

Caio Marcos Massari Leite

**ESTUDO DO EFEITO ANTIDISCINÉTICO E
NEUROPROTETOR DA GUANOSINA EM CAMUNDONGOS
TRATADOS COM RESERPINA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Bioquímica
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Inês
Tasca

Florianópolis
2016

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

Massari Leite, Caio Marcos

Estudo do efeito antidiscinético e neuroprotetor da
guanosina em camundongos tratados com reserpina / Caio
Marcos Massari Leite ; orientadora, Carla Inês Tasca -
Florianópolis, SC, 2016.

72 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Doença de Parkinson. 3. Guanosina. 4.
Discinesia. I. , Carla Inês Tasca. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica. III. Título.

“Estudo do efeito antidiscinético e neuroprotetor da guanosina em camundongos tratados com reserpina”

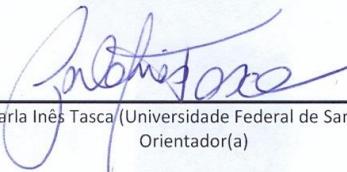
Por

Caio Marcos Massari Leite

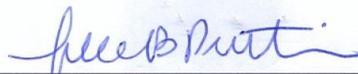
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (13/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.


Prof(a). Dr(ã). Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:


Dr(a) Carla Inês Tasca (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr(a) Fabiana Kalyne Ludka (Universidade do Contestado - Campus Canoinhas)


Dr(a) Tetsadé Cambom Piermartiri (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr(a) Manuella Pinto Kaster (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 22 de Abril de 2016.

AGRADECIMENTOS

À UFSC, ao CNPq e à CAPES pelo suporte estrutural e financeiro durante o período de realização do presente estudo, essencial para a execução do trabalho. À minha orientadora, Carla Inês Tasca, pela oportunidade oferecida e por todos os ensinamentos adquiridos.

A toda a equipe do Laboratório de Neuroquímica 4, que me aguentaram esse tempo, tiveram paciência e disponibilidade em ajudar; Carol, Dé, Flavinha, Gabriela, Lê, Luísa, Karen, Naiani, Victor, Tet e Wagner.

À Fabi, que me ‘treinou’ e me auxiliava à distância quando tinha alguma dúvida.

À Andréia Cunha, que me ajudou a implementar e analisar o modelo da reserpina, utilizado neste estudo.

Agradeço à minha família, principalmente minha mãe Suze e minhas tias, Neide e Teresa, que tenho como segundas mães, tanto pelo incentivo, pelo amor e carinho, por me aguentar todo esse tempo e tornarem possível essa realização, mesmo distanciando-me delas. E ao meu avô Francisco Massari pelo conhecimento e admiração que me proporcionou desde cedo.

Aos amigos que tive a oportunidade de conhecer e conviver durante o mestrado, e a todos que já me aturavam desde a graduação.

Ao pessoal do 1007, amigos que encontrei no trabalho noturno necessário para me manter no mestrado enquanto não tinha bolsa.

“Todo o nosso conhecimento se inicia com sentimentos.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

As discinesias são caracterizadas como diversos movimentos involuntários, que podem afetar diversas partes corporais. Muitas doenças neurológicas podem apresentar esse sintoma, como a doença de Parkinson (DP). As discinesias podem ser induzidas através da administração de várias classes de drogas, entre elas a reserpina. A reserpina é um alcalóide isolado das raízes da planta *Rauwolfia serpentina* e atua como inibidor do transportador vesicular de monoaminas - dopamina, noradrenalina, adrenalina e serotonina - (VMAT-2) no Sistema Nervoso Central (SNC). Desta maneira, a reserpina leva à depleção destes neurotransmissores nos terminais nervosos e, como consequência, induz hipolocomoção, rigidez muscular transitória e movimentos involuntários, sendo estas respostas dependentes da dose e tempo de tratamento utilizado. Muita atenção tem sido dada ao efeito biológico da guanosina. Ainda que não tenha sido completamente caracterizado um possível receptor específico para a guanosina, são notáveis as evidências que demonstram os efeitos neuroprotetores deste nucleosídeo endógeno. Neste estudo foi avaliado o potencial terapêutico da guanosina em camundongos tratados com reserpina (1 mg/kg, duas administrações subcutânea em dias alternados). A guanosina (7,5 mg/kg) administrada oralmente reverteu o aumento de discinesias orofaciais induzidas pela reserpina. Além disto, o efeito antidiscinético da guanosina foi abolido com a prévia administração do antagonista do receptor de adenosina A₁, o 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX, 0,75 mg/kg). O teste da barra evidenciou um estado cataléptico nos camundongos após o tratamento com reserpina. Este efeito foi revertido pela administração da guanosina ou de DPCPX. Porém, quando administrado antes da guanosina, o DPCPX abole o efeito da guanosina. Como o mesmo protocolo de tratamento, a reserpina também induziu em fatias do estriado um aumento do dano celular, mostrado pela incorporação da sonda iodeto de propídeo (IP) e um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) revelado pela sonda (H₂DCFH-DA). Essas alterações não foram vistas no córtex cerebral nem no hipocampo. A administração de guanosina foi efetiva em diminuir o aumento das EROs, porém sem efeito no dano celular. A avaliação do potencial de membrana mitocondrial pela sonda TMRE não evidenciou alteração em fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado. Com o presente estudo, demonstramos o efeito antidiscinético da guanosina e a modulação dos distúrbios motores e neuroquímicos relacionados à DP.

Palavras-chaves: Discinesias, doença de Parkinson, guanosina, neuroproteção, receptor de adenosina A₁

ABSTRACT

Dyskinesias are characterized as several involuntary movements, which can affect several body parts. Many neurological disorders can exhibit this symptom, as Parkinson's Disease (PD). Dyskinesias can be induced by administration of various classes of drugs including reserpine. Reserpine is an alkaloid isolated from *Rauwolfia serpentina* plant roots and acts as an inhibitor of vesicular monoamine - dopamine, norepinephrine, epinephrine and serotonin - transporter (VMAT-2) in the central nervous system. Reserpine leads to depletion of these neurotransmitters, and consequently, induces hypolocomotion, muscle rigidity and involuntary movements. Guanosine, an endogenous nucleoside, has been highlighted due to its biological effect, mainly as a neuroprotective agent, although its exact mechanisms of action has not been fully characterized. This study evaluated the therapeutic potential of guanosine in reserpinized mice. Guanosine (7.5 mg / kg) administered orally prevented the increase of orofacial dyskinesia induced by reserpine. Additionally, the antidyskinetic effect of guanosine was abolished by prior administration of the A₁ adenosine receptor antagonist, 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX, 0,75 mg/kg). The bar test showed a cataleptic state of mice after treatment with reserpine. This behavior was prevented by acute administration of guanosine. Interestingly, DPCPX also prevented this effect, however DPCPX also abolished the anti-cataleptic effect of guanosine. Reserpine also induced increased cell damage, shown by incorporation of the propidium iodide (PI) probe and increased reactive oxygen species (ROS), in the striatum. These changes were not seen in the cerebral cortex or the hippocampus. Guanosine was effective in reducing the increase in ROS, but did not alter cell damage induced by reserpine in the striatum. Assessment of mitochondrial membrane potential showed no changes in any analyzed brain structure. This study demonstrated the antidyskinetic effect of guanosine and its possible modulation of motor and neurochemical impairments related to Parkinson's disease.

Keywords: Dyskinesia, Parkinson's disease, guanosine, neuroprotection, adenosine receptors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Os circuitos neurais dos gânglios basais responsáveis pela movimentação	22
Figura 2	Mecanismo de ação da reserpina em neurônios dopaminérgicos	24
Figura 3	Colocalização dos receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos na circuitaria motora	27
Figura 4	Desenho esquemático do tratamento agudo	33
Figura 5	Desenho esquemático do tratamento com DPCPX.....	34
Figura 6	Teste da barra para avaliação da catalepsia	35
Figura 7	Efeito antidiscinético da guanosina em camundongos tratados com reserpina	38
Figura 8	Envolvimento do receptor A ₁ no efeito antidiscinético da guanosina em camundongos tratados com reserpina ...	39
Figura 9	Efeito da guanosina em camundongos tratados com reserpina no teste da catalepsia	41
Figura 10	Efeito do tratamento com reserpina sobre a morte celular de fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado.....	43
Figura 11	Efeito do tratamento com reserpina sobre a produção de EROs em fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado.....	44
Figura 12	Efeito do tratamento com reserpina sobre o potencial de membrana mitocondrial em fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado	46
Figura 13	Avaliação do efeito agudo da guanosina na morte celular em fatias de córtex, hipocampo e estriado de camundongos tratados com reserpina	47
Figura 14	Avaliação do efeito agudo da guanosina na produção de EROs em fatias de córtex, hipocampo e estriado de camundongos tratados com reserpina.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxi dopamina
ADP	Adenosina 5' difosfato
AMP	Adenosina 5' monofosfato
ATP	Adenosina 5' trifosfato
CPT	8-Ciclopentilteofilina
DP	Doença de Parkinson
DPCPX	8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina
DT	Discinesia tardia
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GDP	Guanosina 5'difosfato
GMP	Guanosina 5' monofosfato
GTP	Guanosina 5' trifosfato
i.p.	Intraperitoneal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP	Iodeto de propídeo
KRB	Tampão Krebs-Ringer bicarbonato
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina
LID	Discinesias induzidas pela L-DOPA
MAO-B	Monoamina oxidase B
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NFk-B	Fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NST	Núcleo subtalâmico
PGO	Privação de glicose e oxigênio
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
s.c.	Subcutânea
SN	Substância Negra
SNC	Sistema nervoso central
SNpr	Substância negra parte reticulada
TBARS	Sustâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TJM	do inglês “ <i>Tremoulus jaw movements</i> ”, movimentos de tremor da mandíbula
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
v.o.	Via oral
VMAT-2	Transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Doença de Parkinson	19
1.2	Discinesias	21
1.3	Indução de discinesia	22
1.4	Transmissão purinérgica	25
1.5	Guanosina	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAS E MÉTODOS	33
3.1	Animais	33
3.2	Administração de reserpina	33
3.3	Tratamento por via oral da guanosina	33
3.4	Avaliação da participação do receptores A ₁ de adenosina	34
3.5	Avaliação comportamental	34
3.5.1	Avaliação da frequência dos TJM.....	34
3.5.2	Catalepsia	35
3.6	Parâmetros bioquímicos	35
3.6.1	Preparação de fatias	35
3.6.2	Ensaio da viabilidade celular	36
3.6.3	Medida da produção de EROs	36
3.6.4	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	36
3.7	Análise estatística	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Efeito antidiscinético da guanosina em camundongos tratados com reserpina	37
4.2	Envolvimento do receptor A ₁ no efeito antidiscinético da guanosina em camundongos tratados com reserpina	39
4.3	Efeito da guanosina em camundongos tratados com reserpina no teste da catalepsia	40
4.4	Efeito do tratamento com reserpina sobre a morte celular de fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado	42
4.5	Efeito do tratamento com reserpina sobre a produção de EROs em fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado	43
4.6	Efeito do tratamento com reserpina sobre o potencial de membrana mitocondrial em fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado	45

4.7	Avaliação do efeito agudo da guanosina na morte celular em fatias de córtex, hipocampo e estriado de camundongos tratados com reserpina	46
4.8	Avaliação do efeito agudo da guanosina na produção de EROs em fatias de córtex, hipocampo e estriado de camundongos tratados com reserpina	47
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÕES	55
	Artigos elaborados durante a dissertação	57
	REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é o segundo transtorno neurodegenerativo de maior prevalência e seu início raramente se dá antes dos 50 anos de idade, sendo observado um aumento acentuado na sua incidência a partir dos 60 anos, afetando 1 - 2% da população (De Lau e Breteler, 2006). Como a incidência da doença aumenta com a idade (fator de risco mais importante), e levando em consideração o aumento da expectativa de vida da sociedade atual, é provável que o número de pessoas que sofrem de DP tenda a aumentar constantemente no futuro.

A principal característica desta enfermidade é a perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra (SN), resultando assim na redução estriatal de dopamina (Hirsch *et al.*, 1992). Como consequência da perda neural, a DP é, normalmente caracterizada como um distúrbio motor, sendo o seu diagnóstico baseado pela presença de dois ou mais dos sinais motores: rigidez muscular, bradiscinesia, tremor e instabilidade postural (Hirsch *et al.*, 1992; Yamanouchi e Nagura, 1997; Van Der Burg *et al.*, 2006). Porém, tais sinais motores só aparecem quando aproximadamente 60 - 70% dos neurônios dopaminérgicos da SN já se encontram degenerados (Carvey, Punati e Newman, 2006). À medida que a doença progride e ocorre degeneração neuronal, há o surgimento de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas, que são compostos de agregados fibrilares com a presença das proteínas α -sinucleína e ubiquitina. Estes agregados são chamados corpos de Lewy e se aglomeram em grande quantidade nos neurônios (Markesbery *et al.*, 2009).

Atualmente, há consideráveis evidências demonstrando que o processo neurodegenerativo que leva à DP começa anos antes do aparecimento dos sintomas motores, não estando somente restrito aos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Outras áreas também estão envolvidas, como as estruturas olfatórias anteriores, núcleo motor dorsal do vago, núcleo caudal da raphe, *locus coeruleus*, hipocampo e córtex cerebral (Braak *et al.*, 2004). De acordo, neurônios colinérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos também são degenerados, e parecem ser os principais responsáveis pelos sintomas não-motores da DP, incluindo prejuízos olfativo e de memória, distúrbios de sono, ansiedade e depressão (Chaudhuri *et al.*, 2006)

A etiologia da DP ainda é tida como idiopática, mas estudos sugerem que a DP pode ser decorrente de um conjunto de fatores, sejam eles genéticos, da exposição às toxinas ambientais, do estresse oxidativo, anormalidades mitocondriais e/ou alterações relacionadas ao envelhecimento (Pereira e Garrett, 2010). Os principais mecanismos bioquímicos evidenciados como possíveis responsáveis pela neurodegeneração na DP são o estresse oxidativo, o dano mitocondrial, uma resposta inflamatória exacerbada e a excitotoxicidade glutamatérgica (Dexter e Jenner, 2013). Todos os dias, humanos são expostos a milhares de xenobióticos no ar, água e comida, incluindo agentes químicos de roupas, tintas, plásticos, perfumes, cosméticos, comidas, bebidas, pesticidas, herbicidas e emissões gasosas de veículos e indústrias. Tais químicos podem estar envolvidos na etiologia da DP (Uversky, 2004).

Embora ainda não exista cura para a DP, existem estratégias farmacológicas para atenuar os sintomas, porém esses tratamentos apresentam limitações. A droga mais utilizada como tratamento na DP é a mesma desde os anos 60, a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), um precursor da dopamina, que tem como objetivo restabelecer os níveis de dopamina. Porém sua eficácia diminui com os anos de tratamento e altas doses podem levar às discinesias (Hardie, Lees e Stern, 1984).

Limitações no tratamento farmacológico atual para a DP têm levado a uma crescente investigação sobre drogas que possam promover um tratamento alternativo para sintomas motores e não motores, reduzindo os efeitos colaterais, para assim modificar o curso da doença (Schapira *et al.*, 2006; Obeso *et al.*, 2010). Testes clínicos estão avaliando novas drogas com potencial neuroprotetor frente à DP. Estes testes incluem principalmente o uso de agonistas de receptores dopaminérgicos, inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B), antioxidantes, agentes anti-apoptóticos e antagonistas de receptores A_{2A} de adenosina e de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) de glutamato (Dawson e Dawson, 2002; Schapira *et al.*, 2006; Obeso *et al.*, 2010).

O estudo e o desenvolvimento de novas terapias para a DP dependem da existência de modelos animais que apresentem características comportamentais e/ou histopatológicas da enfermidade, facilitando a avaliação de novas drogas e estratégias terapêuticas (Gerlach, Foley e Riederer, 2003). Consideráveis evidências demonstram que diversas drogas podem ser utilizadas para induzir sintomas e as características bioquímicas da DP, entre eles o tratamento

com as toxinas 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), utilização de pesticidas como Paraquat e Rotenona, e depleção ou antagonismo de dopamina com a reserpina e o haloperidol, respectivamente (Duty e Jenner, 2011).

1.2 Discinesias

As discinesias são caracterizadas como diversos movimentos involuntários, que podem afetar partes corporais mais discretas ou ter uma ampla abrangência corporal, tornando-se assim seriamente debilitante (Jenner, 2008). Diversas doenças neurológicas podem apresentar esse sintoma, incluindo a discinesia tardia (DT) e a DP (Aquino e Lang, 2014; Kobylecki *et al.*, 2014; Aquino e Fox, 2015).

As discinesias podem surgir pelo uso de fármacos, e assim, produzir uma série de movimentos involuntários de abertura e fechamento da boca, movimentos do tronco, da pelve, flexão/extensão dos membros inferiores e superiores, assim como respiração irregular e vocalizações (Aquino e Lang, 2014; Kobylecki *et al.*, 2014; Aquino e Fox, 2015). O desenvolvimento dessa condição pode ser causado por longos períodos de uso de antipsicóticos, como o haloperidol, e também da L-DOPA (Tolosa *et al.*, 1998).

Os mecanismos envolvidos nas discinesias são complexos, abrangendo diversos sistemas de neurotransmissão, tendo como base um desbalanço neuroquímico do circuito motor, que envolve os gânglios da base. Normalmente, o controle dos movimentos pela dopamina é realizado através da ativação dos neurônios GABAérgicos da via direta, que expressam receptores dopaminérgicos do tipo D1 (D1R) e pela inibição dos neurônios GABAérgicos da via indireta, que expressam receptores dopaminérgicos do tipo D2 (D2R) (Heiman *et al.*, 2014)(figura 1).

Os neurônios GABAérgicos que expressam D1R exibem um aumento de atividade em resposta à dopamina e se projetam diretamente para os núcleos dos gânglios da base de saída, inibindo-os. Como consequência, ocorre uma desinibição do tálamo e estimulação de áreas corticais, promovendo o movimento. Por outro lado, os neurônios GABAérgicos da via indireta, que expressam, principalmente D2R, exibem uma diminuição da atividade em resposta à dopamina, inibindo o globo pálido externo. Consequentemente, os neurônios do núcleo subtalâmico (NST) são desinibidos, ativando a substância negra parte reticulata (SNpr). Estes núcleos inibem o tálamo com a consequente

inibição do movimento. Isto permite seqüências de movimentos coordenados.

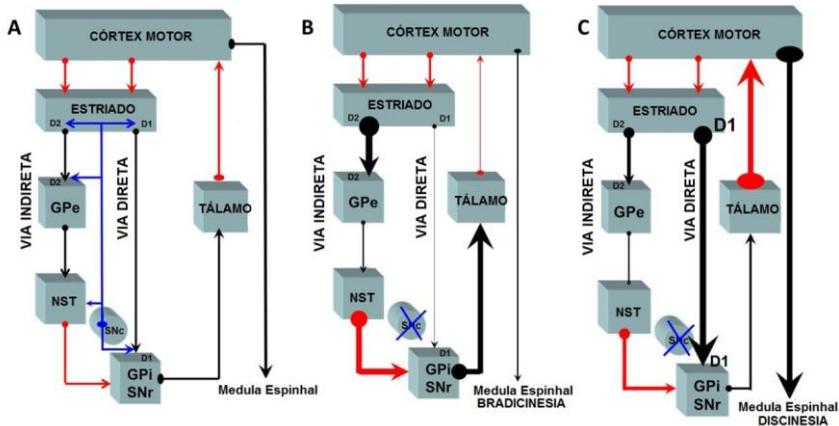


Figura 1. Os circuitos neurais dos gânglios basais responsáveis pela movimentação. normal (A), na DP (B) e nas discinesias (C). Gpe, globo pálido externo; NST, núcleo subtalâmico; GPI, globo pálido interno; SNr, substância negra parte reticulada; SNc substância negra parte compacta; D1, receptor de dopamina D1R; D2, receptor de dopamina D2R. Adaptado de (Bravo et al., 2014)

Na DP há alterações na coordenação do movimento devido a falta de projeções dopaminérgicas da SNpc, aumentando assim desinibição da via indireta sob o NST, inibindo o tálamo e consequentemente o movimento (Figura 1B). As discinesias, por sua vez, aparecem como resultado de uma hiperativação da via direta pelos receptores dopaminérgicos D1R, desinibindo o tálamo e resultando em movimentos involuntários (Figura 1C).

1.3 Indução de discinesia

As discinesias podem ser induzidas através da administração de várias classes de drogas, de antagonistas dopaminérgicos, como o haloperidol, de depletors de dopamina, como a reserpina, de colinomiméticos e de agentes anticolinesterásicos, como a pilocarpina e a tacrina, respectivamente (Steinpreis e Salamone, 1993; Mayorga *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2010). De grande importância, ainda, o uso crônico do L-DOPA, o principal fármaco usado para aliviar os sintomas motores em pacientes com a DP, pode induzir essas flutuações motoras, mais conhecidas atualmente como discinesias induzida por L-DOPA, do

inglês *L-DOPA-Induced Dyskinesias* (LID). (Bhide *et al.*, 2013). Por essa limitação no tratamento com a L-DOPA é interessante investigar, não só opções terapêuticas para a DP, como drogas que diminuem as discinesias para serem usadas concomitantes à L-DOPA, a fim de prolongar seu uso.

Para este estudo, foi escolhido a reserpina como modelo de indução de discinesias e outros déficits relacionados a DP, por conta de ser um protocolo agudo de alta reprodutibilidade, de baixa toxicidade aos envolvidos além de constituir um modelo que abrange importantes características da patofisiologia da DP.

A reserpina é um alcalóide isolado das raízes da planta *Rauwolfia serpentina* e atua como inibidor do transportador vesicular de monoaminas -dopamina, noradrenalina, adrenalina e serotonina - (VMAT-2) no sistema nervoso central (Figura 2). Ela foi utilizada inicialmente como uma potente droga anti-hipertensiva, devido a sua capacidade em depletar o conteúdo monoaminérgico (Freis e Ari, 1954; Mcqueen, Doyle e Smirk, 1954). Seu uso clínico para esse fim levou a observações de letargia, depressão e discinesias em pacientes que a utilizavam cronicamente, demonstrando, assim, o papel do sistema monoaminérgico em distúrbios afetivos e motores (Freis, 1954; Kane e Smith, 1982). Após essa constatação ela foi rapidamente introduzida como um modelo animal para mimetizar os efeitos motores e não-motores da DP. A alta afinidade da reserpina pelo VMAT-2 impede a ligação das monoaminas ao sítio de interação com este transportador, inibindo o seu armazenamento vesicular e impossibilitando a liberação dessas moléculas na fenda sináptica através do processo de exocitose. Por conta desse mecanismo, a reserpina leva à depleção destes neurotransmissores nos terminais nervosos e, como consequência, induz hipolocomoção, rigidez muscular transitória e movimentos involuntários, sendo estas respostas dependentes da dose e tempo de tratamentos utilizados (Gerlach e Riederer, 1996; Dawson *et al.*, 2000). Atualmente, a reserpina não é mais utilizada clinicamente devido aos seus efeitos colaterais.

De acordo com a literatura, o estresse oxidativo está envolvido na patofisiologia das discinesias orofaciais (Abílio *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2005; Leão *et al.*, 2015). Na depleção de monoaminas pelo tratamento com reserpina há aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (Spina e Cohen, 1989).

Nesse sentido, sabe-se que o próprio metabolismo das catecolaminas resulta na formação de EROs, sendo aumentado pelo

tratamento com a reserpina, com a presença de mais catecolaminas livres no citoplasma. Assim, o estresse oxidativo se soma à depleção de monoaminas prejudicando o desempenho motor.

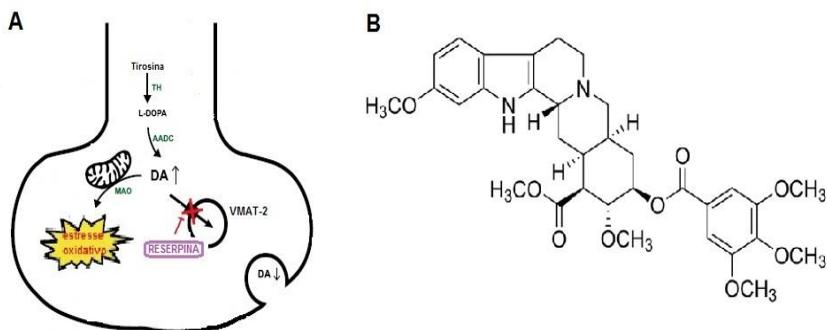


Figura 2 – Mecanismo de ação da reserpina em neurônios dopaminérgicos. **A.** A depleção de dopamina resulta do efeito inibitório da reserpina no transportador vesicular. Sem o armazenamento da dopamina, sua metabolização no citoplasma é aumentada, gerando EROs e quinonas reativas, e assim, resultando em estresse oxidativo **B.** Molécula da reserpina. TH, tirosina hidroxilase; AADC, L-aminoácidos aromáticos descarboxilase; DA, dopamina; MAO, monoamina oxidase; VMAT-2, transportador vesicular de monoaminas 2.

A relação entre a reserpina e a DP foi primeiramente elucidada em 1957 por Carlsson e colaboradores, relatando que o estado acinético (ou seja, ausência de movimento) induzido pela reserpina em roedores, era aliviado pela L-DOPA. Em doses que variam de 1 a 10 mg/kg, a reserpina é capaz de induzir distúrbios motores que remetem a DP, como acinesia, hipocinesia, catalepsia, rigidez dos membros e discinesias orofaciais (Colpaert, 1987; Baskin e Salamone, 1993; Salamone e Baskin, 1996). Além dos déficits motores, a reserpina também é capaz de produzir comportamentos de aversão, tipo-depressivo e tipo-anedônico, e déficits de memória (Silva *et al.*, 2002; Skalisz *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2008).

A administração aguda desta droga, além de mimetizar padrões bioquímicos da DP (depleção de dopamina, estresse oxidativo, déficit na captação de glutamato), induz um comportamento chamado de ‘*tremulous jaw movements*’ (TJM) – movimentos de tremores de mandíbula, na tradução literal - (Steinpreis e Salamone, 1993). Os TJMs

são caracterizados como movimentos produzidos por uma deflexão vertical rápida do maxilar inferior que se assemelha à mastigação, porém não é uma resposta a nenhum estímulo específico (Salamone *et al.*, 1998). Consideráveis evidências apontam que esses movimentos, induzidos pela reserpina, compartilham diversas características com os tremores observados em pacientes acometidos pela DP. Salamone e Baskin (1996) demonstraram, ao analisar a inter-resposta dos movimentos (ou seja, o tempo entre cada movimento do maxilar), que o tratamento com reserpina gerava tremores com os picos de frequência entre 3-7 Hz, semelhante à frequência dos tremores registrados na DP. Por conta dessa semelhança entre os tremores, este modelo é considerado de extrema importância para estudar esse distúrbio motor relacionado à DP (Salamone *et al.*, 1998).

A reserpina mimetiza as principais características sintomatológicas, neuroquímicas e farmacológicas da DP. Assim, o modelo da indução de discinesias pela reserpina tem sido utilizado amplamente na literatura para a investigação de novos alvos terapêuticos e agentes antidiscinéticos (Abílio *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2003; Naidu, Singh e Kulkarni, 2006; Pereira *et al.*, 2011).

1.4 Transmissão purinérgica

As purinas são moléculas derivadas das bases nitrogenadas adenina e guanina. Além das bases adenina e guanina, elas abrangem seus nucleosídeos correspondentes, tais como adenosina e guanosina e os seus produtos metabólicos, como a inosina, a hipoxantina, xantina e o ácido úrico, bem como nucleotídeos tais como adenosina-5'-trifosfato (ATP), adenosina-5'-difosfato (ADP), adenosina-5'-monofosfato (AMP), guanosina-5'-trifosfato (GTP), guanosina-5'-difosfato (GDP) e guanosina-5'-monofosfato (GMP). São moléculas amplamente encontradas dentro das células de animais e plantas. Os nucleotídeos purínicos intracelulares foram identificados primeiramente como componentes estruturais dos ácidos nucleicos, mas também apresentam funções importantes no metabolismo energético, na biossíntese de macromoléculas e na constituição de coenzimas. Além disso, os nucleotídeos cíclicos desempenham papéis como segundos-mensageiros (Lippman, 1941).

As purinas também apresentam efeitos extracelulares e no cérebro já foram evidenciadas por ter ação como neurotransmissores e neuromoduladores. Os efeitos extracelulares das purinas derivadas da adenina são mediados pelos receptores purinérgicos do tipo P1 ou P2.

Os receptores pertencentes à família P2 são receptores de ATP e ADP, e são subdivididos em P2X (receptores ionotrópicos) e P2Y (receptores metabotrópicos acoplados às proteínas G)(Burnstock, 2007).

Os receptores da família P1 são receptores metabotrópicos para adenosina, e são divididos em quatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Fredholm *et al.*, 2005). Os receptores A₁ são acoplados à proteína Gi levando a uma diminuição da atividade da adenilato ciclase e consequente diminuição nos níveis de AMP cíclico intracelular e são expressos em todo o Sistema Nervoso Central (SNC), com grande densidade no estriado, hipocampo, córtex cerebral e tálamo, enquanto que os receptores A_{2A} são acoplados à proteína Gs, levando ao aumento dos níveis de AMP cíclico. São principalmente expressos no estriado, núcleo accumbens, hipocampo e córtex cerebral. Os receptores A_{2B} também são acoplados à proteína Gs, mas são pouco expressos no encéfalo, enquanto os receptores A₃ são moderadamente expressos no cerebelo e hipocampo (Palmer e Stiles, 1995; Burnstock, 2007).

Dos receptores de adenosina conhecidos, os receptores A₁ e A_{2A} são os principais responsáveis pelos efeitos centrais da adenosina (Dunwiddie e Masino, 2001). A estimulação do A₁R pré-sináptico diminui a excitabilidade neuronal e a atividade sináptica, além de diminuir a probabilidade de liberação de neurotransmissores como o glutamato, dopamina, serotonina, noradrenalina e acetilcolina. Por outro lado, o A_{2A}R é um receptor excitatório e está expresso principalmente em regiões dopaminérgicas.

Alguns estudos prévios demonstraram evidências de uma interação antagonica entre os dois receptores, ao modular a liberação de glutamato no estriado e hipocampo (O'kane e Stone, 1998; Lopes *et al.*, 2002; Quarta *et al.*, 2004). Os receptores de adenosina podem formar oligômeros entre si e com receptores para outros neurotransmissores, como receptores de dopamina (Agnati *et al.*, 2005; Ciruela *et al.*, 2006; Fuxe *et al.*, 2013). Os oligômeros com os receptores de dopamina ocorrem no estriado, onde estes receptores são amplamente expressos. Os receptores A₁ e A_{2A} modulam de forma antagonica a união dos ligantes, as características transduccionais e funcionais dos receptores dopaminérgicos D1R e D2R, respectivamente (Ferré *et al.*, 1992; Ferre *et al.*, 1996). Os receptores A_{2A}R estão colocalizados com os receptores D2R nos neurônios GABAérgico da via indireta enquanto os A₁R e o receptor D1R são colocalizados nos neurônios GABAérgicos da via direta (Ferre *et al.*, 1996).

Sobre as purinas derivadas da guanina, muita atenção tem sido dada ao efeito biológico da guanosina. Ainda que não tenha sido completamente caracterizado um possível receptor específico para a guanosina, são notáveis as evidências que demonstram os efeitos neuroprotetores dessa molécula.

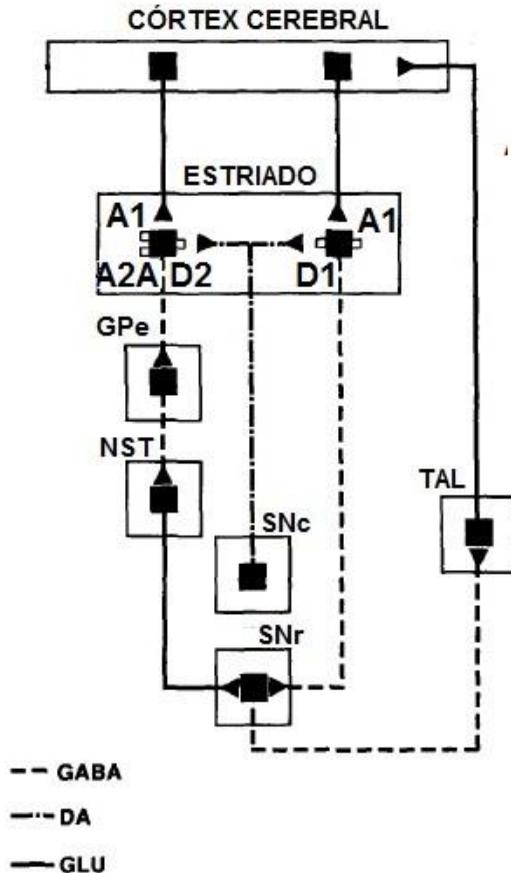


Figura 3 – Co-localização dos receptores adenosinérgicos e dopaminérgicos na circuitaria motora. Gpe, globo pálido externo; NST, núcleo subtálamico; SNr, substancia negra parte reticulada; SNc substância negra parte compacta; TAL, tálamo; D1, receptor de dopamina D1R; D2, receptor de dopamina D2R; A₁, receptor de

adenosina A₁; A_{2A}, receptor de adenosina A_{2A}; DA, dopamina; GLU, glutamato. Adaptado de (Popoli *et al.*, 1996).

1.5 Guanosina

Diversos estudos vêm descrevendo efeitos da guanosina em modelos de neurotoxicidade e de doenças neurológicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Estudos *in vivo*, demonstram que a guanosina pode exercer efeitos anti-convulsivante, antioncieptivo, ansiolítico e antidepressivo (Lara *et al.*, 2001; Bettio *et al.*, 2012; Bettio *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2016). Estudos *in vitro*, demonstram que a guanosina aumenta a captação de glutamato e diminui o quadro de estresse oxidativo reduzindo os níveis de EROs (Frizzo *et al.*, 2002; Tarozzi *et al.*, 2010; Dal-Cim *et al.*, 2012). Uma ampla revisão dos efeitos da guanosina no sistema nervoso foi recentemente publicada (Lanznaster *et al.*, 2016).

A guanosina não demonstra apresentar toxicidade às células neurais mesmo quando em altas concentrações (10mM) (Molz, Dal-Cim e Tasca, 2009). Além disso, a guanosina apresenta efeitos antiinflamatórios, exercidos pela inibição da expressão do fator nuclear kappa B (NFκ-B) e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Dal-Cim *et al.*, 2013).

Mesmo com crescentes evidências dos efeitos neuroprotetores da guanosina, seus mecanismos de ação ainda não estão totalmente compreendidos. Contudo, já foi demonstrado o efeito da guanosina na modulação de vias metabólicas como das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (Tarozzi *et al.*, 2010; Molz *et al.*, 2011; Dal-Cim *et al.*, 2012).

Em cultura de neuroblastoma SH-SY5Y, demonstrou-se que o efeito da guanosina frente ao estresse oxidativo mitocondrial é dependente da ativação dos receptores purinérgicos A₁ e A_{2A}R, uma vez que os antagonistas destes receptores, DPCPX (8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina) e ZM241385, respectivamente, aboliram o efeito protetor observado (Dal-Cim *et al.*, 2012). Em estudo avaliando o efeito neuroprotetor da guanosina em fatias hipocámpais submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO), foi observado que o bloqueio de A₁R com o antagonista DPCPX reverteu o efeito da guanosina em diminuir a produção de EROs e manter o potencial de membrana mitocondrial, porém não teve efeito sobre a captação de glutamato recuperada pela guanosina. Dados indicam que os efeitos

neuroprotetores da guanosina frente ao dano causado pela PGO acontecem por modulação de receptores de adenosina, sugerindo que a interação com esse receptor possa estar envolvida no mecanismo protetor da guanosina (Dal-Cim *et al.*, 2013).

Estudos utilizando modelos animais que mimetizam tremores relacionados à DP demonstram que a utilização farmacológica de antagonistas de receptores de adenosina provocam melhoras nesse aspecto motor (Salamone *et al.*, 2013; Gandía *et al.*, 2015).

Poucos estudos relatam uma relação de neuroproteção da guanosina frente a modelos de Parkinson. Giuliani e colaboradores (2015) mostraram um efeito neuroprotetor da guanosina, *in vitro*, frente à toxicidade induzida pela 6-OHDA. Porém, os exatos mecanismos envolvidos ainda não foram evidenciados. Além disso, dados preliminares de colaboradores mostram um efeito da guanosina na atenuação das discinesias provocadas pela L-DOPA em animais pré-tratados com 6-OHDA (Ciruela *et al.*, comunicação pessoal). Entretanto, dados sobre um efeito neuroprotetor a guanosina frente a modelos da DP ainda são escassos. Assim sendo, visto que a guanosina já demonstrou forte potencial neuroprotetor contra danos que estão bem caracterizados na DP, é de grande importância o estudo dos efeitos desta molécula em modelos de discinesias associados à DP.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito neuroprotetor do tratamento agudo com guanosina frente aos sintomas de parkinsonismo induzidos pela administração de reserpina em camundongos. Também avaliar os mecanismos envolvidos no potencial efeito neuroprotetor e antidiscinético da guanosina.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar as alterações motoras decorrentes da administração aguda da reserpina;
2. Avaliar o efeito da guanosina nas alterações motoras e comportamentais frente ao tratamento com reserpina;
3. Avaliar o envolvimento do receptor A₁ de adenosina no efeito antidiscinético da guanosina.
4. Avaliar o mecanismo de ação da guanosina no tratamento com reserpina, mensurando alterações na permeabilidade da membrana celular, produção de espécies reativas de oxigênio, e mudanças no potencial de membrana mitocondrial;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos (90 à 120 dias de idade), mantidos em temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ em um ciclo de 12 horas claro (a partir das 7 horas) e 12 horas escuro, em caixas plásticas (10 animais por caixa) com água e ração disponíveis. Os nossos protocolos para experimentos com animais foram projetados de maneira que o animal teve o mínimo de sofrimento possível e com limite de animais sacrificados (conforme protocolo CEUA/UFSC - PP000955).

3.2 Administração de reserpina

Para o protocolo de indução de sintomas da doença de Parkinson em camundongos foram administradas duas injeções subcutâneas (s.c.) de reserpina (Sigma) (1,0 mg/kg), com um intervalo de 48 h entre as injeções (Figura 4).

3.3 Tratamento por via oral da guanosina

Os animais receberam uma única administração de guanosina (Sigma) (3; 5; 7,5 e 10 mg/kg) por via oral (v.o.) 24 h após a última administração de reserpina, e, após um período de 20 minutos, foram submetidos a avaliação comportamental ou bioquímica.

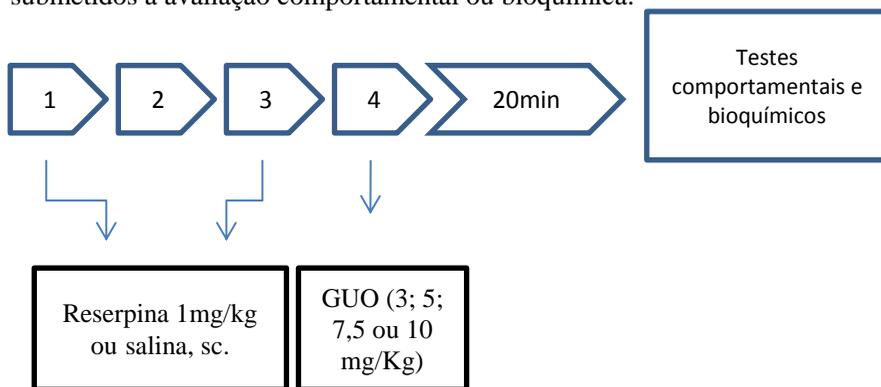


Figura 4. Desenho esquemático do tratamento com reserpina e guanosina.

3.4 Avaliação da participação do receptores A_1 de adenosina

Para analisar ser o envolvimento dos receptores A_1 de adenosina na atividade protetora da GUO frente ao dano causado pela reserpina, foi realizada uma injeção intraperitoneal (i.p.) de DPCPX (0,75 mg/kg), um antagonista seletivo de A_1R , 30 minutos antes da administração de GUO (dose baseada em estudos prévios) (Collins *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2010).

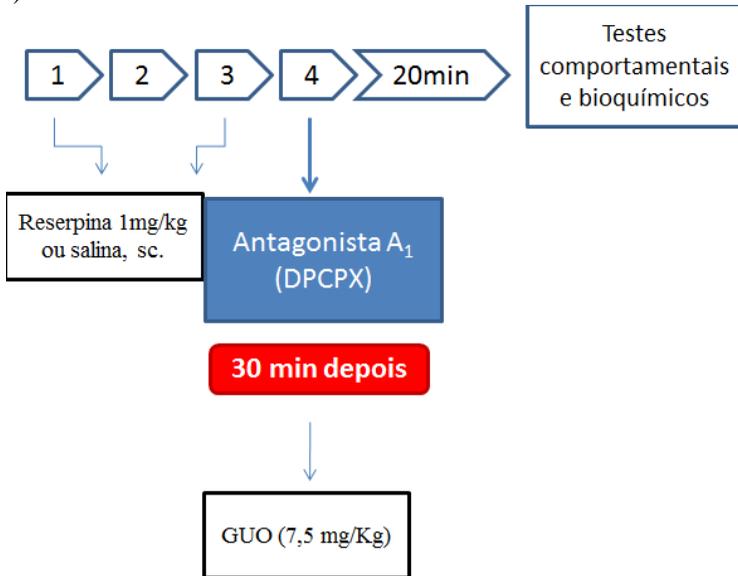


Figura 5. Desenho esquemático do tratamento com reserpina, guanosina e o DPCPX.

3.5 Avaliação comportamental

3.5.1 Avaliação da frequência dos “*Tremulous Jaw Movements*” (TJM)

A frequência de TJM consiste em uma contagem manual por 10 minutos contínuos do movimento caracterizado como uma abertura vertical do maxilar inferior, sem relação a um estímulo específico (Salamone *et al.*, 1998). A observação foi feita 24 h após a última injeção de reserpina e 20 minutos após a administração de guanosina. A observação foi feita em um recipiente de vidro sobre um espelho, permitindo a total visualização do animal pelo observador.

3.5.2 Catalepsia

O comportamento de catalepsia foi analisado pelo teste da barra, que consiste em posicionar o animal com as patas dianteiras sobre uma barra situada 4 cm acima da superfície. A duração da catalepsia, que é definida como uma postura imóvel do animal, foi medida através do tempo (em segundos) que o animal manteve as duas patas dianteiras na barra (Figura 5). O tempo foi contado até o animal remover as duas patas da barra, com tempo limite de 180 segundos. Foram realizadas três sessões para cada animal e os resultados foram analisados considerando a média das três sessões, como descrito por Santos et al. (2013).



Figura 6. Teste da barra para avaliação da catalepsia.

3.6 Parâmetros bioquímicos

3.6.1 Preparação de fatias

Após os tratamentos os animais foram sacrificados por decapitação e os hipocampus, córtex e estriado foram rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando um fatiador de tecidos McIlwain e foram pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37 °C (Oliveira et al., 2002).

3.6.2 Ensaio de dano celular

O dano celular foi medido utilizando a incorporação do iodeto de propídeo (IP), uma sonda fluorescente que, por ser polar, só entra em células em via de morte ou com membrana danificada. Uma vez dentro da célula, a IP se liga ao DNA e emite fluorescência vermelha (630 nm) quando excitado por luz verde (495 nm). As fatias foram incubadas com 7 µg/ml de IP por 30 minutos a 37 °C, depois lavadas com KRB para análise através da leitura na Multileitora Infinite M200 (Tecan) (Piermartiri *et al.*, 2009).

3.6.3 Medida da produção de EROs

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi utilizada a sonda molecular H₂DCFDA (Há *et al.*, 1997), que atravessa a membrana celular e é hidrolisada por esterases para a forma não-fluorescente diclorofluoresceína (DCFH). A DCFH reage com espécies reativas intracelular formando diclorofluoresceína (DCF), um corante que emite uma fluorescência verde. As fatias foram expostas à H₂DCFDA 80 µM durante 30 minutos em KRB. Em seguida as fatias foram lavadas duas vezes com KRB. A análise da produção de EROs foi feita através da leitura na Multileitora Infinite M200 (Tecan), com excitação de 585 nm e emissão de 520 nm.

3.6.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial, as fatias foram incubadas com 100 nM de tetrametilrodamina etil éster (TMRE) por 15 minutos a 37° C em tampão Krebs-Ringer. A fluorescência foi mensurada Multileitora Infinite M200 (Tecan), no comprimento de onda de 550nm para excitação e 590nm para emissão (Egea *et al.*, 2007).

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da análise de variância de uma ou duas via (ANOVA), seguida do teste de Tukey ou através do test t de student, dependendo da situação. Os dados foram expressos como a média e erro padrão e os experimentos foram realizados em triplicatas. Foram considerados significativos valores com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito antidiscinético da guanosina em camundongos tratados com reserpina

Para avaliar o efeito da guanosina frente a discinesia induzida por reserpina, os animais foram tratados com reserpina (1 mg/kg, s.c.), conforme descrito nos procedimentos experimentais, e como previamente relatado, a reserpina induziu discinesias orofaciais (Salamone e Baskin, 1996). O tratamento com doses crescente de guanosina (3 – 10 mg/kg, v.o.) foi realizado 20 minutos antes do teste comportamental.

A Figura 6A mostra o efeito agudo das diferentes doses de guanosina sobre a frequência de TJM em camundongos tratados com reserpina [$F_{(5,28)} = 11,53$, $p < 0,0001$]. O aumento de aproximadamente 40% do número de TJM em relação ao grupo controle, pela reserpina, foi revertido pela dose de 7,5 mg/kg (v.o.) de guanosina, evidenciando, nessa dose, um efeito antidiscinético. A guanosina nas doses de 3, 5 e 10 mg/kg, não apresentou efeito antidiscinético. Como observado na Figura 6B nenhuma dose de guanosina induziu *per se* um aumento no número de TJM em animais que não foram injetados com reserpina. Com a confirmação do efeito antidiscinético na dose de 7,5 mg/kg, esta foi a dose escolhida para os testes posteriores.

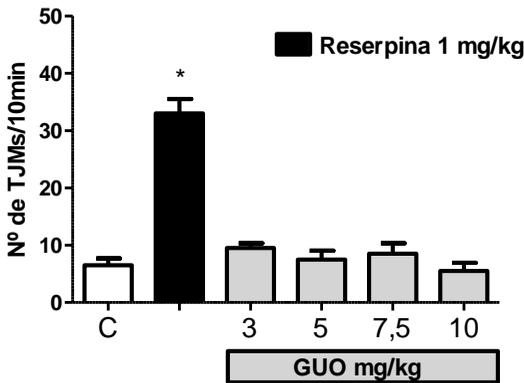
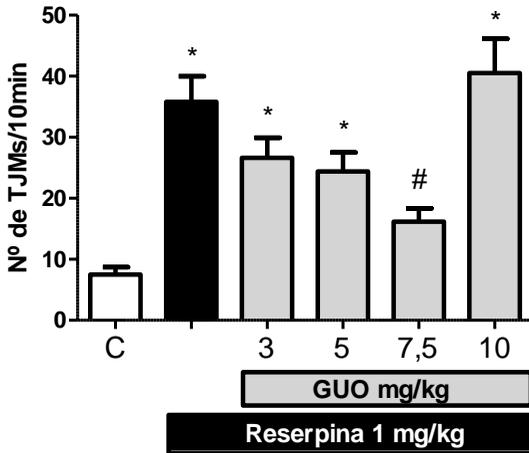


Figura 7: Efeito antidiscinético da guanósina em camundongos tratados com reserpina. (A) Efeito do tratamento agudo com guanósina (3 - 10 mg/kg, v.o.) na discinesia orofacial induzida pela reserpina (1 mg/kg, s.c.), avaliada através do número de TJM por 10 min, n=6. (B) Efeito do tratamento agudo com guanósina (3 - 10 mg/kg) em camundongos sobre o número de TJM/10 min, n=6. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. *p < 0,05 comparado com o grupo controle, # P \leq 0,05 comparado com o grupo reserpina; ANOVA de uma via, seguido do teste *post-hoc* de Tukey.

4.2 Envolvimento do receptor A₁ no efeito antidiscinético da guanosina em camundongos tratados com reserpina

Uma vez evidenciado o efeito antidiscinético da guanosina - na dose de 7,5 mg/kg - foi avaliado se esse efeito poderia envolver a ativação dos receptores adenosinérgicos do subtipo A₁(A₁R). Para isso os animais foram tratados 30 minutos antes do tratamento com guanosina com um antagonista de A₁R, o DPCPX (0,75 mg/kg, i.p.). Na Figura 7 observa-se que o DPCPX *per se* não induz aumento dos TJM e não é capaz de reverter o efeito discinético dos animais tratados com reserpina. O tratamento com DPCPX antes da administração da guanosina bloqueia o seu efeito antidiscinético, revelando um papel importante do A₁R no efeito antidiscinético da guanosina.

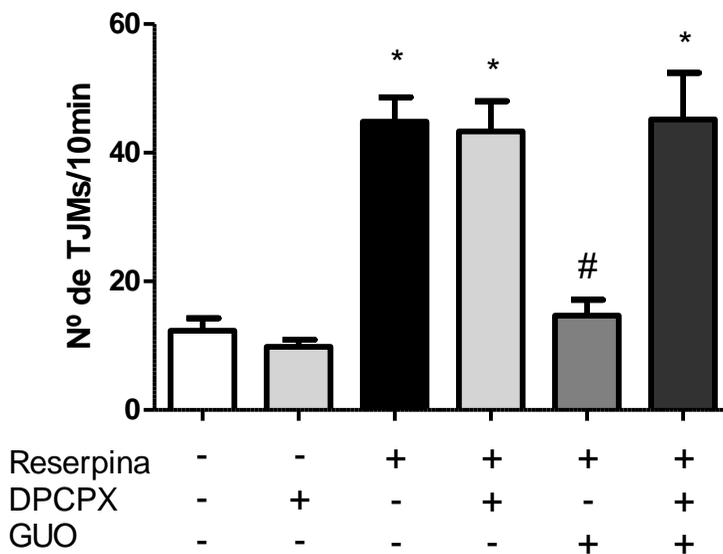


Figura 8: Envolvimento do receptor A₁ no efeito antidiscinético da guanosina em camundongos tratados com reserpina. Os camundongos foram tratados com antagonista do receptor A₁ DPCPX (0,75 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes do tratamento com guanosina (7,5 mg/kg, v.o.). A avaliação na discinesia orofacial induzida pela reserpina (1 mg/kg, s.c.), foi feita através do número de TJM por 10 min, n=6. As barras verticais representam a média \pm erro padrão *p < 0,05 comparado

com o grupo controle, # $p < 0,05$ comparado com o grupo reserpina; ANOVA de uma via, seguido do teste *post-hoc* de Tukey.

4.3 Efeito da guanosina em camundongos tratados com reserpina no teste da catalepsia

A catalepsia tem sido tradicionalmente usada como um modelo de bradiscinesia e acinesia, ou seja, um teste para medir a demora à resposta motora, sendo normalmente induzida por antagonistas de receptores de dopamina do tipo D2 (De Ryck, Schallert e Teitelbaum, 1980; Wolgin, 1985; Fischer, Ferger e Kuschinsky, 2002; Trevitt *et al.*, 2009). Pelo teste da barra foi demonstrado que o tratamento com reserpina induz um estado cataléptico [$F_{(3,12)} = 10,49$ $p = 0,007$]. A Figura 8A evidencia um aumento do tempo de catalepsia pela reserpina e uma reversão desse aumento após tratamento com guanosina [$F(3,12) = 8,50$ $p = 0,12$]. Quando avaliado a participação do A1R, constatou-se que o antagonismo deste receptor pelo DPCPX também foi efetivo em diminuir o tempo da catalepsia. Quando o antagonista de A1R foi administrado previamente à guanosina, o efeito sobre o teste de catalepsia não é mais observado, evidenciando a participação dos A1R no efeito da guanosina (Figura 8B).

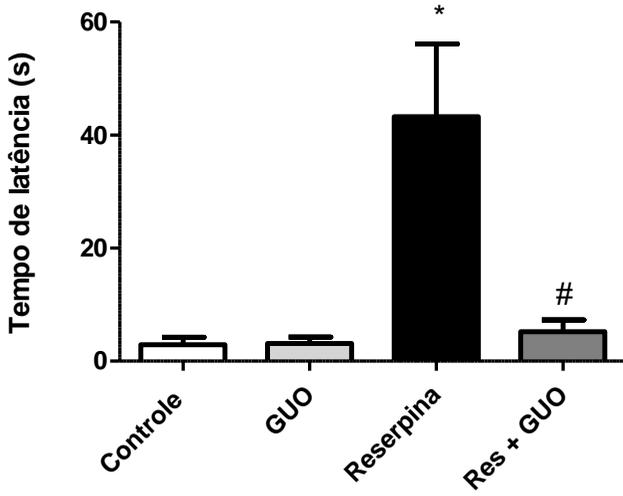
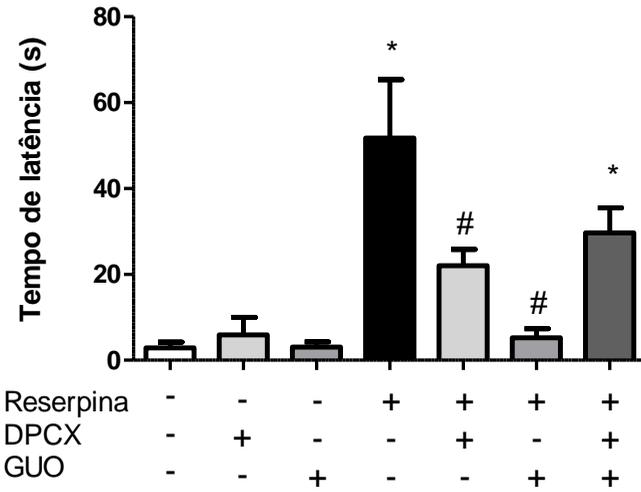
A**B**

Figura 9: Efeito da guanosina em camundongos tratados com reserpina no teste da catalepsia. (A) Efeito do tratamento agudo com guanosina (7,5 mg/kg, v.o.) na catalepsia induzida pela reserpina (1 mg/kg, s.c.), avaliada através do teste da barra, n=4. (B) Envolvimento do A₁R no efeito do tratamento agudo com guanosina no teste da catalepsia, n=4. As barras verticais representam a média ± E.P.M. *p < 0,05 comparado com o grupo controle, # p < 0,05 comparado com o grupo reserpina; ANOVA de duas vias (A) ou ANOVA de uma via (B), seguido do teste *post-hoc* de Tukey.

4.4 Efeito do tratamento com reserpina sobre o dano celular em fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado

Considerando a toxicidade exercida pela reserpina, foram utilizados protocolos *ex vivo* para estudar os possíveis efeitos nocivos da reserpina ao tecido neural. Ainda não há indícios claros se a administração de reserpina leva à degeneração celular (Leão *et al.*, 2015). Desta forma, inicialmente, foi utilizada a sonda fluorescente iodeto de propídeo (IP) que pode ser considerada como um marcador de permeabilização da membrana e em alguns casos, de morte celular, já que a morte necrótica envolve alteração na permeabilidade de membrana (Boeck *et al.*, 2004).

Vinte e quatro horas após a última administração de reserpina foram obtidas fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado destes animais e estas foram incubadas com a sonda IP para avaliação de comprometimento da permeabilidade de membrana, como um possível indicativo de morte celular.

No córtex cerebral (Figura 9A) e no hipocampo (Figura 9B) não houve aumento significativo da incorporação de IP. Diferentemente, no estriado (Figura 9C) foi constatado um aumento significativo de incorporação da sonda, indicando comprometimento das células deste tecido.

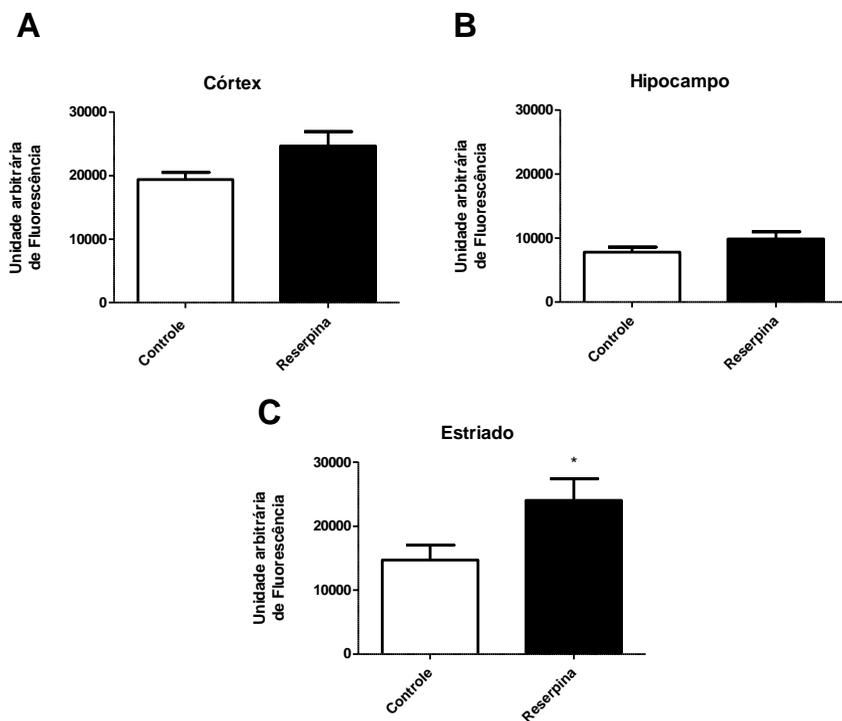


Figura 10: Avaliação do dano celular em fatias de córtex, hipocampo e estriado de camundongos tratados com reserpina. 24 h após a última injeção de reserpina (1 mg/kg, s.c.), os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais dissecadas e fatiadas. As fatias foram incubadas com a sonda IP (7 µg/ml) por 30 minutos a 37 °C e a sua incorporação foi medida a 630 nm e 495nm, emissão e excitação, respectivamente, n=6. As barras verticais representam a média \pm erro padrão *p < 0,05 comparado com o grupo controle; Teste t de Student.

4.5 Efeito do tratamento com reserpina sobre a produção de EROs em fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado

A administração de reserpina provoca um quadro de estresse oxidativo, estando este diretamente ligado à indução das discinesias (Abílio *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2008). Tendo isso em vista, o aumento de EROS foi avaliado no protocolo *ex vivo* através da sonda H₂DCFDA. Na Figura 10A e 10B observa-se que a administração da

reserpina não induziu aumento de EROs no córtex cerebral e hipocampo. No entanto, no estriado constata-se que o tratamento com reserpina provocou um aumento de cerca de 40% na produção de EROs (Figura 10C). Estes resultados estão de acordo com dados já existentes e consolidam este protocolo como um bom modelo de discinesias associadas à DP.

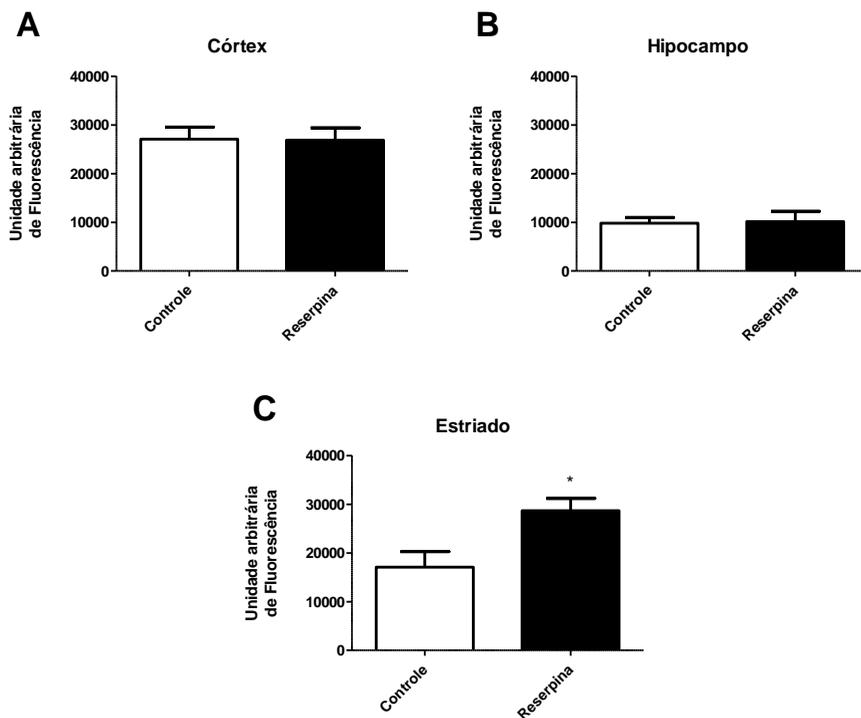


Figura 11: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio com a sonda H₂DCFDA em fatias de córtex, hipocampo e estriado de camundongos tratados com reserpina. 24 h após a última injeção de reserpina (1 mg/kg, s.c.), os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais dissecadas e fatiadas. As fatias foram incubadas com a sonda H₂DCFDA (80 μM) por 30 minutos a 37 °C e foi mensurada a fluorescência referente a uma excitação a 485 nm e emissão a 520 nm, n=6. As barras verticais representam a média ± erro padrão *p < 0,05 comparado com o grupo controle; Teste t de Student.

4.6 Efeito do tratamento com reserpina sobre o potencial de membrana mitocondrial em fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado

A vulnerabilidade dos neurônios à disfunção mitocondrial pode ser atrelada a sua grande ativação metabólica e requerimento energético, especialmente para manter o gradiente iônico transmembrana e para a manutenção da neurotransmissão (Nicholls e Budd, 2000). A disfunção mitocondrial representa um papel crucial na DP, principalmente gerando espécies reativas de oxigênio resultantes de estresse oxidativo (Abou-Sleiman, Muqit e Wood, 2006; Johri e Beal, 2012).

Após o tratamento *in vivo* com a reserpina foi avaliado a disfunção mitocondrial representada pela perda do seu potencial de membrana. As fatias de córtex cerebral, hipocampo e estriado foram incubadas com a sonda TMRE, um fluoróforo catiônico que é utilizado para avaliar o potencial de membrana mitocondrial. A Figura 11 demonstra que a reserpina não alterou o potencial de membrana mitocondrial nas fatias cerebrais em nenhuma das estruturas analisadas.

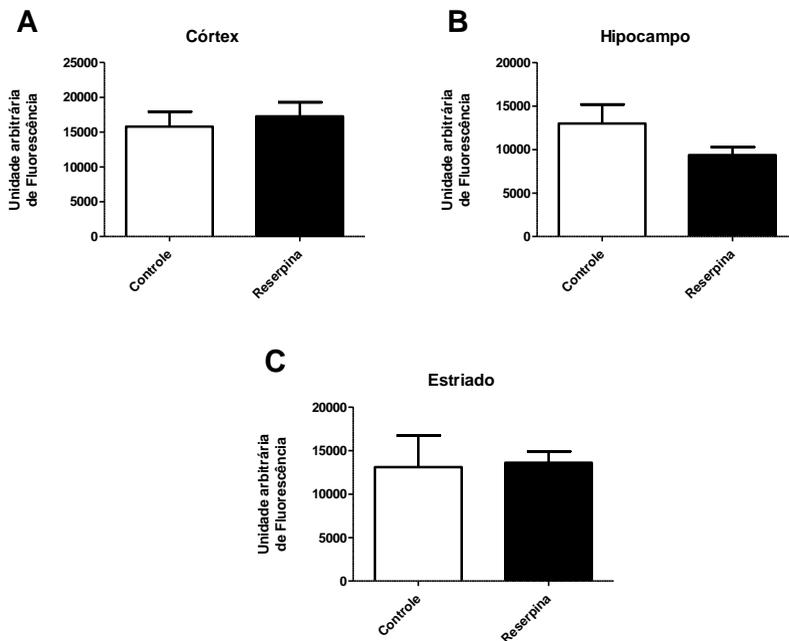


Figura 12: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial com a sonda TMRE em fatias de córtex, hipocampo e estriado de camundongos tratados com reserpina. 24 h após a última injeção de reserpina (1 mg/kg, s.c.), os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais dissecadas e fatiadas. As fatias foram incubadas com a sonda TMRE (100 nM) por 30 minutos a 37 °C e foi mensurada a fluorescência referente a um comprimento de onda de 550nm para excitação e 590nm para emissão, n=6. As barras verticais representam a média \pm erro padrão. Teste t de Student.

4.7 Avaliação do efeito da guanosina na morte celular em fatias de estriado de camundongos tratados com reserpina.

Como constatado, esse modelo com a reserpina induz um aumento da incorporação da sonda de IP, indicando ocorrer dano celular ou, ao menos, perda da permeabilidade da membrana plasmática. A fim de investigar se a guanosina é capaz de reverter esse dano celular, foi utilizado o mesmo protocolo *ex vivo* sendo administrado guanosina 20 minutos antes da decapitação dos animais. A Figura 12 mostra que o

tratamento agudo com guanosina não reverte o dano celular provocado pela reserpina, quando o protocolo de incubação com a sonda IP é utilizado [$F_{(3,20)} = 0,01$ $p < 0,001$].

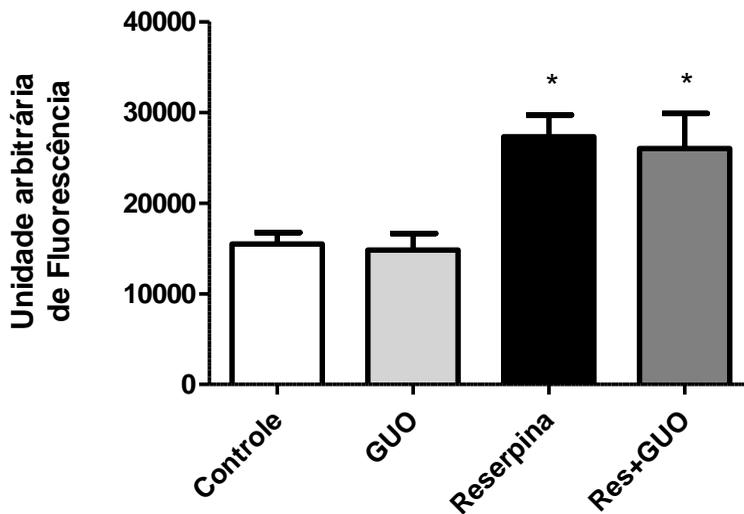


Figura 13: Avaliação do efeito agudo da guanosina na morte celular em fatias de estriado de camundongos tratados com reserpina. 24 h após a última injeção de reserpina (1 mg/kg, s.c.) e 20 minutos depois do tratamento com guanosina (7,5 mg/kg), os animais foram decapitados e o estriado dissecado e fatiado. As fatias foram incubadas com a sonda IP (7 µg/ml) por 30 minutos a 37 °C e a sua incorporação foi medida a 630 nm e 495nm, emissão e excitação, respectivamente, n=6. As barras verticais representam a média ± erro padrão * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; ANOVA de duas vias, seguido do teste *post-hoc* de Tukey.

4.8 Avaliação do efeito da guanosina na produção de EROs em fatias de estriado de camundongos tratados com reserpina.

Após verificar que o tratamento com reserpina provocou um aumento da produção de EROs no estriado foi investigado, então, se a guanosina teria efeito sobre este aumento. Para isso, seguindo o mesmo protocolo *ex vivo*, sendo a guanosina administrada 20 minutos antes da decapitação dos animais. A Figura 13 mostra que o tratamento agudo da

guanosina eficientemente alterou o quadro de estresse oxidativo provocado pela reserpina, voltando aos níveis de EROs aos níveis do controle [$F_{(3,16)} = 8,64$ $p = 0,009$].

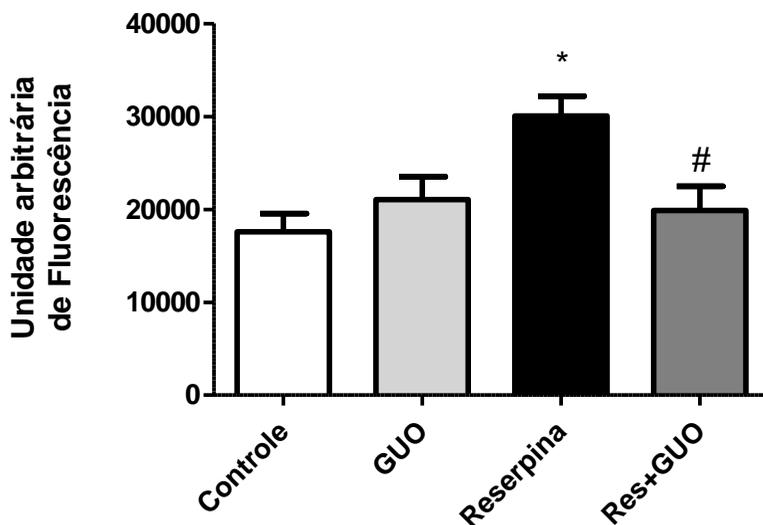


Figura 14: Avaliação do efeito agudo da guanosina produção de EROs fatias de estriado de camundongos tratados com reserpina. 24 h após a última injeção de reserpina (1 mg/kg, s.c.) e 20 minutos depois do tratamento com guanosina (7,5 mg/kg), os animais foram decapitados e o estriado dissecado e fatiado. As fatias foram incubadas com a sonda H_2DCFDA (80 μM) por 30 minutos a 37 °C e foi mensurada a fluorescência referente a uma excitação a 485 nm e emissão a 520 nm, $n=5$. As barras verticais representam a média \pm erro padrão * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle; ANOVA de duas vias, seguido do teste *post-hoc* de Tukey.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo comprovaram que a reserpina induz um aumento na frequência de TJM, corroborando, que a administração da reserpina funciona como um modelo para avaliar discinesias em roedores, conforme também demonstrado em estudos anteriores (Steinpreis e Salamone, 1993; Salamone e Baskin, 1996; Abílio *et al.*, 2003). Ainda sobre esse modelo, Salamone e colaboradores (1998) defendem que as discinesias induzidas pela reserpina compartilham características com os tremores acometidos em pacientes com DP. Além da indução destes movimentos involuntários, a administração da reserpina também produz hipolocomoção e rigidez muscular transitória, em vista disso, a utilização deste alcalóide é considerado como um modelo adequado para estudar os prejuízos motores associados à DP (Colpaert, 1987; Gerlach e Riederer, 1996; Leão *et al.*, 2015).

Os dados deste estudo indicam, pela primeira vez, um efeito antidiscinético da guanosina em camundongos, excluindo um efeito *per se* desta droga sobre a frequência de TJM. Como demonstrado, a guanosina (7,5 mg/kg v.o.) administrada agudamente foi capaz de reverter o aumento de TJM induzidos pelo tratamento com reserpina (1 mg/kg, s.c.). Foi demonstrado, também, que esse efeito da guanosina é abolido quando precedido pela administração do DPCPX (0,75 mg/kg i.p.), um antagonista do receptor de adenosina do sub-tipo A₁, sugerindo o envolvimento de receptores de adenosina no efeito antidiscinético da guanosina.

Os efeitos extracelulares da guanosina parecem ser dependentes da modulação da transmissão purinérgica. Dados mostram que seu efeito pode ser suprimido com o uso de antagonistas adenosinérgicos. Em um modelo de isquemia *in vitro*, a guanosina protege contra a perda do potencial de membrana mitocondrial e contra o aumento de EROs em fatias de hipocampo, sendo este efeito abolido pelo antagonismo do A₁R (Dal-Cim *et al.*, 2013). Além disso, a incubação da guanosina, também *in vitro*, diminui a liberação de glutamato por preparações sinaptossomais de hipocampo de ratos, sem alterar os níveis de captação, e este efeito é suprimido quando incubado com DPCPX (Almeida *et al.*, 2016). Desta forma, os receptores A₁ já vem sendo sugeridos como um dos possíveis alvos das ações da guanosina.

Estando estabelecido o envolvimento da transmissão purinérgica na regulação da função motora dos gânglios da base, sua

modulação surge, então, como uma promissora abordagem terapêutica para a DP (Ferré *et al.*, 1997; Ferré *et al.*, 2001). Uma explicação para este potencial terapêutico baseia-se na distribuição cerebral dos receptores – os receptores de adenosina A₁ e A_{2A} são amplamente expressos no estriado (Palmer e Stiles, 1995) - e na capacidade desses receptores em formar oligômeros entre si e entre receptores de outros neurotransmissores, como os de dopamina (Agnati *et al.*, 2005; Fuxe *et al.*, 2013). Foi descrito que os receptores de adenosina se encontram colocalizados com os de dopamina no estriado, e há interação entre eles. Os receptores A₁ e A_{2A} modulam antagonisticamente as características funcionais dos receptores dopaminérgicos D1R e D2R, respectivamente (Ferré *et al.*, 1992; Ferré *et al.*, 1994). Antagonistas de receptores A_{2A}, principalmente, têm surgido como um potencial tratamento para os danos motores relacionados à DP. De acordo, um estudo clínico sugere que os tremores da DP são sensíveis aos efeitos do antagonismo dos receptores A_{2A} (Bara-Jimenez *et al.*, 2003).

Em relação ao receptor A₁, a sua modulação também apresenta evidências de benefícios motores (Ismayilova *et al.*, 2004; Trevitt *et al.*, 2009). Mango e colaboradores (2014) demonstraram que a estimulação do receptor A₁, reduziu a transmissão GABAérgica mediada pelo D1R, além de atenuar a discinesia induzida por L-DOPA .

A depleção aguda, ou a curto prazo, de dopamina pelo tratamento com reserpina resulta em um aumento nos níveis estriatais do receptor D1R, mas não do D2R (Chipkin, Mcquade e Iorio, 1987; Missale *et al.*, 1989). Essa alteração neuroquímica também ocorre na produção das discinesias (Missale *et al.*, 1989). Sabendo que estimulação estriatal dos receptores A₁ de adenosina modula antagonisticamente as características de ligação dos receptores de dopamina D1R (Ferré *et al.*, 1994), a guanosina poderia estar exercendo seu efeito antidiscinético ativando os receptores A₁ e assim diminuindo a excitação exacerbada dos receptores D1R. Apesar de uma possível explicação para o efeito antidiscinético da guanosina, a hipótese de modulação dos efeitos de A₁R-D1R necessita ainda ser comprovada.

Outro parâmetro importante para analisar prejuízos motores é a catalepsia. Catalepsia, em animais de laboratório, é definida como uma falha em corrigir uma postura externamente imposta. Quando um animal normal é colocado em uma postura não usual, ele irá corrigir a postura em segundos. Um animal cataléptico, por sua vez, irá manter essa postura por um tempo prolongado (chegando a minutos). A catalepsia é

de grande interesse por conta das similaridades com doenças humanas como DP (Sanberg *et al.*, 1988).

Como resultado deste estudo, a administração de reserpina induziu um estado cataléptico nos camundongos tratados. Esse parâmetro também foi revertido pela guanosina, e dados com o DPCPX sugerem que o receptor A_1 também está envolvido neste efeito da guanosina. Interessante ressaltar que o antagonismo do A_1R pelo DPCPX também reverteu o efeito da reserpina em provocar catalepsia. De acordo, em outro estudo, a 8-Ciclopentilteofilina (CPT), um antagonista A_1R foi capaz de reverter o estado cataléptico induzido por haloperidol, um antagonista dopaminérgico, porém não foi capaz de restabelecer um comportamento igual ao do controle, sendo assim, uma reversão parcial (Trevitt *et al.*, 2009). Como há evidências de uma diminuição da ativação da via motora indireta na bradicinesia, há a possibilidade que um antagonista do receptor A_1 possa ‘liberar’ o D1R e induzir alguma melhora motora, como foi vista neste estudo através do teste da catalepsia, porém não visto na avaliação das discinesias.

Como informado anteriormente, o exato sítio de interação da guanosina não está elucidado. Evidências de nosso laboratório têm demonstrado que a guanosina pode interagir com os receptores A_1 , A_{2A} e também com canais de potássio (BK). Além disto, um efeito da guanosina também é visto na modulação do transporte de glutamato, desta forma reduzindo a sua excitotoxicidade (para revisão ver Lanznaster *et al.*, 2016). Desta forma, futuros estudos poderão avaliar se o efeito antidiscinético da guanosina é somente dependente da ativação de A_1R , ou envolve a participação de outros alvos conhecidos.

Outra alteração altamente reproduzida no modelo da reserpina é a indução de estresse oxidativo. A reserpina, em doses de 1 – 10 mg/kg é capaz de diminuir o conteúdo de enzimas antioxidantes como a catalase, a superóxido dismutase e a glutationa, além de aumentar a atividade da glutationa peroxidase, níveis de óxido nítrico e peroxidação lipídica (Abílio *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2003; Naidu, Singh e Kulkarni, 2006; Teixeira *et al.*, 2008). Desta forma, há evidências de aumento do dano oxidativo causado pela administração da reserpina.

Neste contexto, foi avaliada a produção de EROs em três estruturas cerebrais, córtex, hipocampo e estriado, utilizando um protocolo *ex vivo*. Através desse protocolo, não foi observada alteração significativa na produção de EROs no córtex cerebral ou no hipocampo. Entretanto, no estriado o tratamento com reserpina causou um aumento proeminente da produção de EROs. Além disso, a guanosina mostrou

ser eficiente em prevenir esse aumento. Corroborando com dados que mostram uma prevenção de estresse oxidativo pela guanosina em modelos de isquemia cerebral *in vitro* (Dal-Cim *et al.*, 2011; Dal-Cim *et al.*, 2013) e de indução de estresse oxidativo mitocondrial (Dal-Cim *et al.*, 2012). A importância desse parâmetro se revela com outros estudos que mostram, no modelo da reserpina, uma melhora motora com fármacos de ação antioxidante (Abílio *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2005; Barcelos *et al.*, 2011). Ainda nesse parâmetro, Pereira e colaboradores (2011) mostraram uma correlação positiva entre a oxidação da sonda fluorescente utilizada para medir EROs (DCFH-DA) e a indução de discinesias pela reserpina.

A alta geração EROs resulta em danos celulares precoces, iniciando uma sinalização pró-inflamatória que pode levar à ativação de moléculas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucinas. Em sequência, o aumento de citocinas pró-inflamatórias ativam a microglia. A microglia ativada em neurônios dopaminérgicos resulta em aumento de óxido nítrico (Arora e Chopra, 2013). Por fim, essa cascata de eventos pode terminar em vias de apoptose. De fato, a reserpina pode induzir a redução de moléculas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e aumento de moléculas pro-apoptóticas, como a caspase-3 (Arora *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; El-Ghazaly *et al.*, 2015)

No entanto, não está claro se a reserpina leva ou não a danos permanentes na célula e até mesmo à neurodegeneração. No estudo de Santos e colaboradores (2013), o tratamento sub-crônico com a reserpina (10 administrações de 0,1 mg/kg em dias intercalados) em ratos Wistar, revelou uma diminuição nos níveis de tirosina hidroxilase (TH) no estriado dorsal. Porém, essa diminuição foi parcialmente restaurada 30 dias após o término do tratamento, dessa forma os autores interpretam o resultado como uma modulação no controle de síntese da dopamina pela redução da expressão da TH, ao invés de neurodegeneração induzida pela reserpina.

No presente estudo observamos um aumento na incorporação de IP em fatias de estriado após a administração de reserpina, o que pode ser explicado não necessariamente como morte celular, mas sim como resultado de uma desestabilização da membrana plasmática causada pela oxidação de seus lípidios, o que permitiria a entrada da sonda na célula. De acordo com essa ideia, este mesmo protocolo de tratamento com reserpina (1 mg/kg) causou um aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) estriatais (Burger *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2009). Como visto, nas fatias de estriado, ocorreu

aumento tanto das EROs como da incorporação de IP. A guanosina mesmo diminuindo a produção de EROs não teve efeito em reduzir a incorporação de IP. Desta forma, é possível que a guanosina desempenhe seu efeito reduzindo a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias e pró-oxidantes, conforme já demonstrado (Dal-Cim *et al.*, 2012; Dal-Cim *et al.*, 2013), no entanto, não interfira com a alteração de permeabilidade de membrana, um evento inicial que não necessariamente desencadeia a perda da viabilidade celular. Contribuindo para esta hipótese temos a observação das alterações motoras, que são prevenidas pela guanosina.

Além do estresse oxidativo, a alteração mitocondrial é apontada como um dos mecanismos responsáveis pela neurodegeneração dopaminérgica na DP. Uma conexão entre a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas já vem sendo postulada nos últimos anos (Beal, 2005; Johri e Beal, 2012). Tendo isto em vista, foi analisado se o tratamento com reserpina poderia ter efeito no potencial de membrana mitocondrial. No entanto, no modelo animal utilizado não foi evidenciada disfunção mitocondrial.

A evidência que obtivemos neste estudo, dos efeitos antidiscinético e neuroprotetor da guanosina frente aos danos produzidos pelo modelo da reserpina, salienta a proposta que essa purina surge como uma possível estratégia terapêutica nas alterações motoras associadas à DP. Além disto, a observação de que o efeito antidiscinético da guanosina depende de uma ativação de receptores adenosinérgicos, concomitante com o conhecimento da relação direta desses receptores com a modulação dos distúrbios motores relacionados à DP, reforça a evidência da importância deste nucleosídeo endógeno na modulação das alterações funcionais (motoras e de viabilidade celular) associadas à DP.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, avaliamos o efeito neuroprotetor e antidiscinético da guanosina em camundongos tratados com reserpina. Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- A guanosina diminuiu as discinesias orofaciais induzidas pelo tratamento com reserpina;
- O efeito antidiscinético da guanosina é dependente da ativação do receptor de A₁ de adenosina;
- O efeito cataléptico da reserpina é revertido pela guanosina e pelo antagonista do receptor A₁ de adenosina DPCPX, além disto, o DPCPX bloqueia o efeito da guanosina neste parâmetro;
- O tratamento com reserpina induz danos celulares no estriado, porém não no hipocampo e córtex cerebral;
- O tratamento com reserpina aumentou a produção de EROs no estriado, não tendo efeito no hipocampo e córtex cerebral;
- O tratamento com reserpina não teve efeito em alterar o potencial da membrana mitocondrial no córtex cerebral, hipocampo e estriado;
- A guanosina previne o aumento da produção de espécies reativa de oxigênio causado pela reserpina no estriado.

Artigos elaborados durante a dissertação:

- **Artigo publicado em colaboração:**

Atorvastatin and Fluoxetine Prevent Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Evoked by Glutamate Toxicity in Hippocampal Slices. Ludka FK, Dal-Cim T, Binder LB, Constantino LC, **Massari C**, Tasca CI. *Molecular Neurobiology* (2016).

- **Artigo submetido em colaboração:**

Atorvastatin Protects from A β ₁₋₄₀-induced Cell Damage and Depressive-like Behavior via BDNF Cleavage. Fabiana K. Ludka, Maurício P. Cunha, Tharine Dal-Cim, Luisa Bandeira Binder, Leandra C. Constantino, **Caio Massari**, Wagner C. Martins, Ana Lúcia S. Rodrigues, Carla I. Tasca. Submetido ao periódico *Molecular Neurobiology*.

- **Artigo submetido como primeiro autor:**

6-Hydroxydopamine-induced toxicity in striatal, cerebrocortical and hippocampal slices is attenuated by atorvastatin or MK-801. Caio M. Massari; Adalberto A. Castro; Tharine Dal-Cim; Débora Lanznaster; Carla I. Tasca. Submetido ao periódico *Toxicology In vitro*.

- **Artigo em preparação:**

Guanosine prevents 6-Hydroxydopamine-induced toxicity in striatal slices *in vitro*.

Caio M. Massari; Naiani Marques; Carla I. Tasca.

REFERÊNCIAS

ABOU-SLEIMAN, P. M.; MUQIT, M. M.; WOOD, N. W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 3, p. 207-19, Mar 2006. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495942> >.

ABÍLIO, V. C. et al. Vitamin E attenuates reserpine-induced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 109-14, Feb 2003. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12551732> >.

AGNATI, L. F. et al. Existence and theoretical aspects of homomeric and heteromeric dopamine receptor complexes and their relevance for neurological diseases. **Neuromolecular Med**, v. 7, n. 1-2, p. 61-78, 2005. ISSN 1535-1084 (Print)

1535-1084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16052039> >.

ALMEIDA, R. F. et al. Guanosine Anxiolytic-Like Effect Involves Adenosinergic and Glutamatergic Neurotransmitter Systems. **Mol Neurobiol**, Jan 2016. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742520> >.

AQUINO, C. C.; FOX, S. H. Clinical spectrum of levodopa-induced complications. **Mov Disord**, v. 30, n. 1, p. 80-9, Jan 2015. ISSN 1531-8257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25488260> >.

AQUINO, C. C.; LANG, A. E. Tardive dyskinesia syndromes: current concepts. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 20 Suppl 1, p. S113-7, Jan 2014. ISSN 1873-5126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24262160> >.

ARORA, V.; CHOPRA, K. Possible involvement of oxido-nitrosative stress induced neuro-inflammatory cascade and monoaminergic pathway: underpinning the correlation between nociceptive and depressive behaviour in a rodent model. **J Affect Disord**, v. 151, n. 3, p. 1041-52, Dec 2013. ISSN 1573-2517. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126118> >.

ARORA, V. et al. Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 10, p. 1570-81, Nov 2011. ISSN 1873-3360. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612876> >.

BARA-JIMENEZ, W. et al. Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 61, n. 3, p. 293-6, Aug 2003. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12913186> >.

BARCELOS, R. C. et al. Short term dietary fish oil supplementation improves motor deficiencies related to reserpine-induced parkinsonism in rats. **Lipids**, v. 46, n. 2, p. 143-9, Feb 2011. ISSN 1558-9307. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21161603> >.

BASKIN, P.; SALAMONE, J. Vacuous jaw movements in rats induced by acute reserpine administration: interactions with different doses of apomorphine. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 46, n. 4, p. 793-7, Dec 1993. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8309957> >.

BEAL, M. F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. **Ann Neurol**, v. 58, n. 4, p. 495-505, Oct 2005. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16178023> >.

BETTIO, L. E. et al. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behav Brain Res**, v. 234, n. 2, p. 137-48, Oct 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743004> >.

BETTIO, L. E. et al. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 127, p. 7-14, Dec 2014. ISSN 1873-5177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316306> >.

BHIDE, N. et al. The effects of BMY-14802 against L-DOPA- and dopamine agonist-induced dyskinesia in the hemiparkinsonian rat. **Psychopharmacology**

(Berl), v. 227, n. 3, p. 533-44, Jun 2013. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389756> >.

BOECK, C. R. et al. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. **Epilepsia**, v. 45, n. 7, p. 745-50, Jul 2004. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15230696> >.

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 121-34, Oct 2004. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338272> >.

BURGER, M. E. et al. Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 135-40, Feb 2003. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12551736> >.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 12, p. 1471-83, Jun 2007. ISSN 1420-682X (Print)1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17375261> >.

CARVEY, P. M.; PUNATI, A.; NEWMAN, M. B. Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. **Cell Transplant**, v. 15, n. 3, p. 239-50, 2006. ISSN 0963-6897. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16719059> >.

CHAUDHURI, K. R. et al. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 3, p. 235-45, Mar 2006. ISSN 1474-4422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16488379> >.

CHIPKIN, R. E.; MCQUADE, R. D.; IORIO, L. C. D1 and D2 dopamine binding site up-regulation and apomorphine-induced stereotypy. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 28, n. 4, p. 477-82, Dec 1987. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2893388> >.

CIRUELA, F. et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. **J Neurosci**, v. 26, n. 7, p. 2080-7, Feb 2006. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16481441> >.

COLLINS, L. E. et al. Oral tremor induced by the muscarinic agonist pilocarpine is suppressed by the adenosine A2A antagonists MSX-3 and SCH58261, but not the adenosine A1 antagonist DPCPX. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 94, n. 4, p. 561-9, Feb 2010. ISSN 1873-5177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19958787> >.

COLPAERT, F. C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 9, p. 1431-40, Sep 1987. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3670563> >.

DAL-CIM, T. et al. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **J Neurochem**, v. 126, n. 4, p. 437-50, Aug 2013. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23713463> >.

DAL-CM, T. et al. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neuroscience**, v. 183, p. 212-20, Jun 2011. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21435378> >.

DAL-CM, T. et al. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. **Neurochem Int**, v. 61, n. 3, p. 397-404, Aug 2012. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683349> >.

DAWSON, L. et al. The group II metabotropic glutamate receptor agonist, DCG-IV, alleviates akinesia following intranigral or intraventricular administration in the reserpine-treated rat. **Br J Pharmacol**, v. 129, n. 3, p. 541-6, Feb 2000. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711353> >.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1058-61, Nov 2002. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12403986> >.

DE LAU, L. M.; BRETHER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 6, p. 525-35, Jun 2006. ISSN 1474-4422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713924> >.

DE RYCK, M.; SCHALLERT, T.; TEITELBAUM, P. Morphine versus haloperidol catalepsy in the rat: a behavioral analysis of postural support mechanisms. **Brain Res**, v. 201, n. 1, p. 143-72, Nov 1980. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7191346> >.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radic Biol Med**, v. 62, p. 132-44, Sep 2013. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23380027> >.

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 31-55, 2001. ISSN 0147-006X (Print)0147-006X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283304> >.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 4, p. 1357-91, Oct 2011. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486284> >.

EL-GHAZALY, M. A. et al. Neuroprotective effect of EGb761® and low-dose whole-body γ -irradiation in a rat model of Parkinson's disease. **Toxicol Ind Health**, v. 31, n. 12, p. 1128-43, Dec 2015. ISSN 1477-0393. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696346> >.

FARIA, R. R. et al. Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: critical role of striatal catalase activity.

Neuropharmacology, v. 48, n. 7, p. 993-1001, Jun 2005. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857626> >.

FERNANDES, V. S. et al. Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1479-83, Aug 2008. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18579275> >.

FERRE, S. et al. Adenosine A1 receptor-dopamine D1 receptor interaction in the rat limbic system: modulation of dopamine D1 receptor antagonist binding sites. **Neurosci Lett**, v. 208, n. 2, p. 109-12, Apr 1996. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8859902> >.

FERRÉ, S. et al. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 10, p. 482-7, Oct 1997. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9347617> >.

FERRÉ, S. et al. Adenosine-dopamine interactions in the brain. **Neuroscience**, v. 51, n. 3, p. 501-12, Dec 1992. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1488111> >.

FERRÉ, S. et al. Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A1 and dopamine D1 receptors. **Neuroreport**, v. 6, n. 1, p. 73-6, Dec 1994. ISSN 0959-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7703433> >.

FERRÉ, S. et al. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 7, n. 3, p. 235-241, Jul 2001. ISSN 1873-5126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331192> >.

FISCHER, D. A.; FERGER, B.; KUSCHINSKY, K. Discrimination of morphine- and haloperidol-induced muscular rigidity and akinesia/catalepsy in simple tests in rats. **Behav Brain Res**, v. 134, n. 1-2, p. 317-21, Aug 2002. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191819> >.

FREDHOLM, B. B. et al. Adenosine and brain function. **Int Rev Neurobiol**, v. 63, p. 191-270, 2005. ISSN 0074-7742 (Print)0074-7742 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15797469> >.

FREIS, E. D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. **N Engl J Med**, v. 251, n. 25, p. 1006-8, Dec 1954. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13214379> >.

FREIS, E. D.; ARI, R. Clinical and experimental effects of reserpine in patients with essential hypertension. **Ann N Y Acad Sci**, v. 59, n. 1, p. 45-53, Apr 1954. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13198038> >.

FRIZZO, M. E. et al. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. **Cell Mol Neurobiol**, v. 22, n. 3, p. 353-63, Jun 2002. ISSN 0272-4340. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12469876> >.

FUXE, K. et al. Moonlighting Proteins and Protein-Protein Interactions as Neurotherapeutic Targets in the G Protein-Coupled Receptor Field. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, p. 131-155, 2013.

GANDÍA, J. et al. Adenosine A2A receptor-mediated control of pilocarpine-induced tremulous jaw movements is Parkinson's disease-associated GPR37 receptor-dependent. **Behav Brain Res**, v. 288, p. 103-6, Jul 2015. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862943> >.

GERLACH, M.; FOLEY, P.; RIEDERER, P. The relevance of preclinical studies for the treatment of Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 250 Suppl 1, p. I31-4, Feb 2003. ISSN 0340-5354. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761633> >.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 103, n. 8-9, p. 987-1041, 1996. ISSN 0300-9564. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013391> >.

GIULIANI, P. et al. Guanosine protects glial cells against 6-hydroxydopamine toxicity. **Adv Exp Med Biol**, v. 837, p. 23-33, 2015. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25310956> >.

HARDIE, R. J.; LEES, A. J.; STERN, G. M. On-off fluctuations in Parkinson's disease. A clinical and neuropharmacological study. **Brain**, v. 107 (Pt 2), p. 487-506, Jun 1984. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6722513> >.

HEIMAN, M. et al. Molecular adaptations of striatal spiny projection neurons during levodopa-induced dyskinesia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 12, p. 4578-83, Mar 2014. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24599591> >.

HIRSCH, E. C. et al. Dopamine, tremor, and Parkinson's disease. **Lancet**, v. 340, n. 8811, p. 125-6, Jul 1992. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1352004> >.

ISMAYILOVA, N. et al. Effects of adenosine A1, dopamine D1 and metabotropic glutamate 5 receptors-modulating agents on locomotion of the reserpinised rats. **Eur J Pharmacol**, v. 497, n. 2, p. 187-95, Aug 2004. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306204> >.

JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 9, p. 665-77, Sep 2008. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18714325> >.

JOHRI, A.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 342, n. 3, p. 619-30, Sep 2012. ISSN 1521-0103. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22700435> >.

KANE, J. M.; SMITH, J. M. Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. **Arch Gen Psychiatry**, v. 39, n. 4, p. 473-81, Apr 1982. ISSN 0003-990X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6121548> >.

KOBYLECKI, C. et al. Randomized clinical trial of topiramate for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 20, n. 4, p. 452-5, Apr 2014. ISSN 1873-5126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24521874> >.

LANZMASTER, D. et al. Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. **A&D**, 10.14336/AD.2016.0208. Disponível em: < <http://www.aginganddisease.org/EN/10.14336/AD.2016.0208> >.

LARA, D. R. et al. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. **Brain Res**, v. 912, n. 2, p. 176-80, Sep 2001. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532434> >.

LEÃO, A. H. et al. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. **Brain Pathol**, v. 25, n. 4, p. 377-90, Jul 2015. ISSN 1750-3639. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25726735> >.

LIPPMAN, F. Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. **Enzymology**, v. 1, 1941.

LIU, S. B. et al. Attenuation of reserpine-induced pain/depression dyad by gentiopicroside through downregulation of GluN2B receptors in the amygdala of mice. **Neuromolecular Med**, v. 16, n. 2, p. 350-9, Jun 2014. ISSN 1559-1174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24584520> >.

LOPES, L. V. et al. Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. **Neuroscience**, v. 112, n. 2, p. 319-329, 2002. ISSN 0306-4522. Disponível em: <<Go to ISI>://000176525700008 >.

MANGO, D. et al. Adenosine A1 receptor stimulation reduces D1 receptor-mediated GABAergic transmission from striato-nigral terminals and attenuates l-DOPA-induced dyskinesia in dopamine-denervated mice. **Exp Neurol**, v. 261, p. 733-43, Nov 2014. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25173217> >.

MARKESBERY, W. R. et al. Lewy body pathology in normal elderly subjects. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 68, n. 7, p. 816-22, Jul 2009. ISSN 0022-3069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535990> >.

MAYORGA, A. J. et al. Tremulous jaw movements produced by acute tacrine administration: possible relation to parkinsonian side effects. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 56, n. 2, p. 273-9, Feb 1997. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9050085> >.

MCQUEEN, E. G.; DOYLE, A. E.; SMIRK, F. H. Mechanism of hypotensive action of reserpine, an alkaloid of *Rauwolfia serpentina*. **Nature**, v. 174, n. 4439, p. 1015, Nov 1954. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13214063> >.

MISSALE, C. et al. Repeated reserpine administration up-regulates the transduction mechanisms of D1 receptors without changing the density of [3H]SCH 23390 binding. **Brain Res**, v. 483, n. 1, p. 117-22, Mar 1989. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2565146> >.

MOLZ, S. et al. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3 β pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 9, p. 1400-8, Sep 2011. ISSN 1097-4547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671255> >.

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; TASCA, C. I. Guanosine-5'-monophosphate induces cell death in rat hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake inhibition. **Neurochem Int**, v. 55, n. 7, p. 703-9, Dec 2009. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19576258> >.

NAIDU, P. S.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Effect of *Withania somnifera* root extract on reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction. **Phytother Res**, v. 20, n. 2, p. 140-6, Feb 2006. ISSN 0951-418X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16444668> >.

NICHOLLS, D. G.; BUDD, S. L. Mitochondria and neuronal survival. **Physiol Rev**, v. 80, n. 1, p. 315-60, Jan 2000. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617771> >.

NUNES, E. J. et al. Differential effects of selective adenosine antagonists on the effort-related impairments induced by dopamine D1 and D2 antagonism. **Neuroscience**, v. 170, n. 1, p. 268-80, Sep 2010. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600675> >.

O'KANE, E. M.; STONE, T. W. Interaction between adenosine A(1) and A(2) receptor-mediated responses in the rat hippocampus in vitro. **Eur J Pharmacol**, v. 362, n. 1, p. 17-25, Nov 27 1998. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <Go to ISI>://000077332900003 >.

OBESO, J. A. et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nat Med**, v. 16, n. 6, p. 653-61, Jun 2010. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495568> >.

PALMER, T. M.; STILES, G. L. Adenosine receptors. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 7, p. 683-94, Jul 1995. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8532135> >.

PEREIRA, D.; GARRETT, C. [Risk factors for Parkinson disease: an epidemiologic study]. **Acta Med Port**, v. 23, n. 1, p. 15-24, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1646-0758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353703> >.

PEREIRA, R. P. et al. Valeriana officinalis ameliorates vacuuous chewing movements induced by reserpine in rats. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 118, n. 11, p. 1547-57, Nov 2011. ISSN 1435-1463. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21476069> >.

PIERMARTIRI, T. C. et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. **Neurotox Res**, v. 16, n. 2, p. 106-15, Aug 2009. ISSN

1476-3524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19526287> >.

POPOLI, P. et al. Adenosine A1 receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D1 receptor stimulation in rodents. **Neurosci Lett**, v. 218, n. 3, p. 209-13, Nov 1996. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8945765> >.

QUARTA, D. et al. Adenosine receptor-mediated modulation of dopamine release in the nucleus accumbens depends on glutamate neurotransmission and N-methyl-D-aspartate receptor stimulation. **J Neurochem**, v. 91, n. 4, p. 873-80, Nov 2004. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15525341> >.

SALAMONE, J.; BASKIN, P. Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: possible model of parkinsonian tremor. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 53, n. 1, p. 179-83, Jan 1996. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8848448> >.

SALAMONE, J. D. et al. Conditional neural knockout of the adenosine A(2A) receptor and pharmacological A(2A) antagonism reduce pilocarpine-induced tremulous jaw movements: studies with a mouse model of parkinsonian tremor. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 23, n. 8, p. 972-7, Aug 2013. ISSN 1873-7862. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22947264> >.

SALAMONE, J. D. et al. Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor. **Prog Neurobiol**, v. 56, n. 6, p. 591-611, Dec 1998. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9871939> >.

SANBERG, P. R. et al. The catalepsy test: its ups and downs. **Behav Neurosci**, v. 102, n. 5, p. 748-59, Oct 1988. ISSN 0735-7044. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2904271> >.

SANTOS, J. R. et al. Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behav Brain**

Res, v. 253, p. 68-77, Sep 2013. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831411> >.

SCHAPIRA, A. H. et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 10, p. 845-54, Oct 2006. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17016425> >.

SILVA, R. H. et al. Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. **Behav Brain Res**, v. 132, n. 2, p. 171-7, May 2002. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997147> >.

SKALISZ, L. L. et al. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression--Parkinson's disease association. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 26, n. 5, p. 879-83, Jun 2002. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369260> >.

SPINA, M. B.; COHEN, G. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 4, p. 1398-400, Feb 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2919185> >.

STEINPREIS, R. E.; SALAMONE, J. D. Effects of acute haloperidol and reserpine administration on vacuous jaw movements in three different age groups of rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 46, n. 2, p. 405-9, Oct 1993. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8265695> >.

TAROZZI, A. et al. Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 24, n. 3, p. 297-306, 2010 Jul-Sep 2010. ISSN 0393-974X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846477> >.

TEIXEIRA, A. M. et al. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 92, n. 2, p. 231-5,

Apr 2009. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109989> >.

TEIXEIRA, A. M. et al. Influence of chronic exercise on reserpine-induced oxidative stress in rats: behavioral and antioxidant evaluations. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 88, n. 4, p. 465-72, Feb 2008. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18001823> >.

TOLOSA, E. et al. History of levodopa and dopamine agonists in Parkinson's disease treatment. **Neurology**, v. 50, n. 6 Suppl 6, p. S2-10; discussion S44-8, Jun 1998. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9633679> >.

TREVITT, J. et al. Adenosine antagonists reverse the cataleptic effects of haloperidol: implications for the treatment of Parkinson's disease. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 92, n. 3, p. 521-7, May 2009. ISSN 1873-5177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19463269> >.

UVERSKY, V. N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 225-41, Oct 2004. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258850> >.

VAN DER BURG, J. C. et al. Postural control of the trunk during unstable sitting in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 12, n. 8, p. 492-8, Dec 2006. ISSN 1353-8020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934518> >.

WOLGIN, D. L. Forelimb placing and hopping reflexes in haloperidol- and morphine-treated cataleptic rats. **Behav Neurosci**, v. 99, n. 3, p. 423-35, Jun 1985. ISSN 0735-7044. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3843719> >.

YAMANOUCHI, H.; NAGURA, H. Neurological signs and frontal white matter lesions in vascular parkinsonism. A clinicopathologic study. **Stroke**, v. 28, n. 5, p. 965-9, May 1997. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9158634> >.

