working memory deficits accompanied by secondary deficits in the internal representation of visuospatial stimuli.^{17,18} Skill and habit learning is also impaired in these patients.⁴⁵ Although there are reports of declarative (or episodic) memory impairments in PD, they are less severe than other neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease.⁴⁶ Because the *i.n.* administration of MPTP does not cause gross motor alterations that would preclude assessment of memory function, we also investigated what kinds of memory are affected in these animals. Although the *i.n.* MPTP rats performed normally in the step-down inhibitory avoidance task and in the spatial reference memory version of the water maze, they were significantly impaired in their ability to locate the cued platform in the water maze. This finding implies a disruption in habit learning, as well as poor performance in working memory, consistent with the cognitive deficits observed in PD patients.²⁰

We also investigated the influences of *i.n.* MPTP administration on the levels of the enzyme TH and the neurotransmitter DA in different structures of the rat brain. As can be seen in Figure 2, immunohistochemistry revealed a significant reduction in the TH levels in the olfactory bulb and substantia nigra of MPTP-treated rats. Moreover, the determination of DA content by reverse-phase high-performance liquid chromatography revealed that the olfactory, cognitive, and motor deficits observed in our *i.n.* MPTP model were correlated with a pronounced DA depletion in the

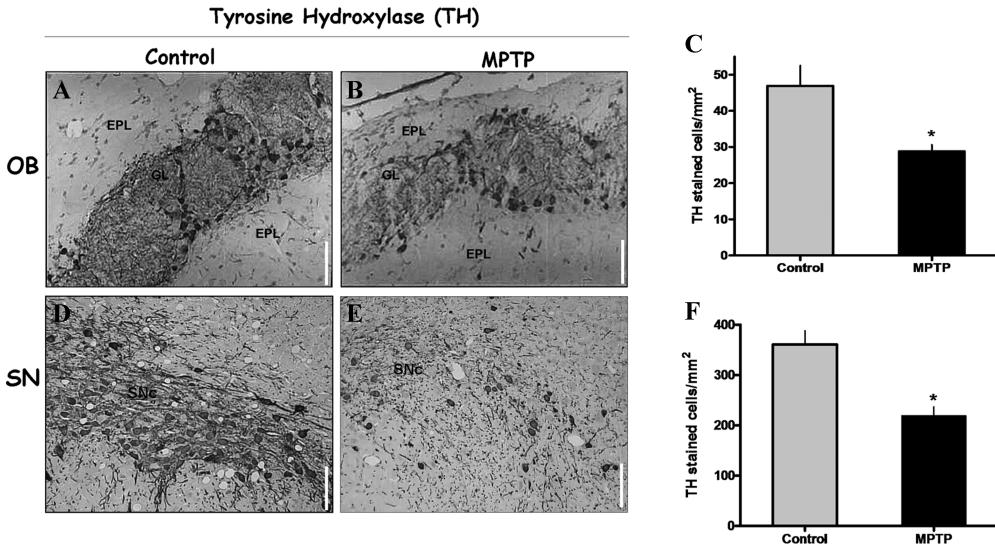


Figure 2. Representative figures of tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining detection in the olfactory bulb (OB) and substantia nigra (SN) of rats treated intranasally with control (A and D, respectively) or MPTP (B and E, respectively). Immunohistochemical detection of TH-positive cells was assessed using monoclonal mouse anti-TH antibody (MAB318, 1:100; Chemicon International, Cambridge, MA), streptavidin-horseradish peroxidase detection system, and the visualization was completed by use of chromogen (DAB, 3,3'-diaminobenzidine) and Harris's hematoxylin counterstained. TH-positive cells (dark) were determined upon visual inspection at the OB (C) and SN (F) by using a counting grid at $\times 400$ magnification. (A,B) Photomicrographs of TH-immunoreactive cells of OB; EPL, external plexiform layer; GL, glomerular layer. Scale bars, 100 μm . (D,E) Photomicrographs of TH-immunoreactive cells of SN; SNc, substantia nigra pars compacta. Scale bars, 200 μm . Values represent the mean \pm SEM of TH-positive neurons (cells/square millimeter) of five animals in each group. * $P < 0.05$ compared with the control group (unpaired Student's *t*-test).

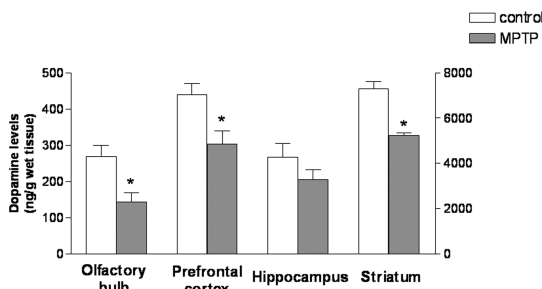


Figure 3. Effects of intranasal administration of MPTP (0.1 mg/nosril) on dopamine concentration in the olfactory bulb, prefrontal cortex, hippocampus, and striatum of rats. Values represent the mean \pm SEM of dopamine levels (nanogram per gram of wet tissue) of seven animals in each group. * $P \leq 0.05$ compared with the control group (unpaired Student's *t*-test).

olfactory bulb, striatum, and prefrontal cortex, but not the hippocampus, of MPTP-treated rats (Fig. 3). In support of our findings, Rojo *et al.*⁴⁷ recently reported that C57BL/6 mice receiving

daily i.n. inoculations with MPTP (30 mg/kg of body weight) for 30 days developed motor deficits that correlated with a progressive and severe depletion of striatal DA levels and a loss of TH and DA transporter staining in the substantia nigra and striatum.

The cellular mechanisms underlying PD-related neurodegeneration are not well understood. Nonetheless, considerable evidence exists that programmed cell death plays a key role in the neurodegeneration observed in both PD patients and MPTP-treated animals.⁴⁸ MPTP-induced oxidative stress activates a series of cellular factors, which subsequently initiate apoptotic cell death. Among them, c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling cascade and caspase activation are recognized as key mediators in MPTP-induced neuronal apoptosis.^{49,50} As illustrated in Figure 4, the i.n. administration of MPTP causes a sustained activation of JNK

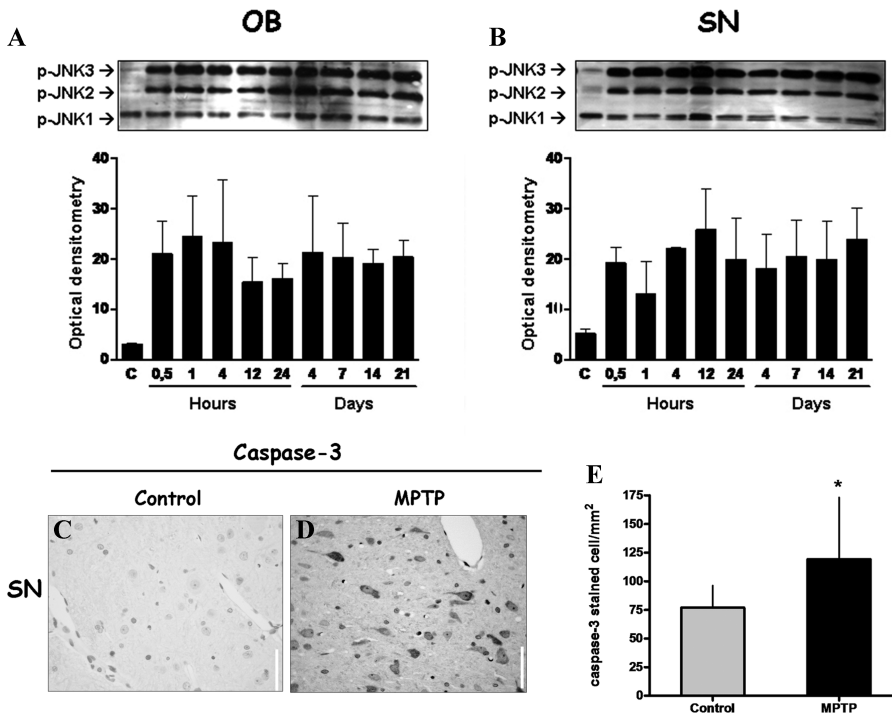


Figure 4. Effects of intranasal administration of MPTP (0.1 mg/nosrill) in the c-Jun N-terminal kinase (JNK) and caspase-3 signaling cascade of neuronal apoptosis. Western blot analysis revealed that the intranasal MPTP treatment causes a pronounced and sustained activation of JNK in the olfactory bulb (OB) and substantia nigra (SN) of rats (A and B, respectively). Results were normalized by arbitrarily setting the densitometry of the control group and are expressed as mean ± SEM of three independent experiments. Representative figures of caspase-3–cleaved detection in the SN of rats treated intranasally with control (C) or MPTP (D). Immunohistochemical detection of caspase-3 cleaved–positive cells were assessed using monoclonal mouse anti-TH antibody (#9661, 1:400; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), streptavidin–horseradish peroxidase detection system, and the visualization was completed by use of chromogen (DAB, 3,3'-diaminobenzidine) and Harris's hematoxylin counterstained. Caspase-3–positive cells (dark) were determined upon visual inspection at the SN by using a counting grid at ×400 magnification (E). Scale bars (C and D), 25 μm. Values represent the mean ± SEM of caspase-3–positive neurons (cells/square millimeter) of five animals in each group. **P* < 0.05 compared with the control group (unpaired Student's *t*-test).

in the rat olfactory bulb and substantia nigra, leading to caspase-3 activation. Such activation may be largely responsible for the dopaminergic degeneration in olfactory bulb and substantia nigra observed in our i.n. MPTP rat model.

Many of the behavioral impairments induced by i.n. administration of MPTP appear analogous to those observed in PD. For example, in the earlier stages of PD, DA neurons in the substantia nigra pars compacta are moderately lost (40%–70%) and sensory and memory

deficits are present in the absence of major motor impairment. As in patients with PD, the rats of our study exhibited deficits in working memory with long-term spatial (declarative) memories largely being spared. However, our PD rat model does not fully mimic human PD. Thus, even though the observed sequence of olfactory, cognitive, and motor impairments is similar to the sequence of analogous changes seen in PD, the time frame of development of these problems is shorter in our rat model and the olfactory dysfunction reverses itself. Such reversal

might not occur in older rats, something that requires additional study. Moreover, the human PD phenotype is associated with twice as many TH-immunoreactive neurons in the olfactory bulb than in control subject.⁵¹ Whether this phenomenon, which could reflect extreme attempts to repopulate bulbar dopaminergic cells via the rostral migratory stream, is associated with the use of anti-PD medications, age of disease onset or time of autopsy, or other factors is unknown.

In summary, our experimental findings agree with the olfactory vector hypothesis, as well as with epidemiological studies implicating xenobiotic agents in the induction of PD. We demonstrate that low concentrations of MPTP can enter the brain via the olfactory mucosa and alter dopaminergic function in a range of brain structures. Because of safety considerations, our i.n. MPTP model of PD would seem preferable to other rodent models of PD in which high concentrations of MPTP are needed to induce alterations in central nervous system function.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC), all from Brazil.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Gorell, J.M. *et al.* 1998. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* **50**: 1346–1350.
- Hawkes, C.H. *et al.* 1997. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **62**: 436–446.
- Doty, R.L. 2008. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann. Neurol.* **63**: 7–15.
- Barnett, E.M. & S. Perlman. 1993. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology* **194**: 185–191.
- Hastings, L. & J.E. Evans. 1991. Olfactory primary neurons as a route of entry for toxic agents into the CNS. *Neurotoxicology* **12**: 707–714.
- Zatta, P. *et al.* 1993. Deposition of aluminum in brain tissues of rats exposed to inhalation of aluminum acetylacetonate. *Neuroreport* **4**: 1119–1122.
- Tjälve, H. *et al.* 1996. Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharmacol. Toxicol.* **79**: 347–356.
- Doty, R.L. *et al.* 1988. Olfactory dysfunction in Parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology* **38**: 1237–1244.
- Braak, H. *et al.* 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* **318**: 121–134.
- Langston, J.W. *et al.* 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**: 979–980.
- Doty, R.L. *et al.* 1992. Lack of olfactory dysfunction in MPTP-induced Parkinsonism. *Ann. Neurol.* **32**: 97–100.
- Schmidt, N. & B. Ferger. 2001. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **108**: 1263–1282.
- Sedelis, M. *et al.* 2000. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav. Genet.* **30**: 171–182.
- Kalaria, R.N. *et al.* 1987. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine-oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 3521–3525.
- Giovanni, A. *et al.* 1994. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: systemic administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 1000–1007.
- Da Cunha, C. *et al.* 2002. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell. Mol. Neurobiol.* **22**: 227–237.
- Dubois, B. & B. Pillon. 1997. Cognitive deficits in Parkinson's disease. *J. Neurol.* **244**: 2–8.
- Bosboom, J.L. *et al.* 2004. Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **111**: 1303–1315.

19. Doty, R.L. 2003. Odor perception in neurodegenerative diseases. In *Handbook of Olfaction and Gestation*. R.L. Doty, Ed.: 479–502. Marcel Dekker. New York.
20. Prediger, R.D. et al. 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.
21. Yamada, M. et al. 2004. Neurogenesis in olfactory bulb identified by retroviral labeling in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated adult mice. *Neuroscience* **124**: 173–181.
22. Halasz, N. et al. 1977. Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes. Support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons. *Brain Res.* **126**: 455–474.
23. Halasz, N. & G.M. Shepherd. 1983. Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience* **10**: 579–619.
24. Fallon, J.H. & R.Y. Moore. 1978. Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex. *J. Comp. Neurol.* **180**: 533–544.
25. Gall, C.M. et al. 1987. Evidence of coexistence of GABA and dopamine in neurons of the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* **266**: 307–318.
26. Doty, R.L. & J.M. Risser. 1989. Influence of the D2 dopamine receptor agonist quinpirole on the odor detection performance of rat before and after spiperone administration. *Psychopharmacology* **98**: 310–315.
27. Sallaz, M. & F. Jourdan. 1992. Apomorphine disrupts odour-induced patterns of glomerular activation in the olfactory bulb. *Neuroreport* **3**: 833–836.
28. Baker, H. et al. 1983. Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *J. Neurosci.* **3**: 69–78.
29. Guthrie, K.M. et al. 1991. Olfactory deprivation increases dopamine D2 receptor density in the rat olfactory bulb. *Synapse* **8**: 61–70.
30. Guthrie, K.M. et al. 1990. Unilateral olfactory deprivation modifies olfactory bulb function. *J. Neurosci.* **10**: 3402–3412.
31. Wilson, D.A. & Sullivan, R.M. 1995. The D₂ antagonist spiperone mimics the effects of olfactory deprivation on mitral/tufted cell odor response patterns. *J. Neurosci.* **15**: 5547–5581.
32. Coopersmith, R. et al. 1991. Extracellular dopamine increase in neonatal olfactory bulb during odor preference training. *Brain Res.* **564**: 149–153.
33. Keverne, E.B. et al. 1993. Influence of birth and maternal experience on olfactory bulb neurotransmitter release. *Neuroscience* **56**: 557–565.
34. Weldon, D.A. et al. 1991. Posttraining D1 receptor blockade impairs odor conditioning in neonatal rats. *Behav. Neurosci.* **105**: 450–458.
35. Prediger, R.D. et al. 2004. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. *Behav. Brain Res.* **153**: 149–157.
36. Prediger, R.D. et al. 2005. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behav. Pharmacol.* **16**: 209–218.
37. Dluzen, D.E. & J.D. Kreutzberg. 1993. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) disrupts social memory/recognition processes in the male mouse. *Brain Res.* **609**: 98–102.
38. Shipley, M.T. et al. 1985. Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* **329**: 294–299.
39. McLean, J.H. et al. 1989. Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* **285**: 339–349.
40. Dluzen, D.E. et al. 1998. Olfactory bulb norepinephrine depletion abolishes vasopressin and oxytocin preservation of social recognition responses in rats. *Neurosci. Lett.* **254**: 161–164.
41. Brennan, P.A. & E.B. Keverne. 1997. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog. Neurobiol.* **51**: 457–481.
42. Dluzen, D.E. 1992. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) reduces norepinephrine concentrations in the olfactory bulb of male mice. *Brain Res.* **586**: 144–147.
43. Dluzen, D.E. & G. Kefalas. 1996. 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.* **741**: 215–219.
44. Doty, R.L. et al. 1988. Effects of intrabulbar injections of 6-hydroxydopamine on ethyl acetate odor detection in castrate and non-castrate male rats. *Brain Res.* **444**: 95–103.
45. Knowlton, B.J. et al. 1996. A neostriatal habit learning system in humans. *Science* **273**: 1399–1402.
46. Bondi, M.W. & A.W. Kaszniak. 1991. Implicit and explicit memory in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* **13**: 339–358.
47. Rojo, A.I. et al. 2006. Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. *Eur. J. Neurosci.* **24**: 1874–1884.
48. Mattson, M.P. 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**: 120–129.

49. Saporito, M.S. *et al.* 1999. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**: 421–427.
50. Kaul, S. *et al.* 2003. Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C delta mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)–induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration. *Eur J. Neurosci.* **18**: 1387–1401.
51. Huisman, E. *et al.* 2004. A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **19**: 687–692.

CAPÍTULO 3

*THE EXPRESSION OF THE GLUCOSE-DEPENDENT INSULINOTROPIC PEPTIDE
RECEPTOR (GIPR) IN THE OLFACTORY BULB OF RATS INFUSED
INTRANASALLY WITH 1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE
(MPTP): FURTHER EVIDENCE FOR THE ROLE OF GPIR IN NEUROGENESIS.*

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista *Journal of Neurochemistry*.



The expression of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor (GIPR) in the olfactory bulb of rats infused intranasally with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): Further evidence for the role of GPR in neurogenesis.

Journal:	<i>Journal of Neurochemistry</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Figueiredo, Claudia; UFSC, Farmacologia Viana, Alice; UFSC, Farmacologia Aguiar Jr, Aderbal; UFSC, Farmacologia Costa, Robson; UFSC, Farmacologia Matheus, Filipe; UFSC, Farmacologia Mazuco, Tânia; Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Service d'Endocrinologie et Laboratoire de Pathophysiologie Endocrinienne Walz, Roger; UFSC, Clínica Médica Calixto, João; UFSC, Farmacologia Prediger, Rui; UFSC, Farmacologia
Keywords:	Glucose-dependent insulinotropic peptide receptor (GIPR), intranasal MPTP, olfactory bulb, olfactory discrimination, neurogenesis, Parkinson's disease



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The expression of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor (GIPR) in the olfactory bulb of rats infused intranasally with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): Further evidence for the role of GPR in neurogenesis.

Cláudia P. Figueiredo^{1,2}, Alice F. Viana¹, Aderbal S. Aguiar Jr.¹, Robson Costa¹, Filipe C. Matheus¹, Tânia L. Mazzuco³, Roger Walz^{2,4,5}, João B. Calixto¹ and Rui D. S. Prediger^{1,2*}

¹Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

²Centro de Neurociências Aplicadas (CeNAp), Hospital Universitário, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

³Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Service d'Endocrinologie et Laboratoire de Pathophysiologie Endocrinienne, Montréal, Canada.

⁴Centro de Epilepsia do Estado de Santa Catarina (CEPESC), Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brazil.

⁵Departamento de Clínica Médica, Núcleo de Pesquisas em Neurologia Experimental e Clínica (NUPNEC), Hospital Universitário, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

Corresponding author:

Rui D. S. Prediger, PhD

Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88049-900, Florianópolis, SC, Brazil.

Phone: +55 48 3721 9491

Fax : +55 48 3337 5479

E-mail: ruidsp@hotmail.com

ABSTRACT

Neuronal progenitor cells (NPCs) are differentiated in new neurons and integrated into the mature olfactory bulb (OB) circuit throughout life, but the exact molecular mechanisms controlling this process remain unknown. The glucose-dependent insulinotropic peptide receptor (GIPR) is highly expressed in the rat brain and has been implicated with neurogenesis in rodents. In the present study, adult rats infused with a single intranasal (i.n.) administration of the proneurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (1 mg/nostril) presented early olfactory impairments (verified at 7 days after MPTP administration) that were correlated with a significant reduction in the expression of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH) in the OB. Interestingly, 21 days after the i.n. administration of MPTP, the olfactory function of the animals as well as the expression of TH in the olfactory bulb returned to the normal condition. We also report, using immunohistochemistry analysis, an increase in the number of cells undergoing proliferation in the glomerular layer (GL) with a concomitant reduction in the number of these cells (KI67-positive) in the subependymal zone (SEZ) of rats OB following neuronal loss induced by MPTP. Our findings suggest that 7 days after i.n. MPTP administration there is a migration of NPCs (KI-67 positive) from the SEZ through the granule cell layer (GCL) to the GL. In the same animals, the GIPR expression was significantly higher in the GCL of the OB of MPTP-treated rats when compared with controls. The modulation of GIPR expression might be associated with the mechanism of proliferation and migration of OB NPCs, but the exact role of GIPR in these processes deserves further investigation.

1
2
3 **Key words:** Glucose-dependent insulintropic peptide receptor (GIPR), intranasal
4 MPTP, olfactory bulb, olfactory discrimination, neurogenesis and Parkinson's
5 disease.
6
7
8
9

10
11
12
13 **Running title: GIPR expression in an experimental model of Parkinson's**
14 **disease.**
15
16
17

18 19 20 21 **1. INTRODUCTION** 22

23
24 Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that affects
25 approximately 1% of the population older than 50 years (Duvoisin 1991). Classically,
26 PD is considered to be a motor system disease, and its diagnosis is based upon the
27 presence of a set of cardinal motor signs (e.g. rigidity, bradykinesia, tremor and
28 postural reflex disturbance). Unfortunately, the patients only fulfill these clinical
29 criteria when 60-70% of the neurons of the substantia nigra (SN) are degenerated
30 and the striatal dopamine (DA) content is reduced by 80% (Riederer and Wuketich
31 1976; Braak et al. 2004). Recent evidence suggests that areas in the central nervous
32 system (CNS) processing olfactory information are affected at the early stages of PD,
33 even before the development of its classical symptoms (Doty et al. 1988; Muller et al.
34 1998; Braak et al. 2004). Consequently, olfactory dysfunction might be an early
35 indicator of PD and the development of specific olfactory testing may represent an
36 important tool in the clinical diagnosis of early stages of this disease (Doty et al.
37 1995).
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56
57 On the other hand, experimental models of PD have attempted to reproduce
58 the pathogenic process and to involve areas of the brain pathologically affected in
59 humans. Currently, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) represents
60

1
2
3 an important and frequently neurotoxin applied in animal models of PD, since in
4
5 primates (e.g. humans, monkeys and baboons) it causes irreversible and severe
6
7 Parkinsonian symptoms that are indistinguishable from those of sporadic PD (Bezard
8
9 et al. 1997a; Bezard et al. 1997b; Bezard et al. 2001; Przedborski and Vila 2001).
10
11 Although rodents are less sensitive to MPTP toxicity, largely because of the
12
13 economic, logistic, and ethical constraints related to experimental research in
14
15 primates, MPTP rodent models have become the more commonly used animal
16
17 models of PD (Schmidt and Ferger 2001).
18
19
20
21

22 A relatively unexplored route of penetration of neurotoxins is the nasal cavity.
23
24 The nasal mucosa exhibit a large surface area, porous endothelial membrane,
25
26 olfactory receptors are directly exposed to environment chemicals, distribution of
27
28 olfactory receptors are contiguous with the CNS, high total blood flow, avoidance of
29
30 first-pass metabolism and a weak blood–brain barrier. Surprisingly, few studies
31
32 (Dluzen and Kefalas 1996; Prediger et al. 2006; Rojo et al. 2006) have addressing
33
34 the possibility that neurotoxins such as MPTP could damage the basal ganglia
35
36 following intranasal (i.n.) absorption, despite the fact that olfactory function is
37
38 disordered in PD (Doty et al. 1988; Doty et al. 1995). In this context, Rojo et al. (2006)
39
40 recently reported that C57BL/6 mice receiving daily i.n. inoculations with MPTP (60
41
42 mg/kg of body weight) for 30 days developed motor deficits that correlated with
43
44 severe depletion of striatal DA levels and a loss of tyrosine hydroxylase (TH) and DA
45
46 transporter staining in the SN and striatum. Moreover, despite the conspicuous
47
48 insensitivity of rats to MPTP toxicity (Chiueh et al. 1984; Kalaria et al. 1987), we have
49
50 recently demonstrated that a single i.n. infusion of MPTP in rats produces progressive
51
52 signs of PD such as impairments in olfactory, cognitive and motor functions (Prediger
53
54 et al. 2006). Additionally, the i.n. administration of MPTP causes time-dependent loss
55
56
57
58
59
60

1
2
3 of TH in the olfactory bulb (OB) and SN of rats, resulting in significant DA depletion in
4
5 the OB, prefrontal cortex and striatum (Prediger et al. 2006) which are associated
6
7 with alterations in the brain antioxidant status and lipid peroxidation (Franco et al.
8
9 2007), and apoptotic cell death mechanisms (Prediger et al. 2009a). Interestingly, we
10
11 have previously demonstrated that, 21 days after the i.n. MPTP administration, the
12
13 olfactory function of rats, as well as the expression of TH and DA levels in the OB,
14
15 returned to normal, which could reflect extreme attempts to repopulate bulbar
16
17 dopaminergic cells via the rostral migratory stream (RMS). In this context, previous
18
19 studies have demonstrated that the proliferation ratio in the adult OB increases
20
21 dramatically following the damage induced by systemic administration of MPTP
22
23 (Yamada et al. 2004; Hayakawa et al. 2007), suggesting that new neurons might be
24
25 formed through neurogenesis as the injured brain attempts to repair itself.
26
27
28
29
30

31
32 Neuronal progenitor cells (NPCs) are continuously produced mainly in two
33
34 forebrain regions; the subventricular zone (SVZ) (Luskin 1993; Lois and Alvarez-
35
36 Buylla 1994; Doetsch et al. 1997) and hippocampal dentate gyrus (Gage 2000).
37
38 NPCs in SVZ migrate to the OB via a restricted pathway called RMS. Upon reaching
39
40 the subependymal zone (SEZ), which is located in the middle of OB, the majority of
41
42 NPCs migrates to the overlying granule cell layer (GCL) while a small fraction of
43
44 NPCs reach glomerular layer (GL) and then differentiate into mature neurons in each
45
46 region. The GL is the most superficial layer and contains majority dopaminergic
47
48 neurons of the OB (Doetsch and Alvarez-Buylla 1996; Lois et al. 1996; Doetsch et al.
49
50 1999; Baker et al. 2001; Petreanu and Alvarez-Buylla 2002; Winner et al. 2002;
51
52 Yamada et al. 2004).
53
54
55
56

57
58 Recent studies have described high levels of glucose-dependent insulinotropic
59
60 peptide (GIP) and its receptor in the OB and hippocampus (Nyberg et al. 2007) and

1
2
3 where it is robustly up-regulated in association with increased rates of cell
4 proliferation in dentate gyrus (Nyberg et al. 2005). GIP is a 42-amino acid polypeptide
5 initially isolated from endocrine cells in porcine small intestine, originally described as
6 a gastric acid secretion and gastrointestinal motility modulator (Brown et al. 1969;
7 Brown et al. 1975). Its major physiological role is increasing insulin secretion by
8 pancreatic islet cells (Dupre et al. 1973; Ross et al. 1977; Gault et al. 2003), but it is
9 also associated with fat metabolism regulation in adipocytes as well as pancreatic β -
10 cells differentiation, proliferation, and survival (Yip and Wolfe 2000; Trumper et al.
11 2001; Trumper et al. 2002). The GIP actions are mediated through activation of GIP
12 receptor (GIPR), a seven trans-membrane domain G-protein-coupled receptor widely
13 distributed in the brain. GIPR mRNA has been detected at high levels in the OB,
14 layers 3 and 5 of the cerebral cortex, hippocampus, and mammillary bodies (Usdin et
15 al. 1993).

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34 We therefore investigated in the present study the potential of i.n. MPTP
35 administration to increase the migration of NPCs to GL in adult rats and the role of
36 GIPR expression in depletion and subsequently repair of OB dopaminergic neurons
37 through KI67 (a marker of proliferating cells) and TH immunohistochemistry. Finally,
38 caspase-3 immunoreactivity was analyzed in the SN to investigate the programmed
39 cell death (apoptosis) as a pathogenic mechanism possibly involved in the
40 neurodegeneration induced by i.n. administration of MPTP (Prediger et al. 2009b).
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Materials and Methods

Chemicals and antibodies

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) was acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Isoflurane was purchased from Abbot Laboratórios do Brasil Ltda (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Vectastain Elite ABC reagent, biotinylated secondary antibody and 3,3-diaminobenzidine (DAB) were purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). The rabbit anti-TH antibody was purchased from Chemicon International (Cambridge, MA, USA). Antibody against KI-67 was purchased from Acris (Herford, Germany), and rabbit anti-cleaved caspase-3 antibody from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). The Antibody rabbit anti-GIPR was kind gift of T.J. Kieffer from University of British Columbia (Canada).

Animals

A total of 32 male Wistar rats (3 months old, 250-370 g) from our own colony were used. They were kept in groups of four animals per cage and maintained in a room under controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). They were subjected to a 12 h light cycle (lights on 7:00 a.m.) with free access to food and water. 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" from NIH publication No. 85-23.

Intranasal MPTP administration

MPTP HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was administered by i.n. route according to the procedure described by Prediger et al. (2006, 2009). 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 μ 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.

Olfactory discrimination test

The olfactory discrimination ability of rats was assessed at 7 or 21 days after i.n. MPTP administration with an olfactory discrimination test that had been previously evaluated in our laboratory (Prediger et al. 2005; Prediger et al. 2006; Prediger et al. 2009b). The task is based on the fact that rodents usually disclose preference for places impregnated with their own odor (familiar compartments), in spite of places with other non-familiar odors. Briefly, each rat was placed for 5 min in a cage divided in two equal areas separated by an open door, where it could choose between one compartment with fresh sawdust (non-familiar compartment) 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 centre of the non-familiar compartment and the time (s) spent by the rat in both compartments (familiar vs. non-

1
2
3 familiar) was monitored with an AnyMaze video-tracking system (Stoelting Co., Wood
4
5 Dale, IL).
6
7
8
9

10 *Immunohistochemistry*

11
12 The paraffin-embedded tissues from olfactory bulb (OB) and substantia nigra
13 (SN) of rat brain were sectioned at 4 μm and immunohistochemistry detection was
14
15 performed as previously described (Passos et al. 2009; Prediger et al. 2009b;
16
17 Prediger et al. 2009a), using rabbit anti-GIPR (1:500, kind gift of T.J. Kieffer,
18
19 University of British Columbia), rabbit anti-TH (1:100; Chemicon International,
20
21 Cambridge, MA), rabbit anti-KI67 (1:50, Acris, Herford
22
23 Germany), and rabbit anti-cleaved caspase-3 (1:400, Cell Signaling Technology,
24
25 Beverly, MA, USA). The slices with the sagittal sections of the OB (coordinates
26
27 anterior 7.6 mm relative to bregma and lateral 1.0 mm) and coronal sections of SN
28
29 (coordinates anteroposterior -5.8 mm relative to bregma and dorsoventral -6.0 mm)
30
31 were obtained according to the rat brain atlas of (Paxinos and Watson 1998).
32
33
34
35
36
37
38

39 The slices were deparaffinized and rehydrated using xylene and ethylic
40 alcohol, respectively. Following quenching of endogenous peroxidase with 1.5%
41 hydrogen peroxide in methanol for 20 minutes, high temperature antigen retrieval was
42 performed by immersion of the slides in a water bath at 95 to 98°C in 10 mmol/L
43 trisodium citrate buffer, pH 6.0, for 45 minutes. The slides were then processed using
44 the Vectastain Elite ABC reagent according to the manufacturer's instructions. After
45 the appropriate biotinylated secondary antibody, sections were developed with 3,3-
46 diaminobenzidine, all from Vector Laboratories (Burlingame, CA) in chromogen
47 solution for the exact amount of time and counterstained with Harris's hematoxylin.
48
49 Control (sections of rat pancreas for GIPR) and experimental tissues were placed on
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 the same slide and processed under the same conditions. Control experiments
4
5 included omission of primary antibody as well as substitution of the primary antibody
6
7 by equivalent dilutions of nonimmune rabbit IgG serum, using the same staining
8
9 protocol, and were devoid of specific immunoreaction product.
10
11

12 13 14 15 *Image analysis*

16
17 For GIPR quantification, images of stained glomerular layer (GL) of the OB and
18
19 SN were acquired using a Sight DS-5M-L1 digital camera (Nikon, Melville, NY, USA)
20
21 connected to an optical microscope (Eclipse 50i; Nikon, Melville, NY, USA) at 400x
22
23 magnification. We captured four images of each region (GL and GLC of OB and SN)
24
25 (12 images per section) for each antibody. A threshold optical density (O.D.) that best
26
27 discriminated staining from the background was obtained using the NIH ImageJ 1.36b
28
29 imaging software (NIH, Bethesda, MD, USA). The total pixels intensity was
30
31 determined and data were expressed as O.D (Passos et al. 2009). For caspase-3
32
33 and TH immunestaining, the data represent the average value obtained by the
34
35 analysis of images of GL and GLC of the OB and SN. For the KI-67 analysis we
36
37 performed cell counts, which represent the mean of six to eight fields per section
38
39 (n=3). Data are expressed as either the number of cells per square millimeter or
40
41 percentage of cell stain, when the total number of cells corrected for the change in
42
43 OB area, using a calibrate tool of the NIH ImageJ 1.36b imaging software.
44
45
46
47
48
49
50

51 52 53 54 55 *Statistical analysis*

56
57 All values are expressed as means \pm S.E.M.. Differences between groups in TH,
58
59 KI67 and caspase-3 staining were analyzed using unpaired Student's *t*-test.
60

1
2
3 Statistical analysis of the olfactory discrimination data was carried out using two-way
4 analysis of variance (ANOVA) with treatment and day as the independent variables.
5
6
7
8 Following significant ANOVAs, multiple post-hoc comparisons were performed using
9
10 the Newman Keuls test. The accepted level of significance for the tests was $P \leq 0.05$.
11
12 All tests were performed using the Statistica® software package (StatSoft Inc., Tulsa,
13
14 OK, USA).
15
16
17
18
19

20 RESULTS

21 *Effects of intranasal MPTP administration on the olfactory discrimination of rats*

22
23
24
25
26
27 The results for the effects of intranasal (i.n.) administration of MPTP (1
28 mg/nostril) on the olfactory discrimination ability of rats are illustrated in Fig.1. Two-
29 way ANOVA (treatment vs. day) revealed a non-significant effect for the treatment
30 factor [$F(1,28) = 0.13, P=0.72$]. However it indicated a significant effect for the day
31 factor [$F(1,28) = 4.36, P \leq 0.05$] and for the interaction factor between treatment and
32 day [$F(1,28) = 9.50, P \leq 0.01$].
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Insert Fig. 1 here.

Subsequent Newman-Keuls tests indicated that adult rats infused with the MPTP vehicle (i.n.) 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 7 days after treatment, spending similar time in the familiar and non-

1
2
3 familiar compartments (Fig. 1A). Also, the group tested in the olfactory discrimination
4
5 test 21 days after i.n. administration of MPTP presented a reversion of the olfactory
6
7 deficits, since the animals spent much more time in the familiar compartment (in a
8
9 similar way to the vehicle-treated rats) (Fig. 1B).
10
11

12
13
14
15
16 *Effects of intranasal MPTP administration on depletion of tyrosine hydroxylase (TH)*
17
18 *and cleaved of caspase-3*
19

20
21 We have previously demonstrated through western-blot studies that the i.n.
22
23 infusion of MPTP promotes an early reduction in the expression of TH in the OB (1st
24
25 day after MPTP administration), a response that was progressively reversed with time
26
27 (14-21 days after i.n. MPTP administration) (Prediger, 2006; Prediger, 2009a). On the
28
29 other hand, the reduction of TH expression in the SN and ST occurred later (7–21
30
31 days after MPTP administration). As illustrated in Fig. 2, the present data obtained
32
33 with immunohistochemistry confirms these early findings showing a marked decrease
34
35 of TH-positive neurons in the OB (50% loss) (Fig. 2A and B) and SN (64 % loss) (Fig.
36
37 2C and D), but not in ST ($P=0.15$) (Fig. 2E and F) at 7 days after i.n. MPTP infusion.
38
39 Indeed, immunohistochemistry also revealed a marked increase in the number of
40
41 caspase-3-cleaved positive cells in the SN of rats treated intranasally with MPTP (7
42
43 days after MPTP administration) (Fig. 2G and H), reinforcing the notion that apoptotic
44
45 cell death plays a key role in the dopaminergic neurodegeneration observed in the
46
47 present i.n. MPTP model.
48
49
50
51
52

53
54
55
56 Insert Fig. 2 here.
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6 *Intranasal MPTP administration increases KI-67-positive cells in the olfactory bulb*
7
8 *glomerular layer of rats*
9

10 As described previously, the OB is composed of a superficial layer (GL) which
11 contains the dopaminergic neurons, a granule cell layer (GCL) and a subependymal
12 zone (SEZ), located in the middle of OB, where NPCs are concentrated. As showed
13 in Fig. 3, the i.n. MPTP administration reduced (approximately 16%, $P \leq 0.05$) the
14 percentage of KI67-positive cells in SEZ region of OB (at 7 day after MPTP) (Fig. 3B).
15 Instead, at this time, the number of KI67-positive cells was significantly increased
16 (approximately five folds versus control, $P \leq 0.01$) in the GL of OB in MPTP-treated
17 rats (Fig. 3D). Moreover, there was no significant difference ($P=0.35$) in the amount of
18 cell proliferation in the CGL in animals treated with MPTP when compared with the
19 vehicle-treated animals (Fig. 3C).
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Insert Fig. 3 here.

41 *Effects of intranasal MPTP administration on GIPR expression in olfactory bulb and*
42
43
44
45 *substantia nigra of rats*

46 In accordance to previous studies (Usdin et al. 1993; Nyberg et al. 2007), the
47 OB contained a large number of GIPR-immunoreactive cells. This finding was
48 confirmed in this study, in which we demonstrated by immunohistochemistry analysis
49 the wide GIPR expression in cytoplasm of cells in the GL and GCL of the OB, in both
50 control- and MPTP-treated animals (Fig. 4A). However, at 7 days after MPTP
51 administration, the expression of GIPR in SEZ (Fig. 4B) and GL (Fig. 4D) of OB and
52 SN (data not shown) did not differ ($P=0.41$, $P=0.69$, and $P=0.95$, respectively) to that
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 observed in control-treated rats. Moreover, as illustrated in Fig. 4A, the i.n. infusion of
4
5 MPTP promoted a significant increase ($P \leq 0.05$) in the GIPR expression in GCL when
6
7 compared to the controls.
8
9

10 Interesting, the KI67-positive cells and GIPR are co-localized in glomerular
11
12 layer cells of the OB of rats infused intranasally with MPTP. As illustrated in Fig. 4E,
13
14 the cell nucleus of strongly labeled for KI67 were stained for GIPR. A similar pattern
15
16 was also observed in the GCL (data not shown).
17
18
19
20
21

22 Insert Fig. 4 here.
23
24
25
26

27 DISCUSSION

28
29 The present findings confirm the presence of olfactory deficits in rats at early
30
31 periods (7 days) after i.n. MPTP treatment, which is associated with a decrease in the
32
33 expression of enzyme TH in the OB and SN. This data corroborates our previous
34
35 findings obtained with western-blot studies that the i.n. infusion of MPTP promotes an
36
37 early reduction in the expression of TH in the OB (1st day after MPTP administration),
38
39 a response that was progressively reversed with time (14-21 days after i.n. MPTP
40
41 administration) (Prediger et al. 2006; Prediger et al. 2009b). The previous findings
42
43 from our group using the single i.n. administration of MPTP in rats indicated that it
44
45 causes oxidative stress (Franco et al. 2007) and a sustained activation of JNK in the
46
47 OB and SN leading to caspase-3 activation (Prediger et al. 2009a). In the present
48
49 study, we also further demonstrate a pronounced number of caspase-3-cleaved
50
51 positive cells in the SNpc of rat treated intranasally with MPTP, reinforcing the notion
52
53 of the involvement of apoptotic cell death mechanisms on dopaminergic
54
55 neurodegeneration observed in the i.n. MPTP model.
56
57
58
59
60

1
2
3 One of the main findings of the current study is that, 7 days after i.n. MPTP
4 administration, the pronounced degeneration of dopaminergic neurons in the OB was
5 associated with an increase in the number of cells undergoing proliferation (KI67-
6 positive cells) in the GL with a concomitant reduction in the number of these cells
7 (KI67-positive) in the SEZ of OB. Therefore, i.n. MPTP administration induced a
8 pronounced migration of NPCs (KI-67 positive) from the SEZ through the granule cell
9 layer to the GL.
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19
20 In the original description of the i.n. MPTP model in rats (Prediger et al.,
21 2006), we demonstrated that the olfactory function of the animals as well as the levels
22 of TH and DA in the OB returned to the normal condition 21 days after the i.n.
23 administration of MPTP. The present study provides further evidence supporting the
24 hypothesis that MPTP administration increases the neurogenesis ratio of
25 dopaminergic neurons in the OB. Interestingly, previous studies using systemic
26 injection of MPTP reported a selective dopaminergic neurogenesis in the mice OB in
27 response to neuronal damage/loss (Yamada et al. 2004). Following MPTP
28 administration, the number of neuronal progenitors cells that migrated to GL
29 increased and the frequency of their dopaminergic differentiation also increased.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Although the exact mechanisms underlying i.n. MPTP administration
44 increases dopaminergic neurogenesis remain to be determined, many growth factors
45 may play crucial roles in proliferation and differentiation of NPCs after the MPTP-
46 induced damage. Considering that GIP and its receptor GIPR are highly expressed in
47 the rat OB and they have been associated to neuronal proliferation *in vivo* and *in vitro*
48 (Nyberg et al. 2005), we investigated the modulation of GIPR during the migration of
49 NPCs from the SEZ through the granule cell layer to the glomerular layer after MPTP
50 infusion. We observed through immunohistochemical analysis an intense expression
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 of GIPR in the cytoplasm of cells in the GL and GCL of the OB, in both control- and
4
5 MPTP-treated animals (Fig. 4). The expression of GIPR increases significantly in
6
7 GCL region, but not in GL or SEZ regions, of the OB following the i.n. MPTP
8
9 administration. Moreover, the KI67-positive cells and GIPR were co-localized in
10
11 glomerular layer cells of the OB of the MPTP-treated rats. To our knowledge, this
12
13 constitutes the first *in vivo* evidence suggesting that GIP might represent important
14
15 molecular target associated to neurogenesis in an experimental model of PD, and this
16
17 constitutes a very interesting field that requires additional research.
18
19
20
21

22 In conclusion, the present findings demonstrate an up-regulation of GIPR
23
24 expression in the OB, but not in the SN of rats at 7 days after i.n. MPTP infusion. The
25
26 GIPR expression may be associated to increase in the number of cells undergoing
27
28 proliferation in the GL with a concomitant reduction in the number of these cells
29
30 (KI67-positive) in the SEZ of the rat OB. In summary, our findings suggest that one
31
32 week after i.n. MPTP administration there is a migration of neurons progenitor cells
33
34 (KI-67 positive) from the SEZ through the granule cell layer to the GL that seems to
35
36 be responsible for the recovery of the olfactory function in adult rats observed at later
37
38 period following i.n. MPTP treatment.
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **Acknowledgments**

49 The authors are grateful to Timothy J. Kieffer (University of British Columbia,
50
51 Vancouver, Canada) for the donation of GIPR antibody. Work supported by:
52
53 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
54
55 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa
56
57 de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX), Instituto Nacional de Neurociência
58
59 Translacional, and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina
60
(FAPESC). R.D.S.P., R.W. and JBC are supported by research grants from CNPq.

None of the authors has any conflict of interest to disclose.

REFERENCES

- 1
2
3
4
5
6
7
8 Baker H., Liu N., Chun H. S., Saino S., Berlin R., Volpe B. and Son J. H. (2001) Phenotypic
9 differentiation during migration of dopaminergic progenitor cells to the olfactory bulb. *J*
10 *Neurosci* **21**, 8505-8513.
11
12
13
14 Bezard E., Dovero S., Bioulac B. and Gross C. (1997a) Effects of different schedules of
15 MPTP administration on dopaminergic neurodegeneration in mice. *Exp Neurol* **148**, 288-292.
16
17
18 Bezard E., Imbert C., Deloire X., Bioulac B. and Gross C. E. (1997b) A chronic MPTP model
19 reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the
20 monkey. *Brain Res* **766**, 107-112.
21
22
23
24 Bezard E., Boraud T., Chalon S., Brotchie J. M., Guilloteau D. and Gross C. E. (2001) Pallidal
25 border cells: an anatomical and electrophysiological study in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-
26 tetrahydropyridine-treated monkey. *Neuroscience* **103**, 117-123.
27
28
29
30 Braak H., Ghebremedhin E., Rub U., Bratzke H. and Del Tredici K. (2004) Stages in the
31 development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* **318**, 121-134.
32
33
34 Brown J. C., Pederson R. A., Jorpes E. and Mutt V. (1969) Preparation of highly active
35 enterogastrone. *Can J Physiol Pharmacol* **47**, 113-114.
36
37
38 Brown J. C., Dryburgh J. R., Ross S. A. and Dupre J. (1975) Identification and actions of
39 gastric inhibitory polypeptide. *Recent Prog Horm Res* **31**, 487-532.
40
41
42
43 Chiueh C. C., Markey S. P., Burns R. S., Johannessen J. N., Jacobowitz D. M. and Kopin I. J.
44 (1984) Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine
45 (MPTP) in rat, guinea pig, and monkey. *Psychopharmacol Bull* **20**, 548-553.
46
47
48
49 Dluzen D. E. and Kefalas G. (1996) The effects of intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-
50 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) upon catecholamine concentrations within olfactory bulbs
51 and corpus striatum of male mice. *Brain Res* **741**, 215-219.
52
53
54
55 Doetsch F. and Alvarez-Buylla A. (1996) Network of tangential pathways for neuronal
56 migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14895-14900.
57
58
59 Doetsch F., Garcia-Verdugo J. M. and Alvarez-Buylla A. (1997) Cellular composition and
60 three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian
brain. *J Neurosci* **17**, 5046-5061.

1
2
3 Doetsch F., Caille I., Lim D. A., Garcia-Verdugo J. M. and Alvarez-Buylla A. (1999)
4 Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**,
5 703-716.
6
7

8
9 Doty R. L., Deems D. A. and Stellar S. (1988) Olfactory dysfunction in parkinsonism: a
10 general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology*
11 **38**, 1237-1244.
12
13

14
15 Doty R. L., Bromley S. M. and Stern M. B. (1995) Olfactory testing as an aid in the diagnosis
16 of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. *Neurodegeneration* **4**,
17 93-97.
18
19

20
21 Dupre J., Ross S. A., Watson D. and Brown J. C. (1973) Stimulation of insulin secretion by
22 gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab* **37**, 826-828.
23
24

25 Duvoisin R. (1991) *Parkinson's disease*. Third Edition. Raven Press, New York.
26
27

28 Franco J., Prediger R. D., Pandolfo P., Takahashi R. N., Farina M. and Dafre A. L. (2007)
29 Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-
30 tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb.
31 *Life Sci* **80**, 1906-1914.
32
33

34
35 Gage F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-1438.
36
37

38 Gault V. A., O'Harte F. P., Harriott P., Mooney M. H., Green B. D. and Flatt P. R. (2003)
39 Effects of the novel (Pro3)GIP antagonist and exendin(9-39)amide on GIP- and GLP-1-
40 induced cyclic AMP generation, insulin secretion and postprandial insulin release in obese
41 diabetic (ob/ob) mice: evidence that GIP is the major physiological incretin. *Diabetologia* **46**,
42 222-230.
43
44
45

46
47 Hayakawa H., Hayashita-Kinoh H., Nihira T., Seki T., Mizuno Y. and Mochizuki H. (2007) The
48 isolation of neural stem cells from the olfactory bulb of Parkinson's disease model. *Neurosci*
49 *Res* **57**, 393-398.
50
51
52

53 Kalaria R. N., Mitchell M. J. and Harik S. I. (1987) Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-
54 tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc*
55 *Natl Acad Sci U S A* **84**, 3521-3525.
56
57
58

59 Lois C. and Alvarez-Buylla A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult
60 mammalian brain. *Science* **264**, 1145-1148.

1
2
3 Lois C., Garcia-Verdugo J. M. and Alvarez-Buylla A. (1996) Chain migration of neuronal
4 precursors. *Science* **271**, 978-981.
5
6

7
8 Luskin M. B. (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons
9 derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* **11**, 173-189.
10

11
12 Muller T., Farahati J., Kuhn W., Eising E. G., Przuntek H., Reiners C. and Coenen H. H.
13 (1998) [¹²³I]beta-CIT SPECT visualizes dopamine transporter loss in de novo parkinsonian
14 patients. *Eur Neurol* **39**, 44-48.
15
16

17
18 Nyberg J., Jacobsson C., Anderson M. F. and Eriksson P. S. (2007) Immunohistochemical
19 distribution of glucose-dependent insulintropic polypeptide in the adult rat brain. *J Neurosci*
20 *Res* **85**, 2099-2119.
21
22

23
24 Nyberg J., Anderson M. F., Meister B., Alborn A. M., Strom A. K., Brederlau A., Illerskog A.
25 C., Nilsson O., Kieffer T. J., Hietala M. A., Ricksten A. and Eriksson P. S. (2005) Glucose-
26 dependent insulintropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces
27 progenitor cell proliferation. *J Neurosci* **25**, 1816-1825.
28
29
30

31
32 Passos G. F., Figueiredo C. P., Prediger R. D., Pandolfo P., Duarte F. S., Medeiros R. and
33 Calixto J. B. (2009) Role of the macrophage inflammatory protein-1alpha/CC chemokine
34 receptor 5 signaling pathway in the neuroinflammatory response and cognitive deficits
35 induced by beta-amyloid peptide. *Am J Pathol* **175**, 1586-1597.
36
37

38
39 Paxinos G. and Watson C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates* Academic Press,
40 .(4th ed). New York
41
42

43
44 Petreanu L. and Alvarez-Buylla A. (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb
45 granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* **22**, 6106-6113.
46

47
48 Prediger R. D., Da Cunha C. and Takahashi R. N. (2005) Antagonistic interaction between
49 adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in
50 reserpine-treated rats. *Behav Pharmacol* **16**, 209-218.
51
52

53
54 Prediger R. D., Batista L. C., Medeiros R., Pandolfo P., Florio J. C. and Takahashi R. N.
55 (2006) The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical
56 features of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **202**, 391-403.
57
58
59
60

1
2
3 Prediger R. D., Rial D., Medeiros R., Figueiredo C. P., Doty R. L. and Takahashi R. N.
4 (2009a) Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)
5 rat model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* **1170**, 629-636.
6
7

8
9 Prediger R. D., Aguiar A. S., Jr., Rojas-Mayorquin A. E., Figueiredo C. P., Matheus F. C.,
10 Ginestet L., Chevarin C., Bel E. D., Mongeau R., Hamon M., Lanfumey L. and Raisman-
11 Vozari R. (2009b) Single Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-
12 Tetrahydropyridine in C57BL/6 Mice Models Early Preclinical Phase of Parkinson's Disease.
13 *Neurotox Res*.
14
15
16

17
18 Przedborski S. and Vila M. (2001) The last decade in Parkinson's disease research. Basic
19 sciences. *Adv Neurol* **86**, 177-186.
20
21

22 Riederer P. and Wuketich S. (1976) Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's
23 disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural*
24 *Transm* **38**, 277-301.
25
26
27

28 Rojo A. I., Montero C., Salazar M., Close R. M., Fernandez-Ruiz J., Sanchez-Gonzalez M. A.,
29 de Sagarra M. R., Jackson-Lewis V., Cavada C. and Cuadrado A. (2006) Persistent
30 penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. *Eur J*
31 *Neurosci* **24**, 1874-1884.
32
33
34

35
36 Ross S. A., Brown J. C. and Dupre J. (1977) Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide
37 following oral glucose in diabetes mellitus. *Diabetes* **26**, 525-529.
38
39

40 Schmidt N. and Fergert B. (2001) Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's
41 disease. *J Neural Transm* **108**, 1263-1282.
42
43

44 Trumper A., Trumper K. and Horsch D. (2002) Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic
45 signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta(INS-1)-cells. *J Endocrinol*
46 **174**, 233-246.
47
48
49

50 Trumper A., Trumper K., Trusheim H., Arnold R., Goke B. and Horsch D. (2001) Glucose-
51 dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic
52 signaling. *Mol Endocrinol* **15**, 1559-1570.
53
54
55

56 Usdin T. B., Mezey E., Button D. C., Brownstein M. J. and Bonner T. I. (1993) Gastric
57 inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide
58 receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* **133**,
59 2861-2870.
60

1
2
3 Winner B., Cooper-Kuhn C. M., Aigner R., Winkler J. and Kuhn H. G. (2002) Long-term
4 survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J*
5 *Neurosci* **16**, 1681-1689.
6
7

8
9 Yamada M., Onodera M., Mizuno Y. and Mochizuki H. (2004) Neurogenesis in olfactory bulb
10 identified by retroviral labeling in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-
11 treated adult mice. *Neuroscience* **124**, 173-181.
12
13

14
15 Yip R. G. and Wolfe M. M. (2000) GIP biology and fat metabolism. *Life Sci* **66**, 91-103.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

1
2
3 Figure legends:
4
5
6
7

8 Figure 1. The effects of intranasal administration of MPTP (1 mg/nostril) on odor
9 discrimination ability of rats ($n = 8$ animals in each group). The animals were placed
10 for 5 min in a cage, divided into two identical compartments, where it could choose
11 between one compartment with fresh sawdust (non-familiar; grey) and another with
12 unchanged sawdust that the same rat had occupied for 48 h before the test (familiar;
13 white). $*P \leq 0.05$ compared to the percentage of time spent in the familiar
14 compartment of the same group (Newman-Keuls test).
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 Figure 2. The effects of intranasal administration of MPTP (1 mg/nostril) on tyrosine
27 hydroxylase (TH) expression were demonstrated by immunohistochemistry in the
28 glomerular layer (GL) and external plexiform layer (EPL) of olfactory bulb (A), SN (C)
29 and striatum (E) of rats, 7 days after MPTP or vehicle administration. The positive
30 cells were visualized by DAB staining (brown). A few TH-positive cells are found in
31 the external plexiform layer (EPL). The semi-quantitative results of TH
32 immunostaining, in OB (B), SNpc (D) and striatum (F), were obtained by
33 densitometry. The apoptotic death was evaluated in in substantia nigra *pars*
34 *compacta* (SNpc) (G and H), using anti-cleaved caspase-3 antibody. The values
35 represent the mean \pm S.E.M. optical density of 3 animals in each group. $*P \leq 0.05$
36 compared to the control group (unpaired Student's t-test). The magnification of all
37 images is the same (Scale bar = 100 μ m).
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Figure 3. The effects of intranasal administration of MPTP (1 mg/nostril) on glucose-
4 dependent insulinotropic peptide receptor (GIPR) expression were demonstrated by
5 immunohistochemistry in the subependymal zone (SEZ), granule cell layer (GCL) and
6 glomerular layer (GL) of olfactory bulb (A), 7 days after MPTP or vehicle
7 administration. The semi-quantitative results of GIPR immunostaining in different OB
8 regions (B, C, D) were obtained by densitometry and the values represent the mean
9 \pm S.E.M. optical density of 3 animals in each group. * $P \leq 0.05$ compared to the control
10 group (unpaired Student's t-test). gr, granule cells, m, mitral cells. Scale bars: (OB)
11 500 μ m (SEZ, GCL and GL) 50 μ m.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 Figure 4. Fig. 2 The effects of intranasal administration of MPTP (1 mg/nostril) on
28 presumably migrating cells through different regions of olfactory bulb (OB). The
29 proliferation of cells was evaluated using anti-KI67 antibody, and the positive cells
30 (*arrowhead*) were visualized by DAB staining (brown). The number of proliferation
31 cells in was quantified in subependymal zone (SEZ) (B), granule cell layer (GCL) (C)
32 and glomerular layer (GL) (D) of OB, 7 days after MPTP or vehicle administration.
33 Cells co-localized KI67 and GIPR double positive cells in GL (E). The values
34 represent the amount of KI67-positive cells per mm^2 or percentage of positive cells
35 per field and were expressed by the mean \pm S.E.M. of 3 animals in each group.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48 * $P \leq 0.05$ compared to the control group (unpaired Student's t-test). The magnification
49 of all images is the same (Scale bar = 50 μ m).
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figures:

Fig. 1.

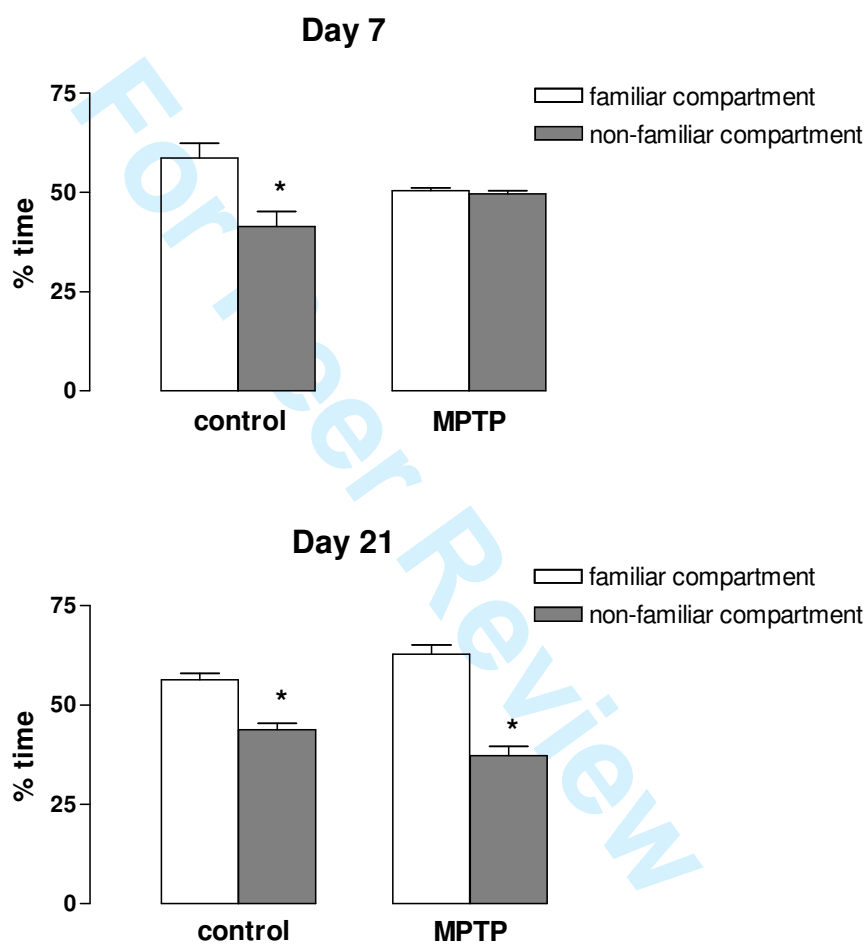
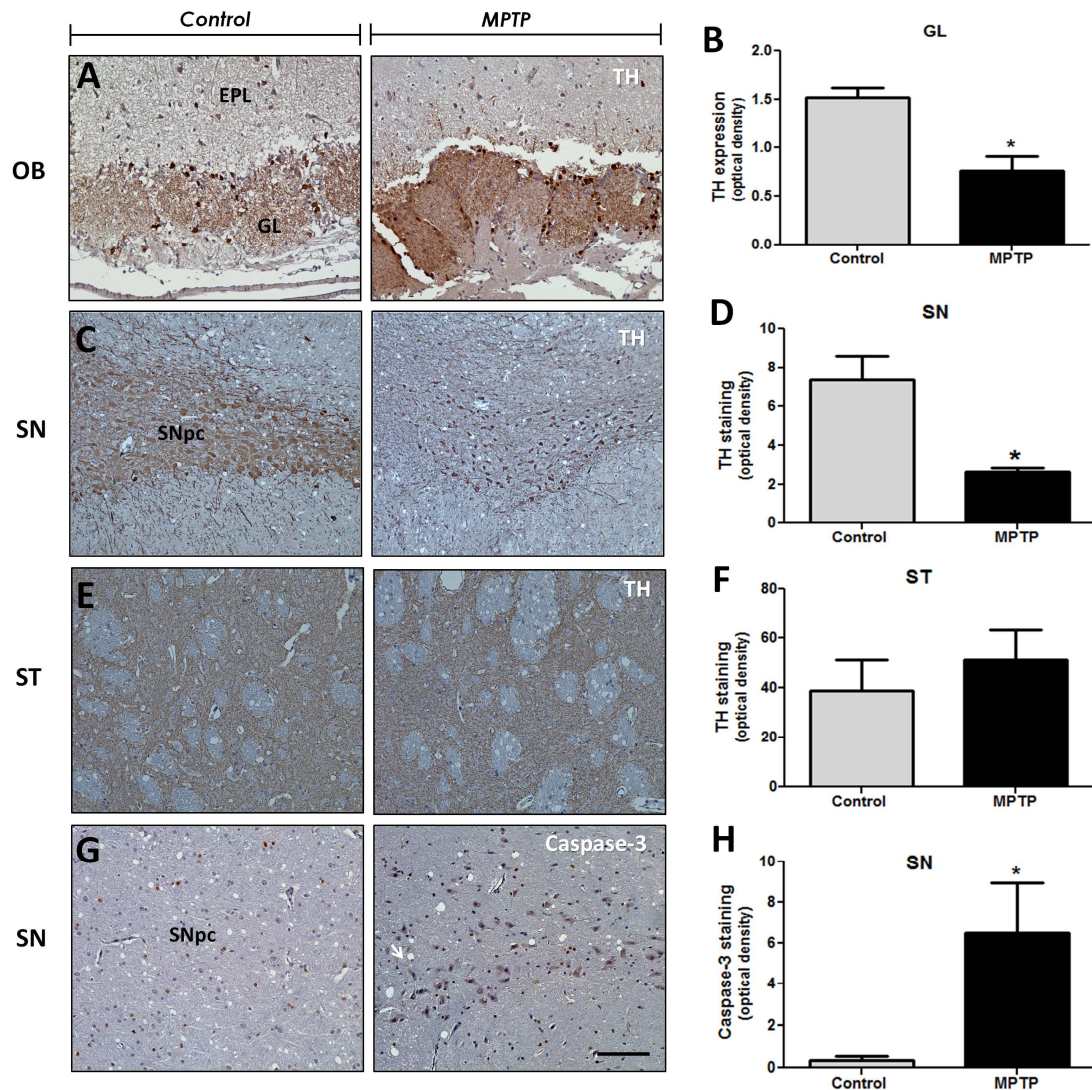


Fig. 2



new

Fig. 3

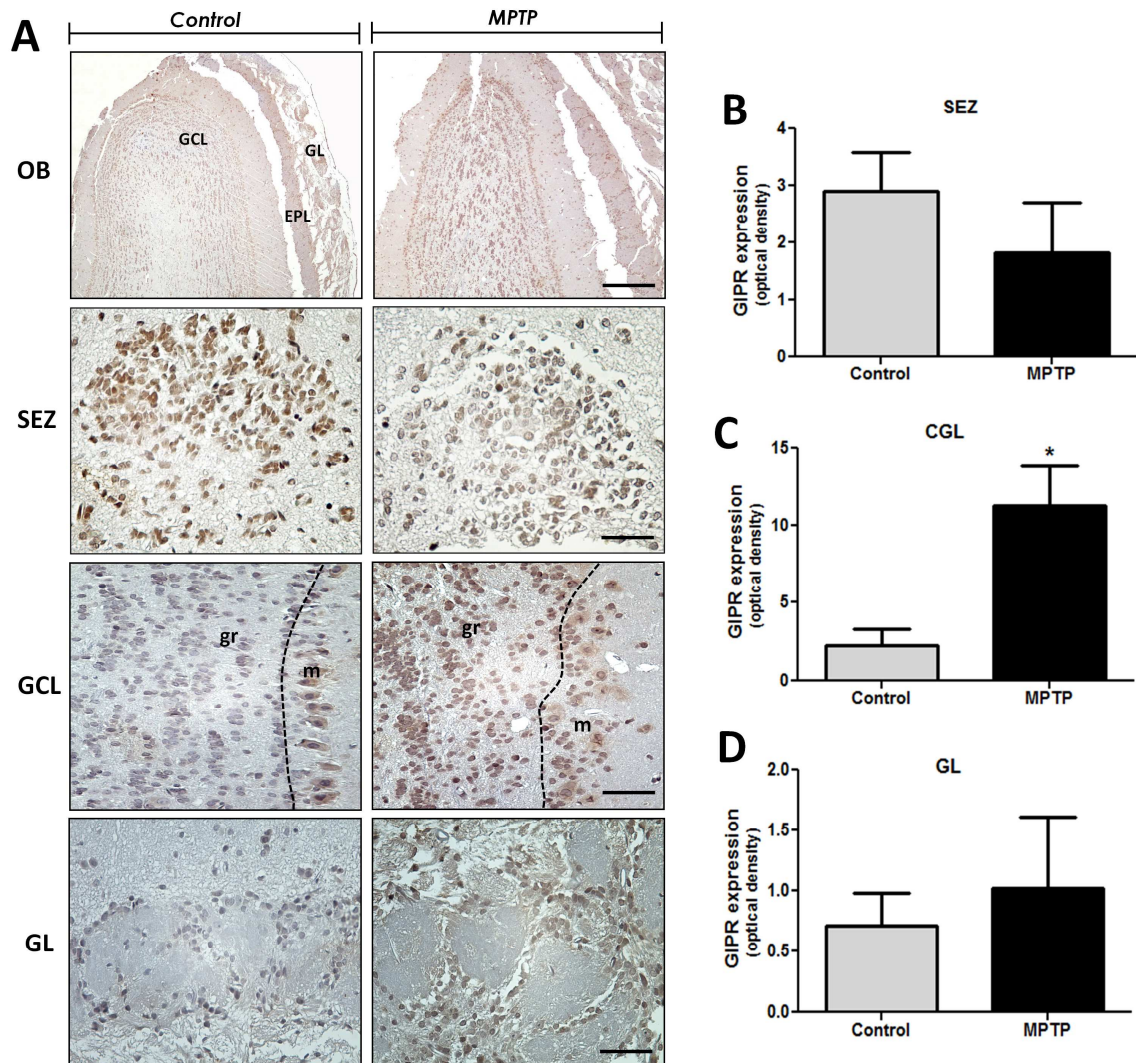
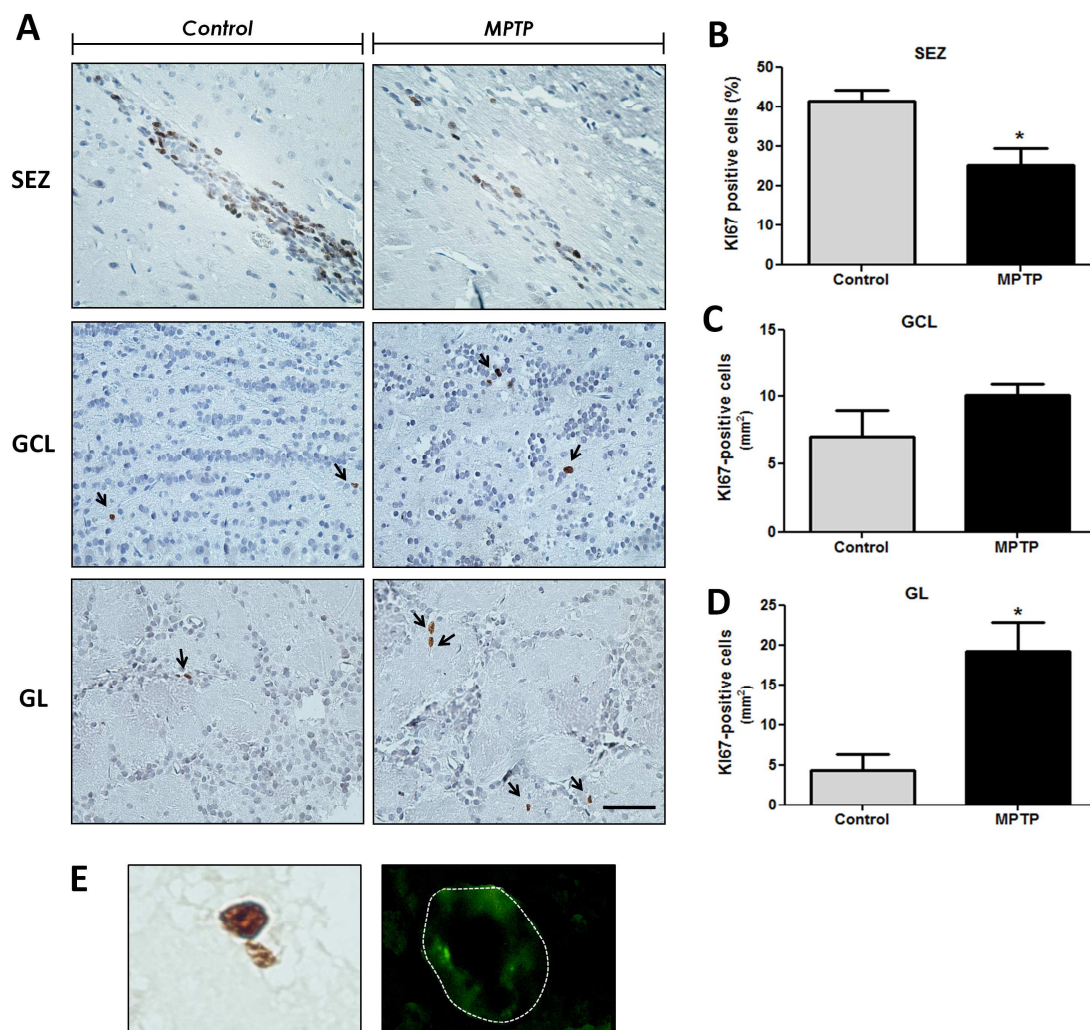


Fig. 4



CAPÍTULO 4

*AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO PEPTÍDEO
INSULINOTRÓPICO DEPENDENTE DE GLICOSE (GIP) NOS DÉFICITS
COGNITIVOS E MECANISMOS DE SINAPTOXICIDADE INDUZIDOS PELO
PEPTÍDEO $A\beta_{1-40}$*

Resultados preliminares

RESULTADOS PRELIMINARES

1. Introdução

A DA é caracterizada por desordem neurodegenerativa intimamente associada ao processo de envelhecimento. Os pacientes portadores da DA apresentam, entre outros sintomas, prejuízo cognitivo, dificuldade para realizar tarefas habituais e para se comunicar, desorientação no tempo e no espaço, diminuição da capacidade de juízo e de crítica, dificuldade de raciocínio e alterações freqüentes do humor e do comportamento. Estes sintomas parecem ser resultantes da indução da via amiloidogênica, a qual resulta no acúmulo de placas compostas pelo peptídeo A β no parênquima extracelular do cérebro. Estas placas são formadas pelo acúmulo de peptídeos amilóides causado pela alteração na estrutura conformacional na proteína precursora do peptídeo amilóide (APP) (Glennner e Wong, 1984), associado a formação de emaranhados neurofibrilares, como resultado da hiperfosforilação da proteína Tau dos microtúbulos dos neurônios (Grundke-Iqbal, Iqbal et al., 1986). O acúmulo destes marcadores é normalmente acompanhado pela morte neuronal, principalmente em áreas corticais e do hipocampo, resultando, conseqüentemente, na perda progressiva das funções cognitivas (Selkoe, 2000). O prejuízo cognitivo característico dessa patologia parece ser resultante das alterações sinápticas induzidas pelo via amiloidogênica que promovem um prejuízo nos terminais pré-sinápticos dos sistemas de neurotransmissores, onde o sistema colinérgico parece ser o primeiro afetado, seguido pelo sistema glutamatérgico e finalmente os terminais gabaérgicos (Bell & Cuello, 2006).

Os fatores desencadeantes deste processo são desconhecidos, o que dificulta o desenvolvimento de modelos experimentais no qual o acúmulo dos

peptídeos A β ocorra de forma espontânea. Prejuízos sensoriais e cognitivos, até certo ponto semelhantes aos observados na DA, também têm sido documentados tanto em animais selvagens velhos com idade igual ou superior a 14 meses (Wallace, Krauter et al., 1980; Wallace, Krauter et al., 1980; Hazzard, 1991; Prediger, Batista et al., 2005), como em camundongos transgênicos que apresentam expressão aumentada da proteína precursora de amilóide (APP) (Hsiao, Chapman et al., 1996; Westerman, Cooper-Blacketer et al., 2002).

Atualmente, uma das ferramentas mais utilizadas por diferentes grupos de pesquisa para estudar experimentalmente a DA em animais de laboratório (como roedores) consiste na utilização de metodologias capazes de induzir o acúmulo da proteína A β no cérebro dos animais. Estudos anteriores do nosso grupo (Medeiros, Prediger et al., 2007; Prediger, Franco et al., 2007; Prediger, Medeiros et al., 2008), demonstraram que uma única administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀, um peptídeo análogo aos encontrados nas placas senis dos pacientes com a DA, resulta em prejuízos importantes nas funções de aprendizado e de memória. Diante disso, no presente estudo avaliamos os efeitos do pré-tratamento com peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) administrado pela via intracerebroventricular (i.c.v.) sobre o prejuízo cognitivo, modificações sinápticas, no aumento da proteína pró-inflamatória TNF- α , e das enzimas iNOS e nNOS, induzidos pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Para a realização dos experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos Suíços machos, com 3-4 meses de idade. Ratos Wistar de 7 a 10 dias pós-natal (P7-P10), de ambos os sexos, foram utilizados para as culturas de células. Os animais foram criados no Biotério Setorial do LAFEX (Depto. de Farmacologia, CCB, UFSC), mantidos em câmaras ventiladas (ALESCO, Monte Mor, SP, Brasil), em ambiente controlado a uma temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade entre 60 – 80%, ciclo claro/escuro de 12 h e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. O presente estudo seguiu as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (NIH *Publication* No. 85-23, revisado em 1996). Os procedimentos empregados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/UFSC (PP00111; Ofício nº 090/CEUA/PRPe/2007).

2.2 Protocolo experimental

O peptídeo $A\beta_{1-40}$ (Tocris, Ellisville, MO, USA) foi dissolvido em tampão fosfato (PBS; 1 mg/ml) e incubado por 4 dias a 37°C , seguido da confirmação da agregação do mesmo, utilizando método de eletroforese em gel nativo corado com nitrato de prata. O peptídeo GIP_{1-42} humano (Bachem, Torrance, CA, USA) foi dissolvido em PBS estéril (1 mM) e administrado via i.c.v. (0,5 nmol/camundongo) 15 min antes da administração i.c.v. de $A\beta_{1-40}$. O GIP e o peptídeo $A\beta_{1-40}$ foram sempre administrados no terceiro ventrículo em hemisférios diferentes, de maneira randomizada. Um grupo controle recebeu apenas PBS i.c.v. A forma agregada do peptídeo $A\beta_{1-40}$ (400

pmol/camundongo) ou a solução veículo (PBS) também foram administradas via i.c.v. como descrito anteriormente (Medeiros, Prediger et al., 2007; Prediger, Franco et al., 2007; Passos, Figueiredo et al., 2009). De maneira sucinta, os animais foram anestesiados com isoflurano (2,5%; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) através de um sistema de vaporização (SurgiVet Inc., Waukesha, WI, USA), e uma agulha 26 *gauges* de 3 mm de comprimento, acoplada à uma microseringa (10 µl; Hamilton, Reno, NV, EUA), inserida unilateralmente (1 mm) no ponto médio eqüidistante entre os olhos a uma distância igual entre os olhos e as orelhas, perpendicular ao plano do crânio. Um volume de 3 µl da solução contendo GIP, A β_{1-40} ou PBS foi injetado em um dos ventrículos laterais, nas seguintes coordenadas, a partir do Bregma: anteroposterior (AP) = -0,22 mm, mediolateral (ML) = 1 mm, e dorsoventral (DV) = -3 mm (Franklin e Paxinos, 1997). As soluções foram injetadas (i.c.v.) gradualmente durante um intervalo de 5 seg. Ao final dos experimentos os animais foram sacrificados e a correta inserção da agulha foi avaliada através de análise histológica.

A análise da imunodeteccção das proteínas sinaptofisina, iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e nNOS (óxido nítrico sintase neuronal) foi realizada em tecidos obtidos 8 dias após o tratamento i.c.v. com A β_{1-40} (Medeiros, Prediger et al., 2007; Passos, Figueiredo et al., 2009). O teste do Labirinto Aquático de Morris foi realizado no 7º e 8º dias após a administração i.c.v. de A β_{1-40} .

2.3 Labirinto Aquático de Morris

Os efeitos do pré-tratamento i.c.v com o GIP sobre os prejuízos cognitivos induzidos pela administração i.c.v. do peptídeo A β_{1-40} foram avaliados através do teste do Labirinto Aquático de Morris (Morris, Garrud et al., 1982). O labirinto

aquático consiste de um tanque circular de cor preta (97 cm de diâmetro e 60 cm de altura), localizado no interior de uma sala com algumas pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água, cuja temperatura foi mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, através de um sistema automatizado de resistência. 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). No interior do tanque (posição sudoeste) foi colocada uma plataforma de acrílico transparente (10 x 10 cm), submersa 1 cm da superfície da água. O protocolo experimental consistiu em uma sessão de treino e uma sessão de teste, conforme descrito anteriormente (Medeiros, Prediger et al., 2007; Prediger, Franco et al., 2007; Passos, Figueiredo et al., 2009). Os animais foram submetidos à sessão de treino 7 dias após a injeção de $\text{A}\beta_{1-40}$. As sessões de teste foram realizadas 24 h após o treino. Durante o treinamento os animais foram colocados para nadar até encontrarem a plataforma, em um período máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse intervalo de tempo, o mesmo foi conduzido manualmente até a mesma, onde permaneceu por 10 s. Após os 10 s sobre a plataforma, o animal foi retirado do labirinto e colocado em uma caixa por 5 min, sendo então posicionado no ponto de partida seguinte. O tempo (latência) necessário para o animal encontrar a plataforma foi registrado. Este procedimento foi realizado 10 vezes durante a sessão de treino, onde os animais foram liberados para nadar de pontos de partida diferentes de forma pseudo-aleatória, sendo que nesta etapa a plataforma permaneceu na mesma posição (quadrante Sudeste). Na sessão de teste, realizada 24 h após o treino, a plataforma foi removida do tanque e os animais foram colocados para nadar (a partir da posição Norte) durante 60 s, durante os quais foi contabilizado o tempo (latência) para os camundongos encontrarem a plataforma e o tempo despedido (duração) no

quadrante onde a plataforma estava na sessão treino. Durante as 10 sessões de treino para aprendizado da localização da plataforma fixa submersa (posição sudeste), foi avaliado o tempo (latência) para o animal encontrar a plataforma em cada sessão de treino. Na sessão de teste foi avaliada a % de tempo no quadrante correto, o tempo de latência para o animal localizar a plataforma e a velocidade de nado (m/s).

2.4 Análise Histológica e Imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica no cérebro dos camundongos foi realizada 8 dias após o pré-tratamento com GIP e administração do peptídeo A β ₁₋₄₀, ambos i.c.v, conforme descrito anteriormente (Passos, Figueiredo et al., 2009). Para tal, os cérebros dos animais foram coletados após processo de perfusão com solução fisiológica e paraformaldeído 4% em PBS (P/v), sendo mantidos nessa mesma solução durante 24 h. Posteriormente, foram realizadas secções coronais na região central do hipocampo, seguido de processamento histológico, inclusão em parafina e microtomia. Os cortes teciduais de espessura de 3–4 μ m foram montados sobre lâminas carregadas positivamente, preparadas através da imersão das mesmas em solução de ATPS (3-amino-propil-trietoxisilano; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona (v/v). Em seguida, as lâminas de vidro contendo os cortes histológicos foram mantidas em estufa, durante 1 h, a uma temperatura de aproximadamente 50°C, para fixação dos mesmos. Após fixação, as secções histológicas foram desparafinadas através de imersões consecutivas em xilol e rehidratados por passagens sucessivas em etanol, em concentrações decrescentes

(etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% em metanol absoluto (v/v), durante 20 min, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as amostras foram submetidas à reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 durante 35 min, em banho-maria ajustado para 95–98°C. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada e PBS. A imunodeteção das proteínas de interesse foi realizada utilizando os anticorpos anti-sinaptofisina (1:400; Novocastra, Newcastle, Reino Unido), anti-óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (1:200, NeoMarks, Fremont, CA, USA), e anti-óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida durante 12–16 h, a uma temperatura de 2–8°C. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS e os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo dependendo da natureza do anticorpo primário (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) em câmara úmida durante 50 min à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS e a detecção foi realizada utilizando o sistema da streptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation). Após 30 min de incubação das lâminas em câmara úmida com a solução de streptavidina-biotina-peroxidase à temperatura ambiente, as mesmas foram lavadas com PBS e a detecção foi

completada utilizando-se uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydrocloro) (DAB, Sigma-Aldrich) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (Merck). Posteriormente, foi realizada contra-coloração das secções histológicas em solução de hematoxilina de Harris, desidratação das mesmas através de imersões em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente (Entellan, Merck). Para cada reação foi utilizado um controle negativo, no qual o corte histológico foi incubado somente com a solução diluente (abolição do anticorpo primário). Os resultados foram documentados utilizando uma câmera digital (Sight DS-5ML1), acoplada a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon, Melville, NY, USA). Para análise de cada reação antígeno-anticorpo, foram obtidas cinco imagens a partir dos cortes histológicos do hipocampo dos camundongos, sendo uma imagem para cada sub-região do hipocampo (CA1, CA2, CA3, hilus e GD) (25 imagens/animal). A densidade óptica que melhor discriminou a imunomarcagem (coloração castanha) foi obtida utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b. Para a análise dos níveis de sinaptofisina, iNOS e nNOS, a intensidade total de pixels foi determinada e os dados foram expressos como densidade óptica (D.O.). A metodologia utilizada para avaliar o prejuízo sináptico, utilizando a detecção dos níveis de sinaptofisina, foi previamente validada em modelos experimentais de neurodegeneração (Buttini, Orth et al., 1999) e em cérebros de humanos acometidos por doenças degenerativas (Masliah, Achim et al., 1992).

2.5 Quantificação relativa dos transcritos do gene TNF- α e nNOS através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações moleculares após pré-tratamento com GIP e administração do peptídeo A β ₁₋₄₀, alguns animais foram sacrificados por decapitação e seus encéfalos foram removidos e lavados com solução salina (NaCl 0,9%) gelada. Imediatamente após, o cérebro foi dissecado sobre uma placa de Petri rodeada por pedras de gelo seco, formando assim um microambiente gelado. Os hipocampus foram dissecados e homogeneizados em solução de TRIzol® (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) para extração do RNA total. Posteriormente, foram adicionados 100 μ l de clorofórmio ao homogeneizado, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12.000 x g, 15 min, 4°C). A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 250 μ l de isopropanol. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso à temperatura ambiente por 10 min. A mistura foi centrifugada (12.000 x g, 15 min, 4°C), sendo o sedimento resultante ressuspensionado em 500 μ l de etanol gelado. Após centrifugação (7.000 x g, 5 min, 4°C), o sedimento contendo o RNA foi dissolvido em água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC), sendo que sua concentração e pureza foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 260/280 nm. Na seqüência, foi realizado o ensaio de transcrição reversa com objetivo de determinar o efeito da administração i.c.v. do peptídeo GIP e/ou A β ₁₋₄₀ sobre a expressão do RNA mensageiro (RNAm) para TNF- α ou nNOS. Amostras contendo 2 μ g de RNA total foram incubadas em um volume final de 12,5 μ l de reação em presença de 0,05 μ g de oligo dT, 2U de inibidor de RNase, dNTPs (144 μ M), 50 U de enzima transcriptase reversa (M-MLV) e água-DEPC para completar o volume, todos da Invitrogen (São Paulo, SP, Brasil). Antes da adição da enzima, os tubos foram aquecidos por 5 min a 70°C, resfriados à 4°C por 5 min e incubados à 25°C durante

a adição da transcriptase reversa. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 60 min, 70°C por 5 min e resfriadas à 4°C por 5 min. Dos 12,5 µl da reação de cDNA, 1 µl foi utilizado para cada reação de PCR em Tempo Real. As reações foram realizadas utilizando-se da química *TaqMan*, que consistiu do *TaqMan PCR Master Mix* e sondas para nNOS (código Mm00435175_m1) e para TNF-α (código Mm00443258_m1) todos da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), em um volume final de reação de 10 µL, conforme orientações do fabricante.

2.6 Avaliação do efeito do GIP na citotoxicidade induzida pelo peptídeo Aβ₁₋₄₀ em cultura primária de neurônios cerebelares

As culturas de neurônios granulares do cerebelo foram preparadas conforme previamente descrito (Thangnipon, Kingsbury et al., 1983), a partir de ratos Wistar de 7 a 10 dias pós-natal. Os cerebelos dissecados foram incubados em solução de 2,5% de tripsina por 10 min a 37° C e dissociados mecanicamente na presença de 10% de inibidor de tripsina (T9129, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). As células foram semeadas na densidade de 5×10^4 células/poço em meio Neurobasal acrescido do suplemento B27, em placas de 96 poços sobre uma camada de lisina (*Poly-L-Lysine*) (todos procedentes da GIBCO, Invitrogen Cell Culture, Carlsbad, California, USA), sendo mantidos por 48 h em estufa a 37°C com atmosfera umedecida de 95% ar e 5% de CO₂. Após atingir 80 a 90% de confluência (aproximadamente 3-5 dias em cultura). Para investigar o possível efeito citotóxico do peptídeo Aβ₁₋₄₀ em cultura de neurônios cerebelares, foram utilizadas diferentes concentrações da forma agregada e solúvel de Aβ₁₋₄₀. Depois de estabelecida a concentração tóxica do peptídeo Aβ₁₋₄₀ nestas condições experimentais, os

neurônios cerebelares foram tratados com GIP₁₋₄₂ (10 nM) ou PBS estéril, e 30 min depois com 10 µM de Aβ₁₋₄₀ solúvel.

A viabilidade celular foi avaliada por meio do método da captação de iodeto de propídio (IP). O IP é um composto polar que penetra apenas em células mortas ou com a membrana plasmática bastante danificada. Uma vez dentro das células, o PI complexa-se com o DNA e induz uma intensa fluorescência vermelha (615 nm) que é excitada por luz verde (-535 nm) (Boeck, Ganzella et al., 2004). Vinte e quatro horas após o tratamento com GIP e/ou Aβ₁₋₄₀, as células foram incubadas por 30 min com IP (7 µg/ml) (Sigma-Aldrich), à 37° C e a fluorescência foi determinada em leitor de placas (TECAN, modelo Infinite M200, Männedorf, Switzerland). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UA). Também foi avaliada, nas mesmas células, a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizando diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA), de acordo com o método descrito previamente (Sadun, Borchert et al., 1987; LeBel, Ali et al., 1990), com algumas modificações. O DCFH₂-DA é uma sonda não fluorescente que atravessa facilmente a membrana celular, sendo hidrolisada por esterases intracelulares. A DCFH₂-DA hidrolisada é incapaz de atravessar a membrana celular, acumulando-se assim no interior das células. Na presença de ROS, particularmente peróxidos, a DCFH₂ é oxidada a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que apresenta fluorescência intensa. Conforme realizado no ensaio do IP, 24 h após o tratamento com GIP e/ou Aβ₁₋₄₀, as células foram incubadas por 30 minutos com 10 µM 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA, Merck, Darmstadt, Germany) à 37°C. A fluorescência da DCF foi posteriormente quantificada utilizando um leitor de placas (TECAN, modelo Infinite M200, Männedorf, Switzerland), em

excitação de 488 nm e emissão de 520 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UA).

2.7. Análise Estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, adequadas ao protocolo experimental. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste post-hoc de Newman-Keuls. Valores de P menores ou iguais a 0,05 ($P \leq 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Resultados

3.1. Efeito do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) no dano cognitivo induzido pelo peptídeo A β ₁₋₄₀

A DA é caracterizada clinicamente pelo declínio progressivo e irreversível das funções de aprendizado e memória (Mattson, 2004). Por esta razão, avaliamos inicialmente o efeito per se do GIP sobre os processos de aprendizado e memória espacial de camundongos. Os animais foram tratados por i.c.v. com veículo (PBS), ou com duas diferentes doses do GIP (GIP₁₋₄₂, 0,5 ou 2,0 nmol/camundongo), e 15 minutos depois foram submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris. Durante as 10 sessões de treino para aprendizado da localização da plataforma fixa submersa (posição sudeste), foi avaliado o tempo (latência) para o animal encontrar a plataforma em cada sessão de treino (Figura 1A). Vinte e quatro horas após o treinamento, a plataforma foi retirada e os animais foram submetidos à sessão de teste para avaliação da retenção da memória (Figura 1B, C e D). Na sessão de teste foi avaliada a % de tempo no quadrante correto, o tempo de latência para o animal localizar a plataforma e a velocidade de nado (m/s). Não foi possível observar alterações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados durante as sessões de treinamento [latência: $F(2,15)=2,05$, $P=0,16$] ou teste [% tempo no quadrante correto: $F(2,15)=0,88$, $P=0,43$; latência para encontrar a plataforma: $F(2,15)=0,60$, $P=0,94$; e velocidade de nado: $F(2,15)=0,21$, $P=0,81$] (Figura 1).

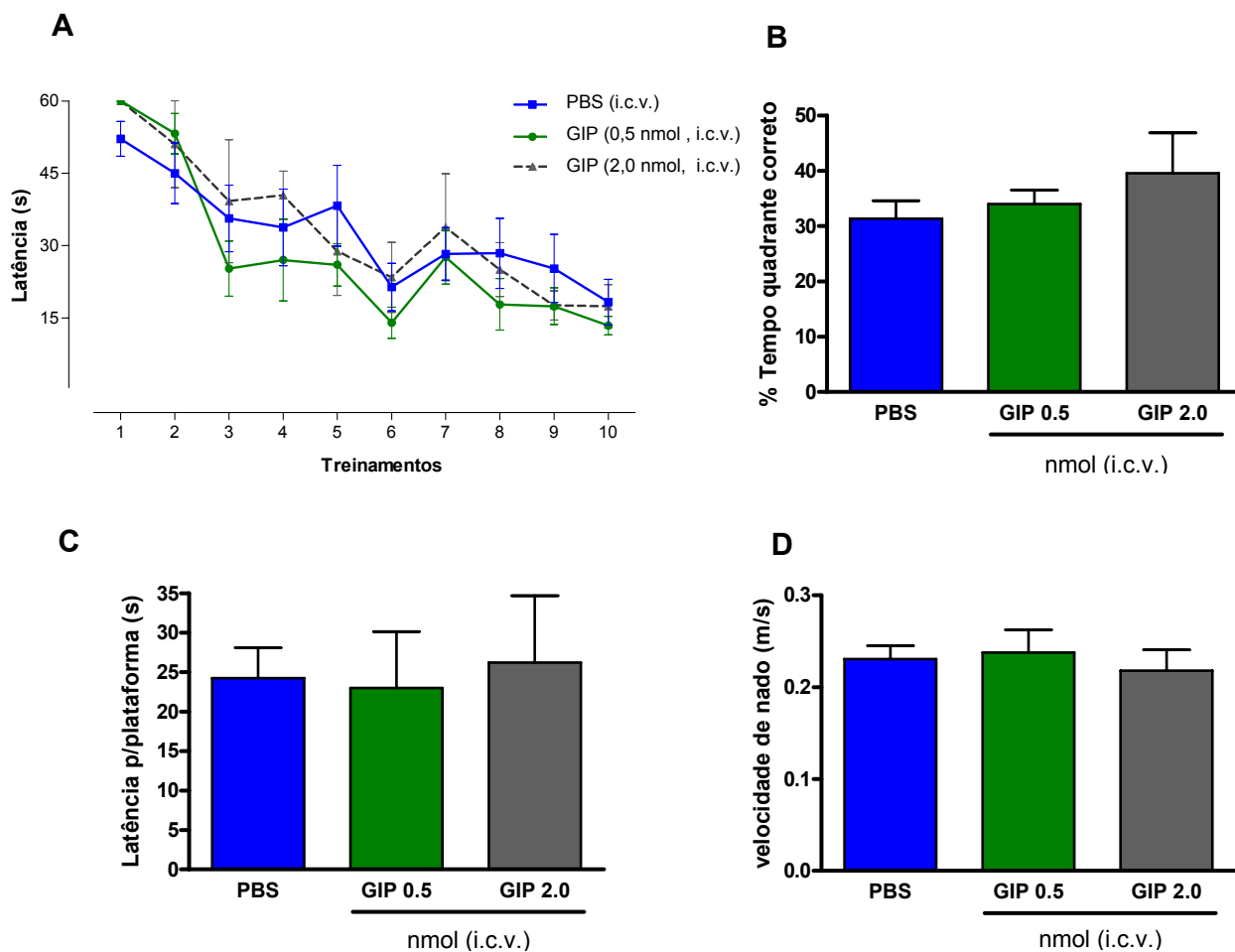


Figura 1. Efeito do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP) no aprendizado e memória espacial em camundongos. Os animais foram tratados com GIP (GIP_{1-42} , 0,5 ou 2,0 η mol/camundongo) ou veículo (PBS), por via intracerebroventricular, e 15 minutos depois os animais foram submetidos ao treino, e 24 h depois ao teste, no Labirinto Aquático de Morris. (A) Tempo decorrido (latência) para os animais encontrarem a plataforma submersa durante as sessões de treino; (B) % de tempo gasto no quadrante correto, (C) latência para encontrar a plataforma e (D) velocidade de nado na sessão de teste no Labirinto Aquático de Morris. Os valores representam a média \pm E.P.M. (N = 5–8/grupo).

Corroborando resultados prévios do nosso grupo, os resultados apresentados na Figura 2 mostram que a administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) em camundongos resultou em prejuízos no aprendizado e memória espacial, como demonstrado pelo aumento das latências para encontrar a plataforma na sessão de treino (Figura 2A), pela redução do tempo gasto no quadrante correto (Figura 2B) e aumento na latência para encontrar a plataforma (Figura 2C) na sessão de teste, em relação aos animais controle (PBS).

Para verificar o efeito do GIP no dano cognitivo induzido pelo A β ₁₋₄₀, os animais foram pré-tratados com GIP (GIP₁₋₄₂, 0,5 nmol/camundongo) ou veículo (PBS) por via i.c.v., 15 minutos antes da injeção i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀, e submetidos após 7 dias ao treinamento no labirinto aquático de Morris. Os animais pré-tratados com o GIP apresentaram uma redução dos prejuízos cognitivos induzidos pelo peptídeo A β ₁₋₄₀, como indicado pelas menores latências para encontrar a plataforma durante as sessões de treino [F(2,23)=8,44, P \leq 0,01] (Figura 2A) e teste [F(2,23)=4,12, P \leq 0,05] (Figura 2 C), além de um aumento do tempo gasto no quadrante correto no dia do teste [F(2,23)=8,87, P \leq 0,01] (Figura 2 B) em comparação aos animais que receberam veículo e A β ₁₋₄₀. É importante ser ressaltado que nenhum dos tratamentos (com GIP ou A β ₁₋₄₀) alterou a velocidade de nado dos animais [F(2,23)=0,67, P=0,52], descartando possíveis alterações motoras induzidas por estes tratamentos.

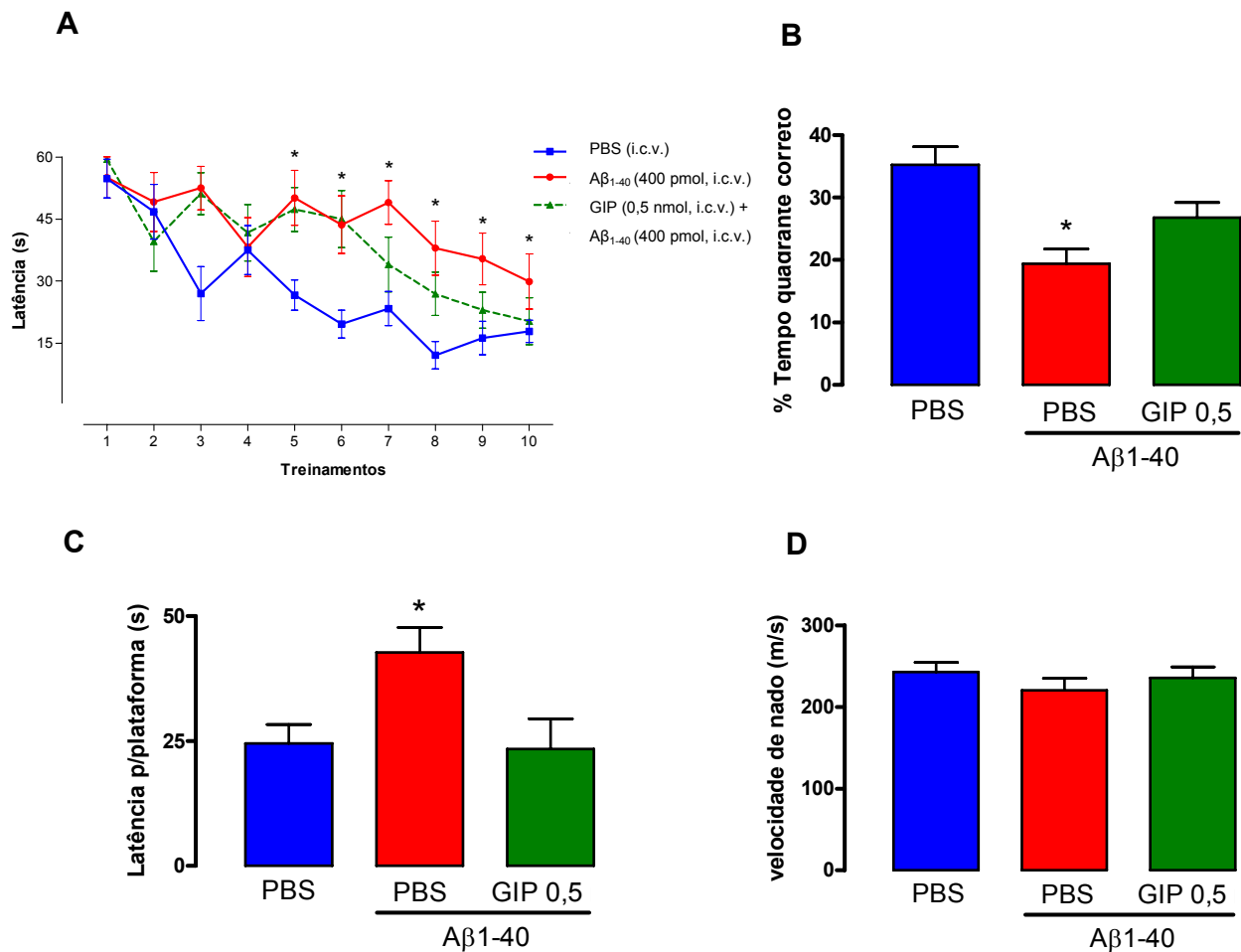


Figura 2. Efeito do peptídeo insulínotropo dependente de glicose (GIP) no dano cognitivo induzido pelo peptídeo Aβ₁₋₄₀, em camundongos. Os animais foram pré-tratados com GIP (GIP₁₋₄₂, 0,5 nmol/camundongo) ou veículo (PBS), por via intracerebroventricular (i.c.v.), e 15 minutos depois receberam injeção i.c.v. do peptídeo Aβ₁₋₄₀ (400 pmol/camundongo) ou PBS (veículo). Após 7 dias, os animais foram submetidos ao treino, e 24 h depois ao teste, no Labirinto Aquático de Morris. (A) Tempo decorrido (latência) para os animais encontrarem a plataforma submersa durante as sessões de treino, (B) % de tempo gasto no quadrante correto, (C) latência para encontrar a plataforma e (D) velocidade de nado na sessão de teste no Labirinto Aquático de Morris. Os valores representam a média ± E.P.M. (N = 5–8/grupo). *P ≤ 0,05 comparado ao grupo controle (PBS) (teste de Newman-Keuls).

3.2. Efeito do pré-tratamento com o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) na indução da disfunção sináptica pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$. Envolvimento dos marcadores inflamatórios fator de necrose tumoral (TNF- α) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS).

Com o objetivo de avaliar o efeito do GIP sobre os prejuízos sinápticos e sobre o aumento do TNF- α induzidos pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$, foi realizado um pré-tratamento dos animais com o GIP (GIP₁₋₄₂, 0,5 nmol/camundongo, i.c.v.), 15 min antes da administração da $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/camundongo, i.c.v.). De forma interessante, o pré-tratamento com GIP foi capaz de prevenir a redução dos níveis de sinaptofisina induzida pela $A\beta_{1-40}$ nas sub-regiões CA1, CA2, CA3 e GD do hipocampo de camundongos (Figura 3 A e B). Em contrapartida, este fenômeno parece não estar relacionado com a diminuição dos níveis hipocâmpais da citocina TNF- α , visto que o pré-tratamento com GIP (0,5 nmol/camundongo, i.c.v.) não preveniu o aumento da expressão do RNA mensageiro (mRNA) para o TNF- α , verificado por meio do RT-PCR quantitativo 8 dias após o tratamento com $A\beta_{1-40}$ (Figura 3 C). Estes resultados confirmam dados prévios da literatura (Selkoe, 2002; Selkoe e Schenk, 2003; Medeiros, Prediger et al., 2007; Prediger, Franco et al., 2007) e sugerem que a administração central do GIP é capaz de proteger os neurônios da sinaptotoxicidade induzida pela $A\beta_{1-40}$, independente da proteína pró-inflamatória TNF- α .

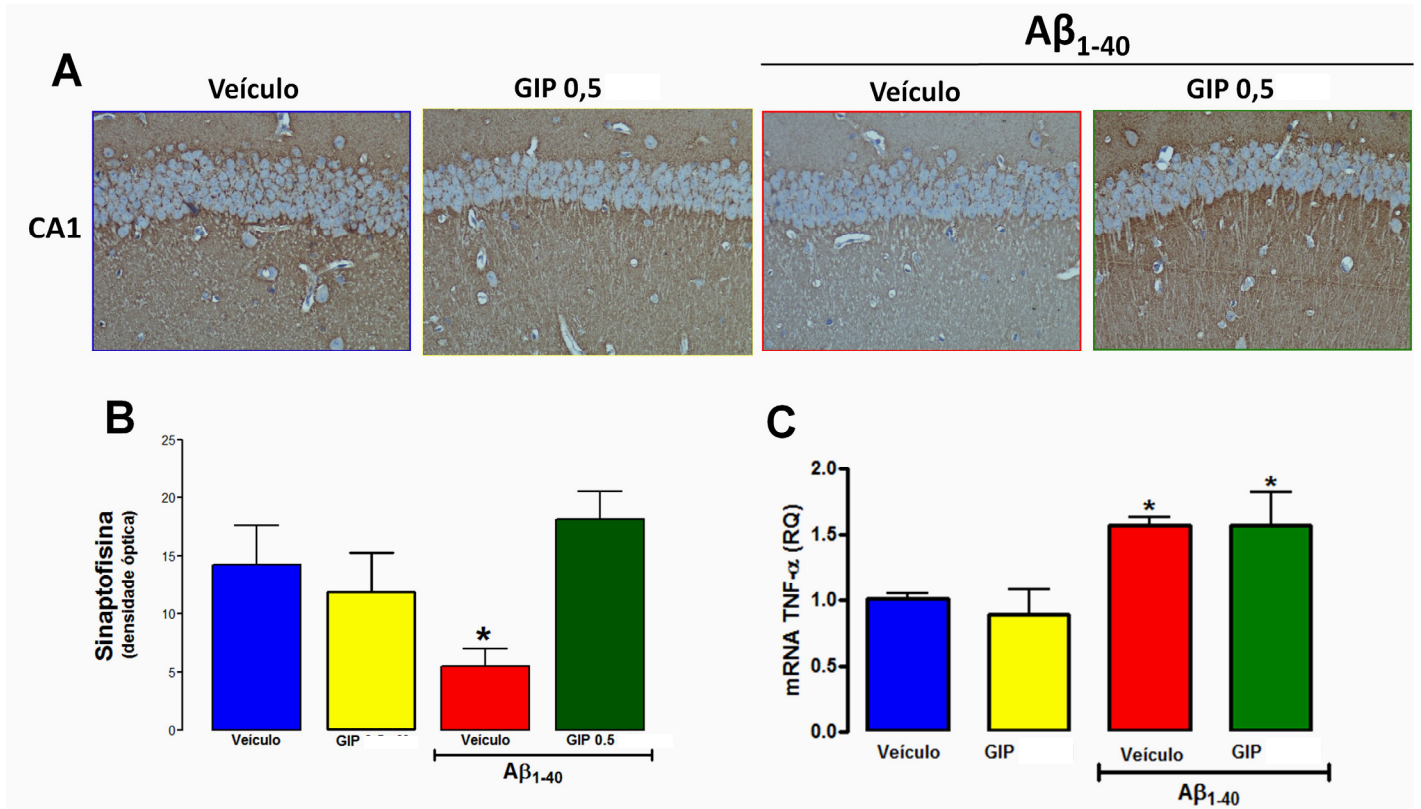


Figura 3. A administração i.c.v. do GIP previne a disfunção sináptica induzida pela $A\beta_{1-40}$. Este efeito do GIP é independente da proteína inflamatória TNF- α . Os animais foram pré-tratados com GIP (GIP₁₋₄₂, 0,5 nmol/camundongo) ou veículo (PBS) por via intracerebroventricular (i.c.v.), 15 minutos antes da administração i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$. (A) Imagens representativas da reação de imunistoquímica para a proteína pré-sináptica sinaptofisina na região CA1 do hipocampo (aumento de 40 x). (B) Medida da densidade óptica da imunorreatividade média da sinaptofisina nas regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado do hipocampo. (C) Quantificação relativa dos níveis de mRNA para a citocina TNF- α através da reação da polimerase em cadeia em tempo real. Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (n=3-5/grupo) *P \leq 0,05 comparado ao grupo controle (veículo/PBS).

Neste sentido, foi avaliado no presente estudo o efeito do pré-tratamento com GIP sobre o aumento na expressão da iNOS induzido pela $A\beta_{1-40}$. Por meio da técnica de imunistoquímica, foi verificado que o tratamento com GIP (GIP_{1-42} , 0,5 nmol/camundongo, i.c.v.), 15 minutos antes da administração da $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/camundongo, i.c.v.), diminuiu de forma importante a expressão da iNOS nas regiões CA1, CA2, CA3 e GD do hipocampo (Figura 4 A e B). Estes resultados sugerem que o aumento sustentado da expressão da iNOS, e conseqüente aumento na produção de óxido nítrico (NO), pode ser um evento importante no mecanismo sinaptotóxico induzido pela $A\beta_{1-40}$, assim como o efeito protetor exercido pelo GIP parece ser dependente da inibição da expressão da iNOS.

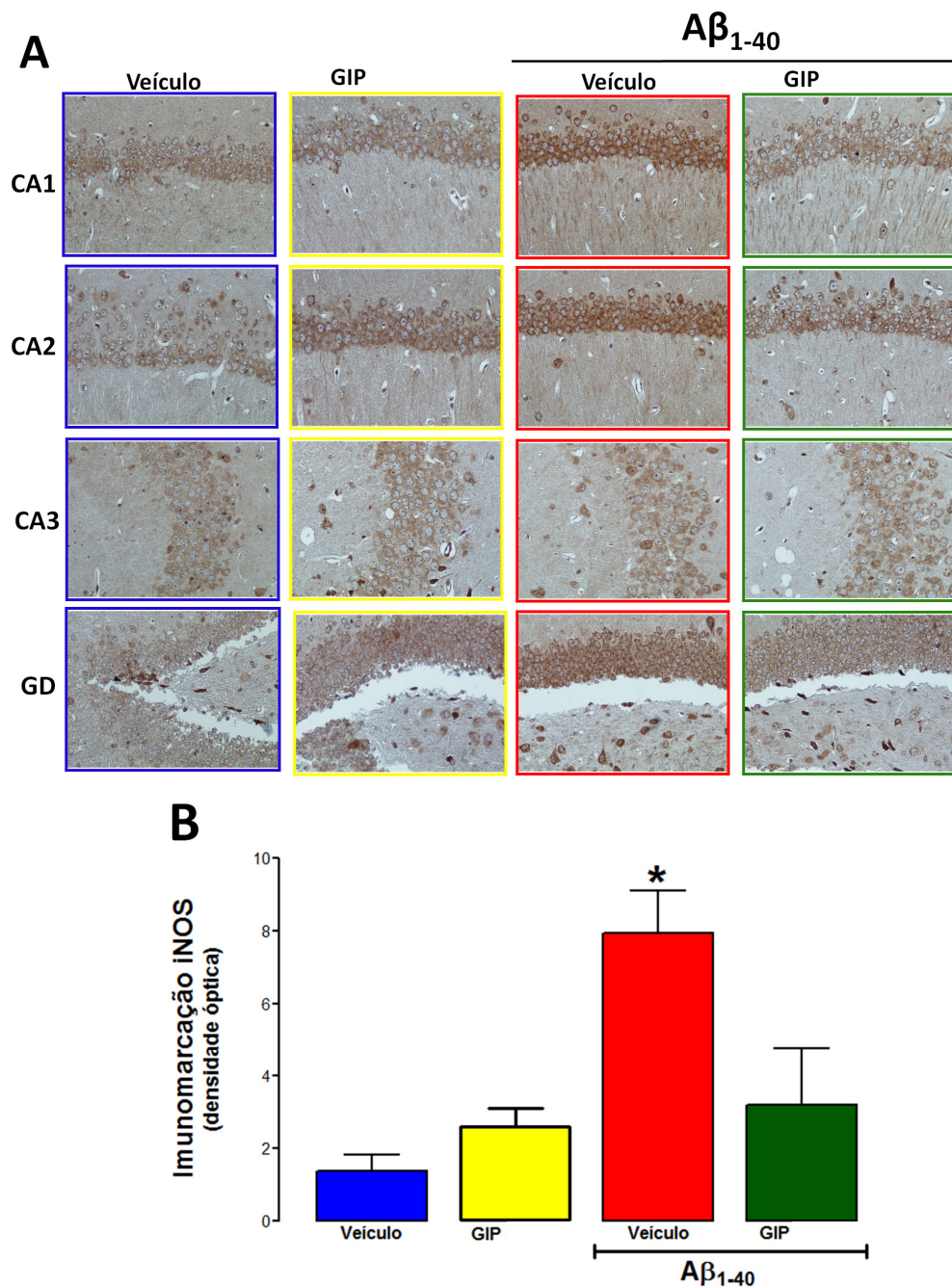


Figura 4. A administração *i.c.v.* do GIP previne o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), 7 dias após o tratamento *i.c.v.* com o peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos. Os animais foram pré-tratados com GIP (GIP_{1-42} , 0,5 nmol/camundongo) ou veículo (PBS,) por via intracerebroventrícula (*i.c.v.*), 15 minutos antes da administração *i.c.v.* do peptídeo $A\beta_{1-40}$. (A) Imagens representativas da imunodeteção da iNOS nas regiões CA1, CA2, CA3 e GD do hipocampo (aumento de 40 x). (B) Medida da densidade óptica da imunorreatividade média da iNOS nas regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado do hipocampo. Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. ($n=3-5$ /grupo) * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (veículo/PBS).

3.3. Efeito do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP) no aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) induzido pela $A\beta_{1-40}$.

4. Com a finalidade de avaliar o possível efeito do peptídeo $A\beta_{1-40}$ na modulação da expressão da nNOS, e investigar o efeito do pré-tratamento com GIP (GIP₁₋₄₂, 0,5 nmol/camundongo, i.c.v.), avaliamos através da técnica de imunistoquímica e da RT-PCR quantitativa, o nível de expressão protéica e de expressão gênica da enzima nNOS, respectivamente, 8 dias após o tratamento com o peptídeo $A\beta_{1-40}$ (Figura 5). A Figura 5 demonstra que o tratamento com o peptídeo $A\beta_{1-40}$ induziu aumento significativo na expressão da nNOS, e que o pré-tratamento com o GIP (GIP 0,5 mol/camundongo, i.c.v.) foi capaz de prevenir significativamente este efeito (Figura 5B e C). De maneira semelhante, a indução da expressão da iNOS, o aumento da expressão da nNOS, e o conseqüente aumento dos níveis de NO, parecem contribuir de forma importante na sinaptotoxicidade induzida pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$, e que o efeito protetor exercido pelo GIP parece ser dependente da inibição da expressão das duas isoformas da enzima (iNOS e nNOS) no hipocampo.

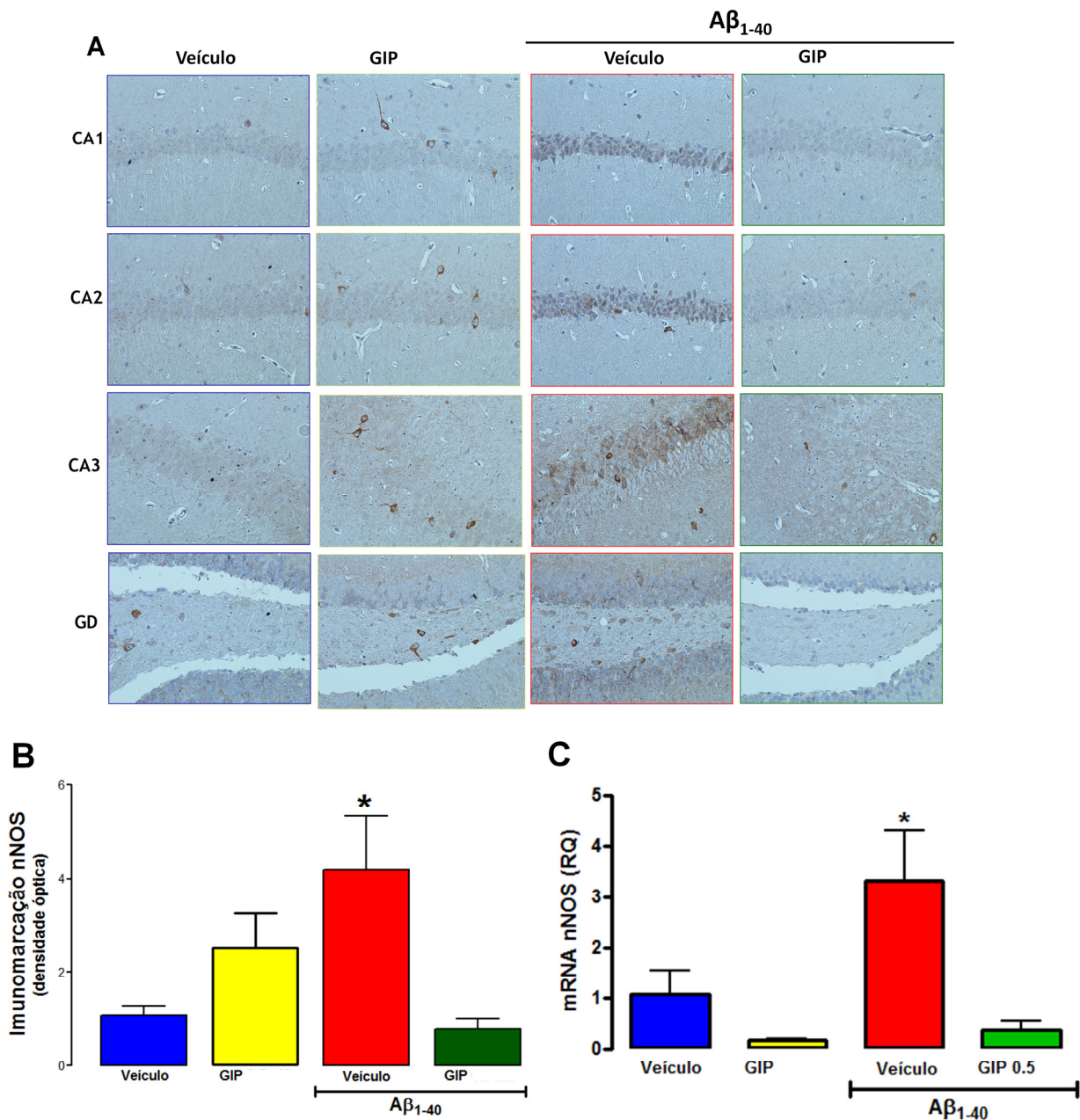


Figura 5. A administração i.c.v. do GIP previne o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) 8 dias após o tratamento i.c.v. com o peptídeo A β ₁₋₄₀, em camundongos. Os animais foram pré-tratados com GIP (GIP₁₋₄₂, 0,5 nmol/camundongo) ou veículo (PBS) por via intracerebroventricular (i.c.v.), 15 minutos antes da administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀. (A) Imagens representativas da imunodeteccção da nNOS nas regiões CA1, CA2, CA3 e GD do hipocampo (aumento de 40 x). (B) Medida da densidade óptica da imunorreatividade média da iNOS nas regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado do hipocampo. (C) Quantificação relativa dos níveis de mRNA da enzima nNOS através da RT-PCR quantitativo. Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. (n=3-5/grupo) *P \leq 0,05 comparado ao grupo controle (veículo/PBS).

4.3. Efeito do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP) na citotoxicidade induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀, em cultura primária de neurônios cerebelares

Como mostra a Figura 6A, o tratamento com diferentes concentrações de A β ₁₋₄₀ agregada não alterou o número de neurônios viáveis, sugerindo que o peptídeo agregado seja inativado por componentes presentes no meio de cultura (por exemplo, o soro fetal). Entretanto, o tratamento das células com o peptídeo A β ₁₋₄₀ solúvel foi capaz de induzir citotoxicidade na concentração de 10 μ M (Figura 6A).

Na tentativa de identificar algum efeito neuroprotetor do GIP sobre a citotoxicidade induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ solúvel em cultura de neurônios cerebelares, foram determinadas a viabilidade celular e a formação de espécies reativas de oxigênio, através das técnicas de IP e DCFA, respectivamente. De maneira interessante, o pré-tratamento dos neurônios com GIP (10 nM) foi capaz de prevenir o aumento da morte celular (Figura 6B) e a formação de espécies reativas de oxigênio (Figura 6C), induzidos pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ solúvel.

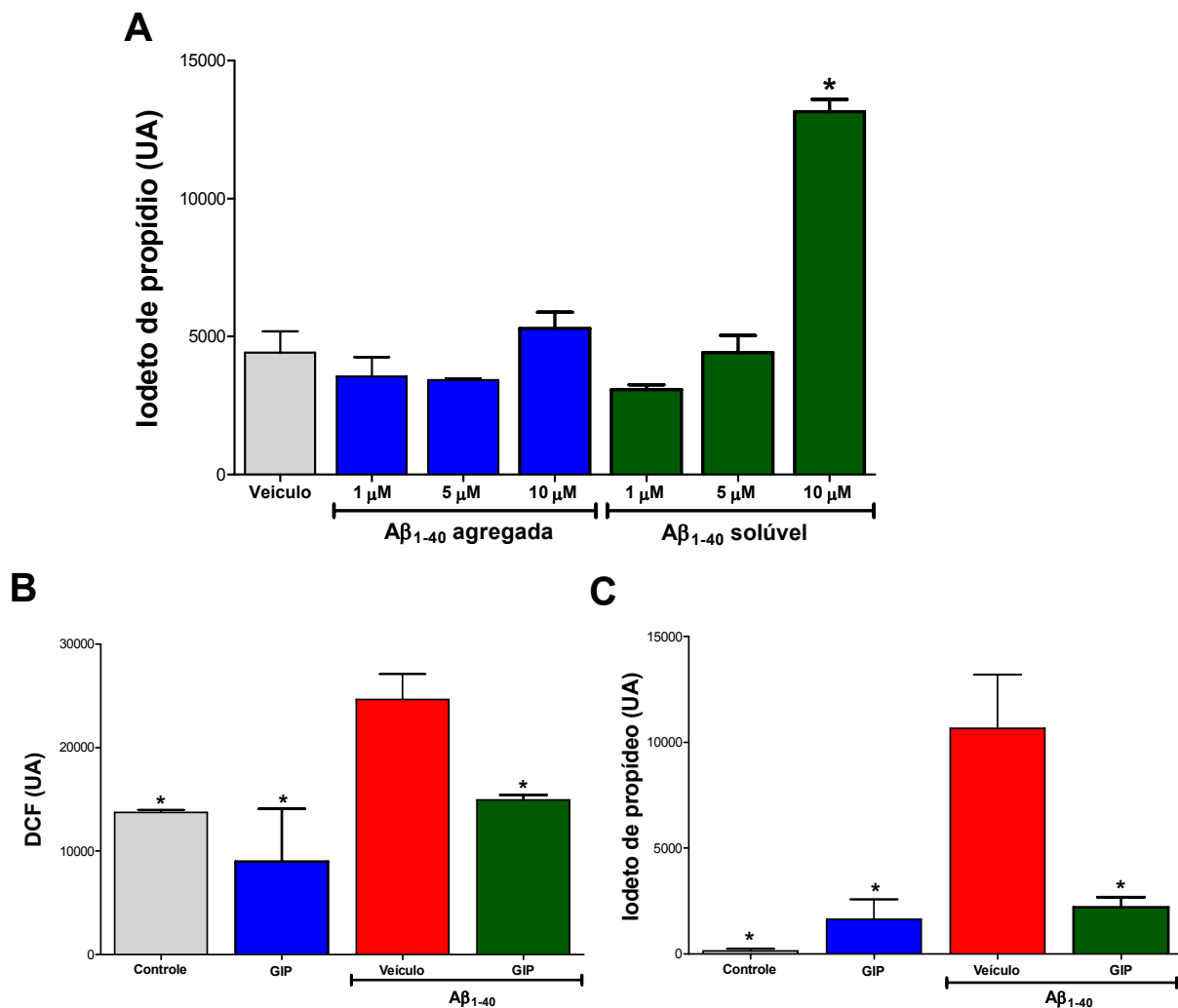


Figura 6 - Avaliação da morte celular e da formação de espécies reativas de oxigênio em cultura primária de neurônios granulares do cerebelo. Neurônios cerebelares obtidos de ratos P7 foram cultivados e tratados durante 24h com GIP (10 nM) e/ou Aβ₁₋₄₀ (10 μM). A morte celular foi avaliada pelo método do iodeto de propídio e a formação de espécies reativas de oxigênio pelo método do 2,7 dicloro-fluoresceína. Os valores representam a média ± erro padrão de um experimento quintuplicado. Em (A) *P < 0,05 comparado ao grupo controle. Em (B) e (C) *P ≤ 0,05 comparado ao grupo veículo/ Aβ₁₋₄₀.

5. Discussão

A DA é caracterizada pela deposição do peptídeo β -amilóide ($A\beta$), associada à ativação do processo inflamatório e dano cognitivo nos indivíduos acometidos. O acúmulo e a agregação desse pequeno peptídeo hidrofóbico iniciam uma lenta mas potencialmente mortal cascata amiloidogênica que induz alterações sinápticas, ativação da microglia e astrócitos, modificação da proteína tau solúvel em oligômeros formando filamentos insolúveis, e perda neuronal progressiva com disfunções sinápticas e prejuízo cognitivo (Haass & Selkoe, 2007). As propriedades neurotóxicas do peptídeo $A\beta$ de 40 e 42 aminoácidos permitiu aos pesquisadores que ele fosse usado como um modelo in vivo dos mecanismos patofisiológicos do desenvolvimento da DA, provendo uma alternativa aos modelos baseados em animais transgênicos. (McDonald & Overmeyer, 1998).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo uma série de estudos com o objetivo de caracterizar alguns dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no modelo experimental da DA induzido pela injeção i.c.v. da proteína $A\beta$. Como demonstrado previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Medeiros, Prediger et al., 2007; Prediger, Franco et al., 2007; Prediger, Medeiros et al., 2008; Passos, Figueiredo et al., 2009), a administração i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/camundongo) resulta no declínio da função cognitiva em camundongos, associado com prejuízos sinápticos caracterizados pela redução significativa dos níveis de sinaptofisina no hipocampo, em comparação com os animais tratados com veículo (PBS) ou o peptídeo reverso $A\beta_{40-1}$ (Medeiros, Prediger et al., 2007; Prediger, Franco et al., 2007; Passos, Figueiredo et al., 2009).

Os resultados preliminares demonstrados neste capítulo reforçam a hipótese dos possíveis efeitos neuroprotetores do GIP e GIPR proposta em estudos recentes

(Gault e Holscher, 2008; Gault e Holscher, 2008; Buhren, Gasis et al., 2009) e nos capítulos anteriores dessa Tese. Inicialmente foi verificado o efeito da administração i.c.v. aguda de duas doses distintas do peptídeo GIP (GIP₁₋₄₂, 0,5 ou 2,0 nmol/camundongo), no aprendizado e memória de camundongos. Conforme demonstrado na Figura 1, o tratamento i.c.v. com GIP, 15 min antes da sessão de treino, não apresentou nenhum efeito agudo importante sobre o aprendizado e memória dos camundongos, e também não foi possível observar diferença significativa entre os animais que receberam as diferentes doses do peptídeo.

O tratamento i.c.v. com o fragmento A β ₁₋₄₀, mas não com o veículo, foi capaz de promover prejuízos no aprendizado e na memória espacial de camundongos. Entretanto, de maneira interessante, o pré-tratamento com 0,5 nmol/camundongo do peptídeo GIP₁₋₄₂ (i.c.v.), foi também capaz de prevenir os prejuízos cognitivos induzidos pelo peptídeo A β ₁₋₄₀, como indicado pela redução nas latências para encontrar a plataforma durante as sessões de treino e pelo aumento do tempo gasto no quadrante correto durante a sessão de teste do labirinto aquático, respectivamente (Figura 2).

Nossos dados indicam também que o dano cognitivo é acompanhado pela perda da viabilidade sináptica, uma vez que também é observada redução nos níveis de uma das proteínas formadoras de vesículas pré-sinápticas, denominada sinaptofisina, nos animais tratados com A β ₁₋₄₀ (Medeiros, Prediger et al., 2007; Prediger, Franco et al., 2007; Prediger, Medeiros et al., 2008; Passos, Figueiredo et al., 2009). O pré-tratamento com o peptídeo GIP₁₋₄₂, na dose de 0,5 nmol/camundongo, 15 min antes da injeção do peptídeo A β ₁₋₄₀ (ambos i.c.v) foi capaz de prevenir a redução da expressão da sinaptofisina induzida pelo A β ₁₋₄₀.

Estímulos de diferenciação ou proliferação celular, tratamento com fatores de crescimento neuronal, estímulos nociceptivos, entre outros, alteram a expressão da nNOS e iNOS no SNC (Blottner, Grozdanovic et al., 1995; Whittle, Laszlo et al., 1995; Krukoff e Khalili, 1997; Zhu e Herbert, 1997; Rodella, Rezzani et al., 1998). Alguns estudos associam a toxicidade do peptídeo A β ₁₋₄₀ com o aumento na expressão da nNOS, aumento na síntese de óxido nítrico (NO), formação de peroxinitrito e consequente nitrosilação de proteínas (Hartlage-Rubsamen, Apelt et al., 2001).

Conforme demonstrado previamente, o pré-tratamento com um agente inibidor preferencial da enzima óxido nítrico induzível (iNOS), a aminoguanidina (AG, 100 mg/kg, i.p., 1 x ao dia) é capaz de prevenir a indução da expressão da iNOS, e a redução dos níveis de sinaptofisina induzido pela A β ₁₋₄₀ no hipocampo de camundongos (Medeiros, Prediger et al., 2007). É importante ressaltar que em condições basais somente pequenas quantidades do mRNA para a iNOS podem ser detectados nessa estrutura, e o tratamento i.c.v. com A β ₁₋₄₀ promove um rápido aumento nos níveis do mRNA desta enzima, sendo que um aumento marcante ocorre após 3 h e permanecendo elevado por até 7 dias após o tratamento com A β ₁₋₄₀ (Medeiros, Prediger et al., 2007). Sendo assim, os efeitos benéficos do pré-tratamento com GIP₁₋₄₂ sobre a prevenção do declínio da função cognitiva e dos prejuízos sinápticos observados em camundongos, parecem estar associados com a capacidade do GIP em reduzir o aumento dos níveis das enzimas produtoras de óxido nítrico, iNOS e nNOS, 7 dias após a administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀

Além disso, demonstramos previamente que o pré-tratamento com o anticorpo específico contra o TNF- α (AbTNF- α , 10 ng/camundongo, i.c.v.), foi capaz de prevenir a redução dos níveis de sinaptofisina induzido pela A β ₁₋₄₀ no hipocampo

de camundongos (Medeiros, Prediger et al., 2007). Um aspecto muito importante observado no presente estudo, foi o de que os efeitos benéficos do pré-tratamento com o peptídeo GIP₁₋₄₂ sobre as funções cognitivas e a viabilidade sináptica, não parecem estar relacionados com os mecanismos anti-inflamatórios associados com a via de sinalização do TNF- α . Visto que o tratamento com o GIP₁₋₄₂ não foi capaz de prevenir o aumento dos níveis da citocina inflamatória TNF- α induzido pela injeção i.c.v. de A β ₁₋₄₀.

Em conjunto, estes dados sugerem que o peptídeo GIP₁₋₄₂ é capaz de prevenir a indução da expressão das enzimas produtoras de óxido nítrico, iNOS e nNOS, e reverter os prejuízos cognitivos e sinápticos, induzidos pela administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀.

3. Discussão Geral

Várias evidências apontam para a presença de GIP e GIPR em diferentes estruturas do SNC de ratos adultos (Usdin, Mezey et al., 1993; Nyberg, Anderson et al., 2005; Nyberg, Jacobsson et al., 2007). Quantidades elevadas do mRNA do GIP na região do GD do hipocampo de roedores foram associadas com neuroplasticidade e indução da neurogênese (Nyberg, Anderson et al., 2005). De maneira importante, estudos recentes sugerem que o GIP possui um efeito protetor nas disfunções sinápticas, além de modular positivamente a LTP em fatias de hipocampo (Gault e Holscher, 2008; Gault e Holscher, 2008). Entretanto, não existem relatos na literatura associando o efeito do GIP ou mesmo a variação da expressão do GIPR com os mecanismos fisiopatológicos da ELTM-EH, a qual é caracterizada pela ocorrência de neurodegeneração, aumento dos processos oxidativos, neurogênese e alterações sinápticas.

O presente estudo demonstrou que a expressão do GIPR no hipocampo de animais submetidos ao EME, induzido pela pilocarpina, é significativamente maior que os níveis basais de expressão desse receptor nesta mesma estrutura. Este aumento ocorre em todas as sub-regiões CA1, CA2, CA3 e GD do hipocampo e no córtex parietal (dados não mostrados), e as mudanças observadas variam de acordo com o tempo de evolução do processo de epileptogênese. Existe uma distribuição temporal na expressão do GIPR nas diferentes regiões do hipocampo avaliadas, com um aumento da síntese dessa proteína na fase ictal, ou seja, na primeira hora do processo de epileptogênese, seguida de tendência à diminuição na fase tóxica (12 h após EME), aumento no período silente (5 dias após EME) e diminuição no período crônico (50 dias após EME).

A fase tóxica do modelo da pilocarpina é caracterizada por intensa neurodegeneração da camada de células granulares do hipocampo (Cavalheiro, Leite et al., 1991). Este estudo demonstrou que grande parte (ou totalidade) das células fortemente marcadas para o GIPR parecem não apresentar marcação para Fluoro-Jade (marcador de neurodegeneração), sugerindo que a indução da expressão do GIPR possa estar associada com mecanismos neuroprotetores. A diminuição da expressão do GIPR na fase crônica do modelo pode estar associada, ao menos parcialmente, pela menor densidade de neurônios nas camadas granulares do hipocampo. Eventualmente, uma correção para o número de células/campo evidenciaria que a marcação relativa por neurônios poderia permanecer aumentada.

Como descrito anteriormente, estudos recentes demonstraram que as crises epiléticas aumentam a neurogênese no hipocampo de ratos adultos (Varodayan, Zhu et al., 2009; Yang, Liu et al., 2009). Entretanto, as crises prolongadas resultam em neurogênese aberrante no hipocampo o que, na maioria das vezes, leva a um circuito excitatório recorrente que contribui para a epileptogênese (Yang, Liu et al., 2009). Walter e colaboradores (2007) demonstraram que as crises induzidas pela pilocarpina causam modificações, dependentes do tempo, na formação de progenitores neuronais no GD do hipocampo de ratos adultos. Sendo que a sensibilidade das células granulares recém formadas à excitabilidade poderia contribuir para a hiperexcitabilidade durante o período silente do modelo da pilocarpina (Walter, Murphy et al., 2007). Desta forma, se o aumento da expressão do GIP e do seu receptor está associado com a indução da neurogênese (Nyberg, Anderson et al., 2005), e que este fenômeno pode estar associado com os mecanismos de hiperexcitabilidade (Walter, Murphy et al., 2007), a indução da

expressão do GIPR no modelo da pilocarpina pode contribuir para a fisiopatologia da epileptogênese. Sugerindo a realização de estudos em modelos experimentais de hiperexcitabilidade utilizando antagonistas seletivos do GIPR. Entretanto, apesar destas evidências, o sinal específico que induz o aumento na expressão do GIPR no modelo experimental da pilocarpina ainda precisa ser melhor esclarecido.

Um aspecto interessante observado no presente estudo foi a demonstração da expressão do GIPR em hipocampos humanos com esclerose, com padrão de imunomarcacão semelhante ao encontrado nas amostras dos animais que receberam pilocarpina. Ou seja, as secções histológicas dos hipocampos humanos apresentaram uma marcação imunoistoquímica para GIPR predominantemente citoplasmática nas camadas CA1, CA2, CA3 e GD do hipocampo. Da mesma forma, as células positivas para GIPR não apresentaram marcação histoquímica para Fluoro-Jade, corroborando com os achados obtidos nas amostras dos animais que receberam injeccão sistêmica de pilocarpina.

O aumento da expectativa de vida da população é um dos maiores triunfos da humanidade, tendo ocorrido inicialmente em países desenvolvidos e, mais recentemente e de forma mais acentuada, em países em desenvolvimento. Segundo o *National Institute on Aging* (NIA) dos Estados Unidos da América, em 2006 havia quase 500 milhões de pessoas no mundo com 65 anos de idade ou mais, e estima-se que até 2030 este número chegue a um bilhão de pessoas, representando um em cada oito habitantes (NIA, 2007). No Brasil, o número de indivíduos idosos (65 anos de idade ou mais) passou de cerca de cinco milhões em 1980 para aproximadamente 10 milhões em 2000, sendo que em 2030 este número poderá atingir quase 30 milhões (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 2000; 2008). Em países como a França, por exemplo, foi necessário mais de um século

para que a população idosa dobrasse de tamanho (NIA, 2007). Estes números são o reflexo de avanços médicos, sociais e econômicos, que resultaram em um aumento expressivo da expectativa de vida da população. Embora esses dados demográficos reflitam um claro avanço na qualidade de vida de parte da população, eles também alertam para a possibilidade de que, num futuro próximo, cresça significativamente o número de pessoas acometidas pelas doenças associadas ao envelhecimento, destacando-se a doença de Parkinson (DP) e a doença de Alzheimer (DA) (Sherrington, Rogaev et al., 1995).

O melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos das doenças neurodegenerativas, dos seus sintomas e o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de modelos animais representativos dessas patologias. A DP é uma das várias doenças humanas que parece não ocorrer espontaneamente em outros animais. Entretanto, conforme detalhado anteriormente, as características dessa doença podem ser mimetizadas, em maior ou menor escala, em animais roedores, através da administração de diferentes compostos (Gerlach e Riederer, 1996; Dawson, 2000; Shimohama, Sawada et al., 2003).

A maioria dos estudos utilizando modelos animais para DP tem focado nos efeitos sobre a via dopaminérgica nigrostriatal e na indução de prejuízos motores nos animais. Entretanto, como a DP está associada com alterações em uma variedade de funções, incluindo alterações afetivas, cognitivas (Santamaria, Tolosa et al., 1986; Owen, Sahakian et al., 1995; Dubois e Pillon, 1997; Goldman, Baty et al., 1998; Tsang, Pomakian et al., 2007; Tadaiesky, Dombrowski et al., 2008) e olfatórias (Doty, Deems et al., 1988; Doty, Bromley et al., 1995; Hawkes, Shephard

et al., 1998; Hawkes, Shephard et al., 1999), torna-se importante avaliar a ocorrência destas alterações nesses modelos animais.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem investigado a existência de prejuízos olfatórios em roedores tratados com doses agudas de MPTP, através de testes de discriminação olfatória (Soffie e Lamberty, 1987; Prediger, Batista et al., 2005; Prediger, Fernandes et al., 2005; Prediger, Batista et al., 2006; Prediger, De-Mello et al., 2006; Prediger, Aguiar et al., 2009). A Figura 1 do Capítulo 2 desta tese ilustra de forma resumida o desempenho dos ratos nos testes de discriminação olfatória, cognitivos e motores, em diferentes períodos (1-21 dias) após a administração intranasal (i.n.) de MPTP. Mimetizando a condição clínica dos pacientes portadores de DP, os animais exibiram um prejuízo precoce na capacidade de discriminação olfatória, durante a primeira semana após o tratamento com MPTP. Os testes de discriminação olfatória estão baseados nas observações comportamentais dos animais adultos machos, os quais preferem permanecer em ambientes impregnados com seu próprio odor, quando comparado com ambientes inodoros ou com o odor de outros animais (Carr, Yee et al., 1976). Neste estudo, a administração aguda de MPTP (1 mg/narina) induziu um prejuízo significativo na discriminação olfatória dos animais, após 1-7 dias de tratamento, nos quais passaram a explorar os dois compartimentos (familiar e não-familiar) de maneira semelhante. A incapacidade dos animais em discriminar ambos os compartimentos não foi associada com prejuízos motores, visto que não foram observadas alterações comportamentais no teste do campo aberto e na caixa de atividade, na primeira semana após o tratamento com MPTP.

É importante ressaltar que, 21 dias após a administração i.n. de MPTP, tanto a função olfatória dos animais como os níveis de dopamina e a expressão de TH no

bulbo olfatório (BO) retornaram aos níveis basais, possivelmente em decorrência do aumento da neurogênese, ou seja, a formação de novos neurônios dopaminérgicos no BO. De maneira interessante, no presente estudo demonstramos que 7 dias após a administração i.n. de MPTP em ratos, ocorre um aumento significativo no número de células em proliferação na camada glomerular e na expressão do GIPR na camada de células granulares do BO. Estes achados reforçam a hipótese de que a neurogênese no BO, induzida pela administração de MPTP (Yamada, Onodera et al., 2004; Hayakawa, Hayashita-Kinoh et al., 2007), é responsável pela reversão do prejuízo olfatório nesses animais. Nossos resultados corroboram com um estudo anterior, o qual relata que o aumento da expressão do GIP e do seu receptor está associado com aumento da neurogênese (Nyberg, Anderson et al., 2005), e confirmam resultados anteriores da literatura sugerindo que a administração de MPTP induz um aumento no número de células progenitoras na região da camada glomerular do BO através de fenômenos de proliferação e migração celular (Yamada, Onodera et al., 2004; Hayakawa, Hayashita-Kinoh et al., 2007)

Por outro lado, diferentes linhas de evidência sugerem o envolvimento da dopamina em processos cognitivos e olfatórios, tanto em humanos quanto em roedores. Em ratos, estruturas cerebrais relacionadas aos processos de aprendizado e memória, como o hipocampo, o córtex pré-frontal e o estriado, são inervadas por neurônios dopaminérgicos (Baulac, Verney et al., 1986; Seamans, Floresco et al., 1998). A disfunção dopaminérgica nestas áreas está relacionada ao prejuízo seletivo das memórias espacial, operacional e de procedimento (ou hábitos), respectivamente (Gasbarri, Sulli et al., 1996; Da Cunha, Gevaerd et al., 2001; Miyoshi, Wietzikoski et al., 2002). Além disso, o BO de mamíferos contém um grande número de interneurônios dopaminérgicos que são muito importantes no

processamento de odores (Halasz, Hokfelt et al., 1977; Halasz, Ljungdahl et al., 1977; Halasz e Shepherd, 1983; Doty e Risser, 1989; Davila, Blakemore et al., 2003).

Em roedores, estudos prévios têm demonstrado um prejuízo nas funções olfatórias em consequência de tratamentos que reduzem a neurotransmissão dopaminérgica, como MPTP (Dluzen e Kreutzberg, 1993) e reserpina (Prediger, Batista et al., 2004). A DA parece ser também importante para os processos de aprendizado e memória olfatória, uma vez que seus níveis cerebrais aumentam durante o aprendizado olfatório (Kendrick, Keverne et al., 1988; Coopersmith, Weihmuller et al., 1991; Keverne, Levy et al., 1993), enquanto que a depleção de dopamina ou a administração de antagonistas dopaminérgicos prejudicam a memória olfatória (Weldon, Travis et al., 1991; Dluzen e Kreutzberg, 1993; Prediger, Batista et al., 2004). Sendo assim, a diminuição da expressão da enzima TH e dos níveis de dopamina podem ser responsáveis pelos prejuízos olfatórios induzidos pelo MPTP. O aumento da expressão do GIPR pode ser um mecanismo compensatório, visto que alguns trabalhos descrevem a participação direta do GIP na liberação de neurotransmissores relacionados com fenômenos cognitivos (Gault e Holscher, 2008; Gault e Holscher, 2008).

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por desordem neurodegenerativa intimamente associada ao processo de envelhecimento. Os sintomas da DA parecem ser resultantes do acúmulo de placas compostas pelo peptídeo A β no parênquima extracelular do cérebro, relacionadas com alterações na estrutura conformacional na proteína precursora do peptídeo A β (Glennner e Wong, 1984), associado à formação de emaranhados neurofibrilares, como resultado da hiperfosforilação da proteína Tau associada aos microtúbulos no interior dos

neurônios (Grundke-Iqbal, Iqbal et al., 1986). Além disso, o acúmulo desses marcadores é normalmente acompanhado por disfunção sináptica e morte neuronal, principalmente em áreas corticais e do hipocampo, resultando, conseqüentemente, na perda progressiva das funções cognitivas (Selkoe, 2000).

Atualmente, as ferramentas utilizadas por diferentes grupos de pesquisa para estudar a DA em animais de laboratório (como roedores) consistem na utilização de metodologias capazes de induzir o acúmulo da proteína A β no cérebro dos animais. Prejuízos sensoriais e cognitivos, semelhantes aos observados na DA, também têm sido documentados tanto em animais com idade igual ou superior a 14 meses (Wallace, Krauter et al., 1980; Wallace, Krauter et al., 1980; Hazzard, 1991; Prediger, Batista et al., 2005), como em camundongos transgênicos que apresentam expressão aumentada da proteína precursora de amilóide (APP), associada com deficiências nas vias de degradação da mesma (Hsiao, Chapman et al., 1996; Westerman, Cooper-Blacketer et al., 2002). Estudos anteriores do nosso grupo (Medeiros, Prediger et al., 2007; Prediger, Franco et al., 2007; Prediger, Medeiros et al., 2008; Passos, Figueiredo et al., 2009) demonstraram que uma única administração i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀, um peptídeo análogo aos encontrados nas placas senis dos pacientes com a doença de Alzheimer, resulta em prejuízos importantes nas funções de aprendizado e de memória.

No SNC, normalmente a iNOS está ausente em situações fisiológicas. Todavia, após condições de estresse, dano cerebral, ou na ocorrência de processos neuroinflamatórios, observa-se um aumento na sua expressão e, conseqüentemente, maior produção de NO, principalmente nos astrócitos e neurônios (Boje e Arora, 1992; Koprowski, Zheng et al., 1993; Merrill, van Echten et al., 1993; Schmidt e Walter, 1994). Por sua vez, o aumento na produção de NO

induz dano e morte neuronal (Adamson, Wildemann et al., 1996). O mecanismo predominante pelo qual o NO gera a toxicidade neuronal ocorre em função da reação com o ânion superóxido e a conseqüente produção da substância citotóxica peroxinitrito (Beckman, Beckman et al., 1990). Durante condições fisiológicas, as moléculas reativas do oxigênio são rapidamente eliminadas por enzimas antioxidantes, dentre elas a glutathiona peroxidase (Thannickal, Day et al., 2000; Thannickal e Fanburg, 2000). Contudo, durante condições patológicas, a produção excessiva e o conseqüente acúmulo de espécies reativas, devido à limitação da atividade enzimática, resultam em disfunção celular (Fiers, Beyaert et al., 1999).

A expressão da iNOS e o aumento na produção de NO têm sido amplamente implicados na DA. Estudos relatam um aumento na expressão da iNOS e na produção de peroxinitrito nos cérebros de indivíduos acometidos por essa patologia (Smith, Richey Harris et al., 1997; Hensley, Maidt et al., 1998; Tohgi, Abe et al., 1999; Luth, Munch et al., 2002; Fernandez-Vizarra, Fernandez et al., 2004), e que a iNOS pode mediar parte dos efeitos deletérios sobre a cognição induzidos pela A β ₁₋₄₀ em roedores (Tran, Yamada et al., 2001; Wang, Walsh et al., 2004).

Os resultados do presente estudo corroboram com trabalhos anteriores do nosso grupo (Medeiros, Prediger et al., 2007; Prediger, Franco et al., 2007; Prediger, Medeiros et al., 2008; Passos, Figueiredo et al., 2009) que demonstraram que o dano cognitivo é acompanhado pela perda da viabilidade sináptica, uma vez que também é observada redução nos níveis de uma das proteínas que compõem as vesículas pré-sinápticas, denominada sinaptofisina, nos cérebros dos animais tratados com A β ₁₋₄₀. Adicionalmente, foi demonstrado que o pré-tratamento com GIP por via i.c.v. é capaz de prevenir a redução da expressão da sinaptofisina, nos animais que receberam a injeção do peptídeo A β ₁₋₄₀. Tais efeitos parecem estar

associados às propriedades do GIP de reduzir o aumento dos níveis das enzimas produtoras de NO, iNOS e nNOS, induzido pela administração i.c.v. do fragmento A β ₁₋₄₀, 7 dias após o tratamento. Nossos resultados corroboram com estudos recentes que demonstram os efeitos benéficos do GIP na indução da LTP e na proteção contra a sinaptotoxicidade induzida pela forma agregada do peptídeo A β ₁₋₄₂ (Gault e Holscher, 2008; Gault e Holscher, 2008).

Outro aspecto muito importante observado no presente estudo, está relacionado aos resultados sugestivos de que os efeitos benéficos do GIP sobre as funções cognitivas e a viabilidade sináptica, não parecem estar associados com o aumento do TNF- α induzido pela injeção i.c.v. de A β ₁₋₄₀, uma vez que esta resposta não foi alterada pelo tratamento com o GIP.

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, a expressão do GIPR tanto no modelo experimental de doença de Parkinson e ELTM-EH como em uma amostra de hipocampo com esclerose proveniente de paciente com ELTM-EH, além da participação do GIP na modulação e/ou prevenção do dano sináptico e cognitivo induzidos pelo peptídeo A β ₁₋₄₀. Estudos adicionais utilizando diferentes modelos animais e em humanos, visando um melhor entendimento da participação do GIP e GIPR no desenvolvimento de diferentes doenças neurológicas, podem estabelecer alvos potenciais para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para estas doenças neurológicas em que o processo neurodegenerativo está presente.

4. Conclusões

A expressão do GIPR está aumentada em no hipocampo e no bulbo olfatório de roedores submetidos a modelos experimentais de epilepsia e doença de Parkinson, respectivamente.

Existe uma modulação do GIPR positiva na expressão do GIPR em diferentes subregiões do hipocampo e neocórtex de animais submetidos ao modelo experimental de ELTM-EH induzido pela administração sistêmica de pilocarpina.

Foi possível caracterizar a presença do GIPR, por meio da técnica de imunohistoquímica, no hipocampo e neocórtex humano retirados de um paciente portador de ELTM-EH após o tratamento cirúrgico.

O aumento da expressão do GIPR está negativamente associado com a degeneração neuronal, no hipocampo e neocórtex de animais submetidos ao modelo experimental de ELTM-EH induzido pela administração sistêmica de pilocarpina.

Não foi possível detectar degeneração neuronal, através da técnica de Fluoro-Jade, no hipocampo e neocórtex de um paciente portador de ELTM-EH tratado cirurgicamente.

A administração intranasal de MPTP induz morte celular, possivelmente associada com fenômeno apoptóticos, além de diminuir a expressão da enzima tirosina-hidroxilase em diferentes regiões subcorticais de ratos.

A administração intranasal de MPTP um aumento na expressão do GIPR na camada de células granulares do bulbo olfatório de ratos, porém não é capaz de induzir aumento na expressão deste receptor na substancia nigra destes mesmos animais.

O pré-tratamento com o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP_{1-42}) por via intracerebroventricular (i.c.v.) é capaz de reverter os prejuízos cognitivos e sinápticos induzidos pelo peptídeo $\text{A}\beta_{1-40}$ em camundongos.

O agonista do GIPR (GIP_{1-42}) previne o aumento na expressão das enzimas iNOS e nNOS, mas não da citocina inflamatória $\text{TNF-}\alpha$, induzido pela administração i.c.v. do peptídeo $\text{A}\beta_{1-40}$.

5. Referências

Abankwa D, Kury P, Muller HW (2002). "Dynamic changes in gene expression profiles following axotomy of projection fibres in the Mammalian CNS." Mol Cell Neurosci 21(3): 421-35.

Adamson DC, Wildemann B, Sasaki M, Glass JD, McArthur JC, Christov VI, Dawson TM, Dawson VL (1996). "Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41." Science 274(5294): 1917-21.

Apelt J, Mehlhorn G, Schliebs R (1999). "Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain." J Neurosci Res 57(5): 693-705.

Araki T, Mikami T, Tanji H, Matsubara M, Imai Y, Mizugaki M, Itoyama Y (2001). "Biochemical and immunohistological changes in the brain of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mouse." Eur J Pharm Sci 12(3): 231-8.

Baggio LL, Drucker DJ (2007). "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." Gastroenterology 132(6): 2131-57.

Baker H, Kawano T, Margolis FL, Joh TH (1983). "Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat." J Neurosci 3(1): 69-78.

Baker H, Liu N, Chun HS, Saino S, Berlin R, Volpe B, Son JH (2001) "Phenotypic differentiation during migration of dopaminergic progenitor cells to the olfactory bulb". J Neurosci 21, 8505-8513.

Barnett EM, Perlman S (1993). "The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM." Virology 194(1): 185-91.

Barrio JR, Huang SC, Phelps ME (1997). "Biological imaging and the molecular basis of dopaminergic diseases." Biochem Pharmacol 54(3): 341-8.

Baulac M, Verney C, Berger B (1986). "[Dopaminergic innervation of the parahippocampal and hippocampal regions in the rat]." Rev Neurol (Paris) 142(12): 895-905.

Beck B (1989). "Gastric inhibitory polypeptide: a gut hormone with anabolic functions." J Mol Endocrinol 2(3): 169-74.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990). "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide." Proc Natl Acad Sci U S A 87(4): 1620-4.

Ben-Ari Y (1985). "Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy." Neuroscience 14(2): 375-403.

Bezard E, Boraud T, Chalon S, Brotchie JM, Guilloteau D and Gross CE (2001). "Pallidal border cells: an anatomical and electrophysiological study in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkey." Neuroscience **103**, 117-123.

Bezard E., Dovero S., Bioulac B. and Gross C. (1997a) Effects of different schedules of MPTP administration on dopaminergic neurodegeneration in mice. Exp Neurol **148**, 288-292.

Bezard E, Imbert C, Deloire X, Bioulac B, Gross CE (1997b). "A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey." Brain Res 766, 107-112.

Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E (2000). "Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease." Prog Neurobiol 62(1): 63-88.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006). "Alzheimer's disease." Lancet 368(9533): 387-403.

Blottner D, Grozdanovic Z, Gossrau R (1995). "Histochemistry of nitric oxide synthase in the nervous system." Histochem J 27(10): 785-811.

Boeck CR, Ganzella M, Lottermann A, Vendite D (2004). "NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice." Epilepsia 45(7): 745-50.

Boje KM, Arora PK (1992). "Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death." Brain Res 587(2): 250-6.

Bonan CD, Walz R, Pereira GS, Worm PV, Battastini AM, Cavalheiro EA, Izquierdo I, Sarkis JJ (2000). "Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res 39(3): 229-38.

Bondi MW, Kaszniak AW (1991). "Implicit and explicit memory in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." J Clin Exp Neuropsychol 13(2): 339-58.

Bosboom JL, Stoffers D, Wolters E (2004). "Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease." J Neural Transm 111(10-11): 1303-15.

Braak H, Braak E (1997). "Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories." Neurobiol Aging 18(4): 351-7.

Brennan PA, Keverne EB (1997). "Neural mechanisms of mammalian olfactory learning." Prog Neurobiol 51(4): 457-81.

Brown JC, Pederson RA, Jorpes E, Mutt V (1969). "Preparation of highly active enterogastrone." Can J Physiol Pharmacol 47, 113-114.

Brown JC (1974). "Candidate hormones of the gut. 3. Gastric inhibitory polypeptide (GIP)." Gastroenterology 67(4): 733-4.

Brown JC, Cleator IG, Dryburgh JR, Pederson RA, Schubert H (1974). "The physiology and pathophysiology of gastric inhibitory polypeptide (GIP) and motilin." Verh Dtsch Ges Inn Med 80: 377-80.

Brown JC, Dryburgh JR, Ross SA, Dupre J (1975). "Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide." Recent Prog Horm Res 31, 487-532.

Buhren BA, Gasis M, Thorens B, Muller HW, Bosse F (2009). "Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and its receptor (GIPR): cellular localization, lesion-affected expression, and impaired regenerative axonal growth." J Neurosci Res 87(8): 1858-70.

Buttini M, Orth M, Bellosta S, Akeefe H, Pitas RE, Wyss-Coray T, Mucke L, Mahley RW (1999). "Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration." J Neurosci 19(12): 4867-80.

Carr WJ, Yee L, Gable D, Marasco E (1976). "Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats." J Comp Physiol Psychol 90(9): 821-8.

Cataland S, Crockett SE, Brown JC, Mazzaferri EL (1974). "Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulation by oral glucose in man." J Clin Endocrinol Metab 39(2): 223-8.

Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L (1991). "Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures." Epilepsia 32(6): 778-82.

Chiueh C. C., Markey S. P., Burns R. S., Johannessen J. N., Jacobowitz D. M. and Kopin I. J. (1984) Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rat, guinea pig, and monkey. Psychopharmacol Bull **20**, 548-553.

Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M (2006). "Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin." Nature 441(7097): 1162-6.

Clark LM, Bosworth HB, Welsh-Bohmer KA, Dawson DV, Siegler IC (2000). "Relation between informant-rated personality and clinician-rated depression in patients with memory disorders." Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol 13(1): 39-47.

Connors BW, Gutnick MJ (1990). "Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons." Trends Neurosci 13(3): 99-104.

Coopersmith R, Weihmuller FB, Kirstein CL, Marshall JF, Leon M (1991). "Extracellular dopamine increases in the neonatal olfactory bulb during odor preference training." Brain Res 564(1): 149-53.

Cotman CW, Berchtold NC (2002). "Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity." Trends Neurosci 25(6): 295-301.

Coulter DA (2001). "Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties." Int Rev Neurobiol 45: 237-52.

Coutinho-Netto J, Abdul-Ghani AS, Collins JF, Bradford HF (1981). "Is glutamate a trigger factor in epileptic hyperactivity?" Epilepsia 22(3): 289-96.

Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MA, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi RN, Canteras NS (2001). "Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia." Behav Brain Res 124(1): 9-18.

Da Cunha C, Angelucci ME, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN (2002). "The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities." Cell Mol Neurobiol 22(3): 227-37.

Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MM, Schroder N, Quevedo J, Benfato MS, Moreira JC, Walz R (2000). "Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats." Neurosci Lett 291(3): 179-82.

Daousi C, Wilding JP, Aditya S, Durham BH, Cleator J, Pinkney JH, Ranganath LR (2009). "Effects of peripheral administration of synthetic human glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) on energy expenditure and subjective appetite sensations in healthy normal weight subjects and obese patients with type 2 diabetes." Clin Endocrinol (Oxf) 71(2): 195-201.

Dauer W, Przedborski S (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron 39(6): 889-909.

Davila NG, Blakemore LJ, Trombley PQ (2003). "Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture." J Neurophysiol 90(1): 395-404.

Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ (1979). "Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues." Psychiatry Res 1(3): 249-54.

Dawson TM (2000). "New animal models for Parkinson's disease." Cell 101(2): 115-8.

Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ (1999). "New waves of research in the epilepsies: crossing into the third millennium." Adv Neurol 79: 3-58.

Dichter MA, Ayala GF (1987). "Cellular mechanisms of epilepsy: a status report." Science 237(4811): 157-64.

Ding KH, Zhong Q, Xie D, Chen HX, Della-Fera MA, Bollag RJ, Bollag WB, Gujral R, Kang B, Sridhar S, Baile C, Curl W, Isales CM (2006). "Effects of glucose-dependent insulinotropic peptide on behavior." Peptides 27(11): 2750-5.

Dluzen DE (1992). "1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) reduces norepinephrine concentrations in the olfactory bulbs of male mice." Brain Res 586(1): 144-7.

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

Dluzen DE, Kefalas G (1996). "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 741, 215-219.

Dluzen DE, Muraoka S, Landgraf R (1998). "Olfactory bulb norepinephrine depletion abolishes vasopressin and oxytocin preservation of social recognition responses in rats." Neurosci Lett 254(3): 161-4.

Doetsch F, Alvarez-Buylla A (1996). "Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain." Proc Natl Acad Sci U S A 93, 14895-14900.

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997). "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain." J Neurosci 17, 5046-5061.

Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999). "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain". Cell 97, 703-716.

Doty RL, Deems DA and Stellar S (1988). "Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration." Neurology 38, 1237-1244.

Doty RL, Ferguson-Segall M, Lucki I, Kreider M (1988). "Effects of intrabulbar injections of 6-hydroxydopamine on ethyl acetate odor detection in castrate and non-castrate male rats." Brain Res 444(1): 95-103.

Doty RL, Risser JM (1989). "Influence of the D-2 dopamine receptor agonist quinpirole on the odor detection performance of rats before and after spiperone administration." Psychopharmacology (Berl) 98(3): 310-5.

Doty RL, Singh A, Tetrud J, Langston JW (1992). "Lack of major olfactory dysfunction in MPTP-induced parkinsonism." Ann Neurol 32(1): 97-100.

Doty RL, Bromley SM, Stern MB (1995). "Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria." Neurodegeneration 4(1): 93-7.

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

Dubois B, Pillon B (1997). "Cognitive deficits in Parkinson's disease." J Neurol 244(1): 2-8.

Dupre J, Ross SA, Watson D, Brown JC (1973). "Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man." J Clin Endocrinol Metab 37(5): 826-8.

Duvoisin R (1991). "Parkinson's disease." Third Edition. Raven Press, New York.

Engel J Jr (1996). "Surgery for seizures." N Engl J Med 334:647-652.

Engel J Jr (2001). "A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology." Epilepsia 42(6): 796-803.

Fallon JH, Moore RY (1978). "Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex." J Comp Neurol 180(3): 533-44.

Fahn S, Elton R (1987). "The Unified Parkinson's Disease Rating Scale". In: Fahn S, Marsden CD, Calne DB, Goldstein M, eds. Recent developments in Parkinson's disease. Florham Park. Vol. 2: 153-63.

Fox NC, Kennedy AM, Harvey RJ, Lantos PL, Roques PK, Collinge J, Hardy J, Hutton M, Stevens JM, Warrington EK, Rossor MN (1997). "Clinicopathological features of familial Alzheimer's disease associated with the M139V mutation in the presenilin 1 gene. Pedigree but not mutation specific age at onset provides evidence for a further genetic factor." Brain 120 (Pt 3): 491-501.

Franco J, Prediger RD, Pandolfo P, Takahashi RN, Farina M and Dafre AL (2007). "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 80, 1906-1914.

Gage FH (2000). "Mammalian neural stem cells." Science 287, 1433-1438.

Gall CM, Hendry SH, Seroogy KB, Jones EG, Haycock JW (1987). "Evidence for coexistence of GABA and dopamine in neurons of the rat olfactory bulb." J Comp Neurol 266(3): 307-18.

Gasbarri A, Sulli A, Innocenzi R, Pacitti C, Brioni JD (1996). "Spatial memory impairment induced by lesion of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat." Neuroscience 74(4): 1037-44.

Gault VA, O'Harte FP, Harriott P, Mooney MH, Green BD, Flatt PR (2003). "Effects of the novel (Pro3)GIP antagonist and exendin(9-39)amide on GIP- and GLP-1-induced cyclic AMP generation, insulin secretion and postprandial insulin release in obese diabetic (ob/ob) mice: evidence that GIP is the major physiological incretin." Diabetologia 46, 222-230.

Gault VA, Irwin N, Green BD, McCluskey JT, Greer B, Bailey CJ, Harriott P, O'Harte F P, Flatt PR (2005). "Chemical ablation of gastric inhibitory polypeptide receptor action by daily (Pro3)GIP administration improves glucose tolerance and ameliorates insulin resistance and abnormalities of islet structure in obesity-related diabetes." Diabetes 54(8): 2436-46.

Gault VA, Holscher C (2008). "GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid." Eur J Pharmacol 587(1-3): 112-7.

Gault VA, Holscher C (2008). "Protease-resistant glucose-dependent insulinotropic polypeptide agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid." J Neurophysiol 99:1590-1595.

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(8-9): 987-1041.

Gibson GE, Karuppagounder SS, Shi Q (2008). "Oxidant-induced changes in mitochondria and calcium dynamics in the pathophysiology of Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci 1147: 221-32.

Giovanni A, Sieber BA, Heikkila RE, Sonsalla PK (1994). "Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration." J Pharmacol Exp Ther 270(3): 1000-7.

Glenner GG, Wong CW (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun 120(3): 885-90.

Goldman WP, Baty JD, Buckles VD, Sahrman S, Morris JC (1998). "Cognitive and motor functioning in Parkinson disease: subjects with and without questionable dementia." Arch Neurol 55(5): 674-80.

Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT (1997). "Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Ann Neurol 41(1): 17-24.

Gorelick PB (2004). "Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease." Stroke 35(11 Suppl 1): 2620-2.

Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Kortsha GX, Brown GG, Richardson RJ (1997). "Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease." Neurology 48(3): 650-8.

Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ (1998). "The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living." Neurology 50(5): 1346-50.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc Natl Acad Sci U S A 83(13): 4913-7.

Guthrie KM, Wilson DA, Leon M (1990). "Early unilateral deprivation modifies olfactory bulb function." J Neurosci 10(10): 3402-12.

Guthrie KM, Pullara JM, Marshall JF, Leon M (1991). "Olfactory deprivation increases dopamine D2 receptor density in the rat olfactory bulb." Synapse 8(1): 61-70.

Haass C, De Strooper B (1999). "The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key." Science 286(5441): 916-9.

Haass C (2004). "Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation." Embo J 23(3): 483-8.

Hagan JJ, Middlemiss DN, Sharpe PC, Poste GH (1997). "Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy." Trends Pharmacol Sci 18(5): 156-63.

Halasz N, Hokfelt T, Ljungdahl A, Johansson O, Goldstein M (1977). "Dopamine neurons in the olfactory bulb." Adv Biochem Psychopharmacol 16: 169-77.

Halasz N, Ljungdahl A, Hokfelt T, Johansson O, Goldstein M, Park D, Biberfeld P (1977). "Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes. Support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons." Brain Res 126(3): 455-74.

Halasz N, Shepherd GM (1983). "Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb." Neuroscience 10(3): 579-619.

Hartlage-Rubsamen M, Apelt J, Schliebs R (2001). "Fibrillary beta-amyloid deposits are closely associated with atrophic nitric oxide synthase (NOS)-expressing neurons but do not upregulate the inducible NOS in transgenic Tg2576 mouse brain with Alzheimer pathology." Neurosci Lett 302(2-3): 73-6.

Hastings L, Evans JE (1991). "Olfactory primary neurons as a route of entry for toxic agents into the CNS." Neurotoxicology 12(4): 707-14.

Hattori N (2002). "[Parkin gene: its mutations and function]." Rinsho Shinkeigaku 42(11): 1077-81.

Hauser WA, Rich SS, Lee JR, Annegers JF, Anderson VE (1998). "Risk of recurrent seizures after two unprovoked seizures." N Engl J Med 338(7): 429-34.

Havale SH, Pal M (2009). "Medicinal chemistry approaches to the inhibition of dipeptidyl peptidase-4 for the treatment of type 2 diabetes." Bioorg Med Chem 17(5): 1783-802.

Hawkes CH, Shephard BC, Daniel SE (1997). "Olfactory dysfunction in Parkinson's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry 62(5): 436-46.

Hawkes CH, Shephard BC, Geddes JF, Body GD, Martin JE (1998). "Olfactory disorder in motor neuron disease." Exp Neurol 150(2): 248-53.

Hawkes CH, Shephard BC, Daniel SE (1999). "Is Parkinson's disease a primary olfactory disorder?" Qjm 92(8): 473-80.

Hayakawa H, Hayashita-Kinoh H, Nihira T, Seki T, Mizuno Y, Mochizuki H (2007). "The isolation of neural stem cells from the olfactory bulb of Parkinson's disease model." Neurosci Res 57(3): 393-8.

Hazzard DG (1991). "Relevance of the rodent model to human aging studies." Neurobiol Aging 12(6): 645-9.

Hely MA, Fung VS, Morris JG (2000). "Treatment of Parkinson's disease." J Clin Neurosci 7(6): 484-94.

Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R (2005). "Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years." Mov Disord 20(2): 190-9.

Hensley K, Maidt ML, Yu Z, Sang H, Markesbery WR, Floyd RA (1998). "Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation." J Neurosci 18(20): 8126-32.

Hilker R, Klein C, Hedrich K, Ozelius LJ, Vieregge P, Herholz K, Pramstaller PP, Heiss WD (2002). "The striatal dopaminergic deficit is dependent on the number of mutant alleles in a family with mutations in the parkin gene: evidence for enzymatic parkin function in humans." Neurosci Lett 323(1): 50-4.

Hoffman SN, Salin PA, Prince DA (1994). "Chronic neocortical epileptogenesis in vitro." J Neurophysiol 71(5): 1762-73.

Hojberg PV, Vilsboll T, Rabøl R, Knop FK, Bache M, Krarup T, Holst JJ, Madsbad S (2009). "Four weeks of near-normalisation of blood glucose improves the insulin response to glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulintropic polypeptide in patients with type 2 diabetes." Diabetologia 52(2): 199-207.

Holscher C, Li L (2008). "New roles for insulin-like hormones in neuronal signalling and protection: New hopes for novel treatments of Alzheimer's disease?" Neurobiol Aging.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996). "Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice." Science 274(5284): 99-102.

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

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

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2008). "Projeção da População do Brasil por Sexo E Idade: 1980-2050 - Revisão 2008." Rio de Janeiro: IBGE.

Irwin N, Green BD, Gault VA, Cassidy RS, O'Harte FP, Harriott P, Flatt PR (2006). "Effects on glucose homeostasis and insulin secretion of long term activation of the glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) receptor by N-AcGIP(LysPAL37) in normal mice." Peptides 27(4): 893-900.

Jellinger K (1988). "The pedunclopontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry 51(4): 540-3.

Jellinger K, Braak H, Braak E, Fischer P (1991). "Alzheimer lesions in the entorhinal region and isocortex in Parkinson's and Alzheimer's diseases." Ann N Y Acad Sci 640: 203-9.

Kalaria RN, Mitchell MJ and Harik SI (1987). "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 84, 3521-3525.

Kale R (1997). "Bringing epilepsy out of the shadows." Bmj 315(7099): 2-3.

Kaplan AM, Vigna SR (1994). "Gastric inhibitory polypeptide (GIP) binding sites in rat brain." Peptides 15(2): 297-302.

Kariya S, Takahashi N, Hirano M, Ueno S (2005). "Increased vulnerability to L-DOPA toxicity in dopaminergic neurons From VMAT2 heterozygote knockout mice." J Mol Neurosci 27(3): 277-79.

Kaul S, Kanthasamy A, Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG (2003). "Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C delta mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration." Eur J Neurosci 18(6): 1387-401.

Kendrick KM, Keverne EB, Chapman C, Baldwin BA (1988). "Intracranial dialysis measurement of oxytocin, monoamine and uric acid release from the olfactory bulb and substantia nigra of sheep during parturition, suckling, separation from lambs and eating." Brain Res 439(1-2): 1-10.

Keverne EB, Levy F, Guevara-Guzman R, Kendrick KM (1993). "Influence of birth and maternal experience on olfactory bulb neurotransmitter release." Neuroscience 56(3): 557-65.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." Nature 392(6676): 605-8.

Klimaschewski L (1997). "VIP -- a 'very important peptide' in the sympathetic nervous system?" Anat Embryol (Berl) 196(4): 269-77.

Knapper JM, Puddicombe SM, Morgan LM, Fletcher JM, Marks V (1993). "Glucose dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1(7-36)amide: effects on lipoprotein lipase activity." Biochem Soc Trans 21(2): 135S.

Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR (1996). "A neostriatal habit learning system in humans." Science 273(5280): 1399-402.

Kopin IJ, Markey SP (1988). "MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease." Annu Rev Neurosci 11: 81-96.

Koprowski H, Zheng YM, Heber-Katz E, Fraser N, Rorke L, Fu ZF, Hanlon C, Dietzschold B (1993). "In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases." Proc Natl Acad Sci U S A 90(7): 3024-7.

Korczyn AD (1995). "Apolipoprotein E4 in Parkinson's disease." Neurology 45(5): 1025.

Krukoff TL, Khalili P (1997). "Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain." J Comp Neurol 377(4): 509-19.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci 8(7): 499-509.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science 219(4587): 979-80.

Langston JW, Ballard PA, Jr. (1983). "Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine." N Engl J Med 309(5): 310.

Latourelle JC, Pankratz N, Dumitriu A, Wilk JB, Goldwurm S, Pezzoli G, Mariani CB, DeStefano AL, Halter C, Gusella JF, Nichols WC, Myers RH, Foroud T (2009). "Genomewide association study for onset age in Parkinson disease." BMC Med Genet 10: 98.

LeBel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC (1990). "Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage." Toxicol Appl Pharmacol 104(1): 17-24.

Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. (1990) Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. Neurosci Biobehav Rev 14:511-517.

Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA (2002). "New insights from the use of pilocarpine and kainate models." Epilepsy Res 50(1-2): 93-103.

Levy-Lahad E, Lahad A, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD (1995). "Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease." Ann Neurol 38(4): 678-80.

Lewis JT, Dayanandan B, Habener JF, Kieffer TJ. (2000) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral glucose in rats: demonstration by a receptor antagonist. Endocrinology 141:3710-3716.

Li Y, Perry T, Kindy MS, Harvey BK, Tweedie D, Holloway HW, Powers K, Shen H, Egan JM, Sambamurti K, Brossi A, Lahiri DK, Mattson MP, Hoffer BJ, Wang Y, Greig NH (2009). "GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism." Proc Natl Acad Sci U S A 106(4): 1285-90.

Lindner MD, Cain CK, Plone MA, Frydel BR, Blaney TJ, Emerich DF, Hoane MR (1999). "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(1-2): 1-16.

Lioudyno M, Skoglosa Y, Takei N, Lindholm D (1998). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protects dorsal root ganglion neurons from death and induces calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in vitro." J Neurosci Res 51(2): 243-56.

Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996). "Chain migration of neuronal precursors." Science 271, 978-981.

Lothman EW, Bertram EH, 3rd, Stringer JL (1991). "Functional anatomy of hippocampal seizures." Prog Neurobiol 37(1): 1-82.

Luchsinger JA, Mayeux R (2004). "Dietary factors and Alzheimer's disease." Lancet Neurol 3(10): 579-87.

Lucking CB, Brice A (2000). "Alpha-synuclein and Parkinson's disease." Cell Mol Life Sci 57(13-14): 1894-908.

Luskin MB (1993). "Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone." Neuron 11, 173-189.

Luth HJ, Munch G, Arendt T (2002). "Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation." Brain Res 953(1-2): 135-43.

Lynn FC, Pamir N, Ng EH, McIntosh CH, Kieffer TJ, Pederson RA (2001). "Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats." Diabetes 50(5): 1004-11.

Martin B, Lopez de Maturana R, Brenneman R, Walent T, Mattson MP, Maudsley S (2005). "Class II G protein-coupled receptors and their ligands in neuronal function and protection." Neuromolecular Med 7(1-2): 3-36.

Masliah E, Achim CL, Ge N, DeTeresa R, Terry RD, Wiley CA (1992). "Spectrum of human immunodeficiency virus-associated neocortical damage." Ann Neurol 32(3): 321-9.

Mattson MP (2000). "Apoptosis in neurodegenerative disorders." Nat Rev Mol Cell Biol 1(2): 120-9.

Mattson MP (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature 430(7000): 631-9.

McGeer EG, McGeer PL (1998). "The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease." Exp Gerontol 33(5): 371-8.

McLean JH, Shipley MT, Nickell WT, Aston-Jones G, Reyher CK (1989). "Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat." J Comp Neurol 285(3): 339-49.

McNamara JO (1994). "Cellular and molecular basis of epilepsy." J Neurosci 14(6): 3413-25.

McNamara JO (1999). "Emerging insights into the genesis of epilepsy." Nature 399(6738 Suppl): A15-22.

McNaught KS, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW (2003). "Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease." Exp Neurol 179(1): 38-46.

Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, Dafre AL, Di Giunta G, Figueiredo CP, Takahashi RN, Campos MM, Calixto JB (2007). "Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein." J Neurosci 27(20): 5394-404.

Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG (1999). "Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy." Epilepsy Res 36(2-3): 189-204.

Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. Epilepsia 34:985-995.

Meneses M, Teive H (1996). Doença de Parkinson. Aspectos Clínicos e cirúrgicos. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Merrill AH, Jr., van Echten G, Wang E, Sandhoff K (1993). "Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ." J Biol Chem 268(36): 27299-306.

Minghetti L, Ajmone-Cat MA, De Berardinis MA, De Simone R (2005). "Microglial activation in chronic neurodegenerative diseases: roles of apoptotic neurons and chronic stimulation." Brain Res Brain Res Rev 48(2): 251-6.

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(1): 41-7.

Morrell F, deToledo-Morrell L (1999). "From mirror focus to secondary epileptogenesis in man: an historical review." Adv Neurol 81: 11-23.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982). "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions." Nature 297(5868): 681-3.

Muller T, Farahati J, Kuhn W, Eising EG, Przuntek H, Reiners C, Coenen HH (1998). "[¹²³I]beta-CIT SPECT visualizes dopamine transporter loss in de novo parkinsonian patients." Eur Neurol 39, 44-48.

Murray CJ, Lopez AD, Jamison DT (1994). "The global burden of disease in 1990: summary results, sensitivity analysis and future directions." Bull World Health Organ 72(3): 495-509.

NIA (National Institute on Aging) (2007). "Why Population Aging Matters: A Global Perspective." Bethesda: NIA

Normandin L, Ann Beaupre L, Salehi F, St -Pierre A, Kennedy G, Mergler D, Butterworth RF, Philippe S, Zayed J (2004). "Manganese distribution in the brain and neurobehavioral changes following inhalation exposure of rats to three chemical forms of manganese." Neurotoxicology 25(3): 433-41.

Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, Dapia S, Caeiro JR, Cancelas J, Haro-Mora JJ, Villanueva-Penacarrillo ML (2009). "Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type 2 diabetic, and insulin-resistant states." Calcif Tissue Int 84(6): 453-61.

Nyberg J, Anderson MF, Meister B, Alborn AM, Strom AK, Brederlau A, Illerskog AC, Nilsson O, Kieffer TJ, Hietala MA, Ricksten A, Eriksson PS. (2005) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. J Neurosci 25:1816-1825.

Nyberg J, Jacobsson C, Anderson MF, Eriksson PS. (2007) Immunohistochemical distribution of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in the adult rat brain. J Neurosci Res 85:2099-2119.

Oben J, Morgan L, Fletcher J, Marks V (1991). "Effect of the entero-pancreatic hormones, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like polypeptide-1(7-36) amide, on fatty acid synthesis in explants of rat adipose tissue." J Endocrinol 130(2): 267-72.

O'Harte FP, Gray AM, Flatt PR (1998). "Gastric inhibitory polypeptide and effects of glycation on glucose transport and metabolism in isolated mouse abdominal muscle." J Endocrinol 156(2): 237-43.

Olanow CW, Rascol O, Hauser R, Feigin PD, Jankovic J, Lang A, Langston W, Melamed E, Poewe W, Stocchi F, Tolosa E (2009). "A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease." N Engl J Med 361(13): 1268-78.

Owen AM, Sahakian BJ, Semple J, Polkey CE, Robbins TW (1995). "Visuo-spatial short-term recognition memory and learning after temporal lobe excisions, frontal lobe excisions or amygdalo-hippocampectomy in man." Neuropsychologia 33(1): 1-24.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997). "Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus." J Neurosci 17(10): 3727-38.

Park J, Choi J, Yang J, Park SJ (2006). "A rule-based detection of functional modules in protein-protein interaction networks." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 1: 5810-3.

Park J, Kim Y, Chung J (2009). "Mitochondrial dysfunction and Parkinson's disease genes: insights from *Drosophila*." Dis Model Mech 2(7-8): 336-40.

Parkinson J (1817). An Essay on the Shaking Palsy. London, Sherwood, Neely and Jones.

Passos GF, Figueiredo CP, Prediger RD, Pandolfo P, Duarte FS, Medeiros R, Calixto JB (2009). "Role of the macrophage inflammatory protein-1alpha/CC chemokine receptor 5 signaling pathway in the neuroinflammatory response and cognitive deficits induced by beta-amyloid peptide." Am J Pathol 175(4): 1586-97.

Pavelock KA, Girard BM, Schutz KC, Braas KM, May V (2007). "Bone morphogenetic protein down-regulation of neuronal pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and reciprocal effects on vasoactive intestinal peptide expression." J Neurochem 100(3): 603-16.

Paxinos G, Watson C (1998). "The rat brain in stereotaxic coordinates." Academic Press, 4th ed. New York.

Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S, Teive H, Fraix V, Vidailhet M, Nicholl D, Barone P, Wood NW, Raskin S, Deleuze JF, Agid Y, Durr A, Brice A (2003). "Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism." Brain 126(Pt 6): 1271-8.

Petreanu L, Alvarez-Buylla A (2002). "Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction." J Neurosci 22, 6106-6113.

Petrella JR, Coleman RE, Doraiswamy PM (2003). "Neuroimaging and early diagnosis of Alzheimer disease: a look to the future." Radiology 226(2): 315-36.

Poirier J (2005). "Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease." Neurobiol Aging 26(3): 355-61.

Poirier JL, Capek R, De Koninck Y. (2000) Differential progression of Dark Neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. Neuroscience 97:59-68.

Prediger RD, Fernandes D, Takahashi RN (2005). "Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats." Behav Brain Res 159(2): 197-205.

Prediger RD, Batista LC, Takahashi RN (2005). "Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors." Neurobiol Aging 26(6): 957-64.

Prediger RD, De-Mello N, Takahashi RN (2006). "Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats." Eur J Pharmacol 531(1-3): 176-82.

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

Prediger RD, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, Figueiredo CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL (2007). "Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response." Behav Brain Res 177(2): 205-13.

Prediger RD, Medeiros R, Pandolfo P, Duarte FS, Passos GF, Pesquero JB, Campos MM, Calixto JB, Takahashi RN (2008). "Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." Neuroscience 151(3): 631-43.

Prediger RD, Rial D, Medeiros R, Figueiredo CP, Doty RL, Takahashi RN (2009a). "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 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 (2009b). "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.

Przedborski S, Vila M (2001). "The last decade in Parkinson's disease research. Basic sciences." Adv Neurol 86, 177-186.

Rayan GM, Johnson C, Pitha J, Cahill S, Said S (1995). "Vasoactive intestinal peptide and nerve growth factor effects on nerve regeneration." J Okla State Med Assoc 88(8): 337-41.

Reagan LP, Gorovits N, Hoskin EK, Alves SE, Katz EB, Grillo CA, Piroli GG, McEwen BS, Charron MJ (2001). "Localization and regulation of GLUTx1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats." Proc Natl Acad Sci U S A 98(5): 2820-5.

Reynolds EH (1995). "Do anticonvulsants alter the natural course of epilepsy? Treatment should be started as early as possible." Bmj 310(6973): 176-7.

Riederer P, Wuketich S (1976). "Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis." J Neural Transm 38(3-4): 277-301.

Ritchie K, Lovestone S (2002). "The dementias." Lancet 360(9347): 1759-66.

Rodella L, Rezzani R, Agostini C, Bianchi R (1998). "Induction of NADPH-diaphorase activity in the rat periaqueductal gray matter after nociceptive visceral stimulation." Brain Res 793(1-2): 333-6.

Rojo AL, Montero C, Salazar M, Close RM, Fernandez-Ruiz J, Sanchez-Gonzalez M A, de Sagarra MR, Jackson-Lewis V, Cavada C, Cuadrado A (2006). "Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice." Eur J Neurosci 24, 1874-1884.

Ross SA, Brown JC, Dupre J (1977). "Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide following oral glucose in diabetes mellitus." Diabetes 26:525-529.

Sadun AA, Borchert M, DeVita E, Hinton DR, Bassi CJ (1987). "Assessment of visual impairment in patients with Alzheimer's disease." Am J Ophthalmol 104(2): 113-20.

Salehi M, Aulinger BA, D'Alessio DA (2008). "Targeting beta-cell mass in type 2 diabetes: promise and limitations of new drugs based on incretins." Endocr Rev 29(3): 367-79.

Sallaz M, Jourdan F (1992). "Apomorphine disrupts odour-induced patterns of glomerular activation in the olfactory bulb." Neuroreport 3(10): 833-6.

Salvatore T, Carbonara O, Cozzolino D, Torella R, Sasso FC (2009). "Progress in the oral treatment of type 2 diabetes: update on DPP-IV inhibitors." Curr Diabetes Rev 5(2): 92-101.

Sanabria ER, Su H, Yaari Y (2001). "Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." J Physiol 532:205-216.

Sanabria ER, Silva AV, Spreafico R, Cavaleiro EA (2002). "Damage, reorganization, and abnormal neocortical hyperexcitability in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." Epilepsia 43 Suppl 5:96-106.

Santamaria J, Tolosa E, Valles A (1986). "Parkinson's disease with depression: a possible subgroup of idiopathic parkinsonism." Neurology 36(8): 1130-3.

Saporito MS, Brown EM, Miller MS, Carswell S (1999). "CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons In vivo." J Pharmacol Exp Ther 288(2): 421-7.

Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RK (2000). "MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences." Behav Genet 30(3): 171-82.

Shiple MT, Halloran FJ, de la Torre J (1985). "Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat." Brain Res 329(1-2): 294-9.

Schmidt HH, Walter U (1994). "NO at work." Cell 78(6): 919-25.

Schmidt N, Feger B (2001). "Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease." J Neural Transm 108(11): 1263-82.

Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W (1985). "Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets." Diabetologia 28(9): 704-7.

Schmued LC, Albertson C, Slikker W, Jr. (1997) Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. Brain Res 751:37-46.

Schmued LC, Hopkins KJ. (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. Brain Res 874:123-130.

Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG (1998). "D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat." J Neurosci 18(4): 1613-21.

Sedelis M, Schwarting RK, Huston JP (2001). "Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease." Behav Brain Res 125(1-2): 109-25.

Selkoe DJ (1994). "Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein." Annu Rev Neurosci 17: 489-517.

Selkoe DJ (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease." Nature 399(6738 Suppl): A23-31.

Selkoe DJ (2000). "Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein." Ann N Y Acad Sci 924: 17-25.

Selkoe DJ (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." Science 298(5594): 789-91.

Selkoe DJ, Schenk D (2003). "Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics." Annu Rev Pharmacol Toxicol 43: 545-84.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature 375(6534): 754-60.

Shimohama S, Sawada H, Kitamura Y, Taniguchi T (2003). "Disease model: Parkinson's disease." Trends Mol Med 9(8): 360-5.

Siddiqui NI (2009). "Incretin mimetics and DPP-4 inhibitors: new approach to treatment of type 2 diabetes mellitus." Mymensingh Med J 18(1): 113-24.

Sisodia SS, Price DL (1995). "Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease." Faseb J 9(5): 366-70.

Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G (1997). "Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease." J Neurosci 17(8): 2653-7.

Soffie M, Lamberty Y (1987). "Scopolamine disrupts visual reversal without affecting the first discrimination." Physiol Behav 40(2): 263-5.

Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN (2008). "Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease." Neuroscience 156(4): 830-40.

Thangnipon W, Kingsbury A, Webb M, Balazs R (1983). "Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes." Brain Res 313(2): 177-89.

Thannickal VJ, Day RM, Klinz SG, Bastien MC, Larios JM, Fanburg BL (2000). "Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-beta1." Faseb J 14(12): 1741-8.

Thannickal VJ, Fanburg BL (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279(6): L1005-28.

Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C (1999). "Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease." Neurosci Lett 269(1): 52-4.

Trumper A., Trumper K., Trusheim H., Arnold R., Goke B. and Horsch D. (2001) Glucose-dependent insulintropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. Mol Endocrinol **15**, 1559-1570.

Trumper A, Trumper K, Horsch D (2002). "Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulintropic polypeptide in beta(INS-1)-cells." J Endocrinol 174, 233-246.

Tsang SW, Pomakian J, Marshall GA, Vinters HV, Cummings JL, Chen CP, Wong PT, Lai MK (2007). "Disrupted muscarinic M1 receptor signaling correlates with loss of protein kinase C activity and glutamatergic deficit in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging 28(9): 1381-7.

Tseng CC, Jarboe LA, Landau SB, Williams EK, Wolfe MM (1993). "Glucose-dependent insulintropic peptide: structure of the precursor and tissue-specific expression in rat." Proc Natl Acad Sci U S A 90(5): 1992-6.

Ullah G, Cressman JR, Jr., Barreto E, Schiff SJ (2009). "The influence of sodium and potassium dynamics on excitability, seizures, and the stability of persistent states. II. Network and glial dynamics." J Comput Neurosci 26(2): 171-83.

Unger JW, Livingston JN, Moss AM (1991a). "Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects." Prog Neurobiol 36(5): 343-62.

Unger JW, Moss AM, Livingston JN (1991b). "Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat." Neuroscience 42(3): 853-61.

Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI (1993). "Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain." Endocrinology 133(6): 2861-70.

Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ (2001). "Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients." Diabetes 50(3): 609-13.

Wahl MA, Plehn RJ, Landsbeck EA, Verspohl EJ, Ammon HP (1992). "Are ionic fluxes of pancreatic beta cells a target for gastric inhibitory polypeptide?" Mol Cell Endocrinol 90(1): 117-23.

Wallace JE, Krauter EE, Campbell BA (1980). "Animal models of declining memory in the aged: short-term and spatial memory in the aged rat." J Gerontol 35(3): 355-63.

Walsh DM, Selkoe DJ (2004). "Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease." Neuron 44(1): 181-93.

Walsh JS, Welch HG, Larson EB (1990). "Survival of outpatients with Alzheimer-type dementia." Ann Intern Med 113(6): 429-34.

Walter C, Murphy BL, Pun RY, Spieles-Engemann AL, Danzer SC (2007). "Pilocarpine-induced seizures cause selective time-dependent changes to adult-generated hippocampal dentate granule cells." J Neurosci 27(28): 7541-52.

Walz R, Castro RM, Velasco TR, Carlotti CG, Jr., Sakamoto AC, Brentani RR, Martins VR (2002). "Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy." Cell Mol Neurobiol 22(3): 249-57.

Wang L, Liu YH, Huang YG, Chen LW (2008). "Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining." Brain Res 1241:157-167.

Waschek JA (1995). "Vasoactive intestinal peptide: an important trophic factor and developmental regulator?" Dev Neurosci 17(1): 1-7.

Weldon DA, Travis ML, Kennedy DA (1991). "Posttraining D1 receptor blockade impairs odor conditioning in neonatal rats." Behav Neurosci 105(3): 450-8.

Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH (2002). "The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." J Neurosci 22(5): 1858-67.

Whittle BJ, Laszlo F, Evans SM, Moncada S (1995). "Induction of nitric oxide synthase and microvascular injury in the rat jejunum provoked by indomethacin." Br J Pharmacol 116(4): 2286-90.

Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M (2001). "A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy." N Engl J Med 345:311-318.

Wilson DA, Sullivan RM (1995). "The D2 antagonist spiperone mimics the effects of olfactory deprivation on mitral/tufted cell odor response patterns." J Neurosci 15(8): 5574-81.

Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002). "Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb." Eur J Neurosci 16, 1681-1689.

Xie D, Cheng H, Hamrick M, Zhong Q, Ding KH, Correa D, Williams S, Mulloy A, Bollag W, Bollag RJ, Runner RR, McPherson JC, Insogna K, Isaacs CM (2005). "Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor knockout mice have altered bone turnover." Bone 37(6): 759-69.

Yamada M, Onodera M, Mizuno Y, Mochizuki H (2004). "Neurogenesis in olfactory bulb identified by retroviral labeling in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated adult mice." Neuroscience 124, 173-181.

Yang F, Liu ZR, Chen J, Zhang SJ, Quan QY, Huang YG, Jiang W (2009). "Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats." J Neurosci Res.

Yip RG, Wolfe MM (2000). "GIP biology and fat metabolism." Life Sci 66(2): 91-103.

Zatta P, Favarato M, Nicolini M (1993). "Deposition of aluminum in brain tissues of rats exposed to inhalation of aluminum acetylacetonate." Neuroreport 4(9): 1119-22.

Zhang QL, Liu J, Lin PX, Webster H (2002). "Local administration of vasoactive intestinal peptide after nerve transection accelerates early myelination and growth of regenerating axons." J Peripher Nerv Syst 7(2): 118-27.

Zhou J, Livak MF, Bernier M, Muller DC, Carlson OD, Elahi D, Maudsley S, Egan JM (2007). "Ubiquitination is involved in glucose-mediated downregulation of GIP receptors in islets." Am J Physiol Endocrinol Metab 293(2): E538-47.

Zhu B, Herbert J (1997). "Calcium channels mediate angiotensin II-induced drinking behaviour and c-fos expression in the brain." Brain Res 778(1): 206-14.

Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G (2007). "Causes of oxidative stress in Alzheimer disease." Cell Mol Life Sci 64(17): 2202-10.