

Naiani Ferreira Marques

Guanosina previne alterações mitocondriais, o efeito tipo-depressivo e o déficit olfatório induzido por modelos experimentais da doença de Parkinson

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do grau de doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Inês Tasca

Florianópolis - SC

2019

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

Marques, Naiani Ferreira

Guanosina previne alterações mitocondriais, o efeito tipo-depressivo e o déficit olfatório induzido por modelos experimentais da doença de Parkinson / Naiani Ferreira Marques ; orientadora, Carla Inês Tasca, 2019.

216 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.


1. Bioquímica. 2. Doença de Parkinson. 3. Guanosina. 4. 6-OHDA. 5. MPTP. I. Tasca, Carla Inês. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

“Guanosina previne alterações mitocondriais, o efeito tipo-depressivo e o déficit olfatório induzido por modelos experimentais da doença de Parkinson”


Por

Naiani Ferreira Marques

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (004/2019/PPGBQA) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.



Prof.ª Dr.ª Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:


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


Dr.ª Alexandra Susana Latini (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2019.

*Dedico esse trabalho aos meus pais
Jairo e Cleusa que sempre
trabalharam muito para garantir a
minha educação e sempre foram meus
maiores apoiadores.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Jairo e Cleusa por toda a base, pelos ensinamentos e pelo apoio incondicional em todas as fases da minha educação e da minha vida. A sabedoria de vocês sempre será meu exemplo em todos os aspectos.

Agradeço muito a minha orientadora Prof^a Dr^a Carla Tasca pela experiência, pelo conhecimento, pelo seu tempo dedicado ao meu trabalho, pela paciência e por todas as oportunidades que estar em seu laboratório me proporcionaram. Serei sempre grata e orgulhosa por tudo que aprendi no Laboratório de Neuroquímica 4.

Agradeço ao meu companheiro de vida, amigo e noivo Eduardo Lopes, por entender as minhas ausências, as minhas ansiedades, por sempre tentar me manter saudável durante as épocas mais atordoadas do doutorado, pelo carinho e amor que você dedicou a mim e a nossa pequena família durante esse tempo.

Agradeço imensamente as minhas amigas e colaboradoras Tuane Sampaio e Luisa Binder, sem vocês esse trabalho não teria saído do projeto. Vocês foram sempre a minha maior fonte de motivação nesse doutorado. Em especial a Luisa pelos momentos de terapia informal.

Agradeço a todos dos colegas do Laboratório de Neuroquímica 4, obrigada pelas discussões científicas, políticas e culturais. Obrigada Caio, Leandra, Karen e Anderson pela parceria e amizade. Ao João e a Prof^a Dr^a Cláudia Nedel pela amizade de vocês e por confiarem e acreditarem no meu trabalho.

Agradeço também o Prof Dr Rui Prediger por abrir as portas do seu laboratório e sempre ajudar com a discussão dos resultados comportamentais. Agradeço também os alunos do LEXDON que foram essenciais para a realização desse trabalho, obrigada Katiane, Angela e Josiel.

Agradeço imensamente ao Prof. Phillip Dickson e ao Prof. Peter Dunkley da The University of Newcastle por me receberem tão bem e demonstrarem tanto interesse no meu trabalho. Aqui também quero agradecer ao meu amigo Pedro Garcia que foi uma espécie de anjo da guarda durante o meu estágio sanduíche na Austrália.

Agradeço a todos os professores do PPGBQA e do PPG Neurociências por todo o conhecimento repassado nas disciplinas. Vocês são grandes mestres e grandes exemplos.

Agradeço também aos meus amigos de velhos tempos Jivago, Carol e Luisa Pacheco que sempre se fizeram presente mesmo de longe.

Agradeço aos funcionários da SIPG e do LAMEB pelo trabalho dedicado aos alunos.

Agradeço a CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos no Brasil e na Austrália.

Agradeço a UFSC pela estrutura e oportunidade.

E por fim agradeço a todos que indiretamente fizeram alguma contribuição pessoal ou científica durante o meu período de doutorado.

*“The real goal of what we were
doing is to have a positive
impact on the world”*

Ed Catmull

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo e é classicamente descrita como uma doença de sintomas motores. Apesar dos tratamentos atuais serem efetivos para os sintomas motores, os mesmos apresentam efeitos colaterais severos e não impedem a progressão da doença. Diante disso, o nucleosídeo guanosina (GUO) demonstrou eficácia como um agente antiparkinsoniano em modelos clássicos de sintomas motores, além de apresentar efeitos neuroprotetores em modelos celulares *in vitro* da DP. O objetivo desse trabalho foi demonstrar o efeito da GUO em um protocolo *in vitro* que mimetiza eventos celulares iniciais da DP e em modelos animais que mimetizam os sintomas não-motores. *In vitro*, avaliamos os efeitos protetores da GUO contra danos na função mitocondrial de fatias de córtex, estriado e hipocampo do cérebro de ratos. Observamos que a 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 100 μ M) apresenta toxicidade seletiva em fatias estriatais em alterações bioquímicas relacionados a mitocôndria. Nas fatias estriatais, a 6-OHDA diminuiu a viabilidade celular, induziu um aumento da geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs), causou alteração do potencial de membrana mitocondrial, a depleção dos níveis intracelulares de ATP e o aumento da permeabilidade de membrana celular. A co-incubação com GUO (100 μ M) protegeu as fatias estriatais contra o aumento de EROs, alteração do potencial de membrana mitocondrial e a depleção dos níveis de ATP intracelular. Em um protocolo *in vivo*, destacamos a avaliação de sintomas não-motores, como a depressão e o prejuízo olfatório. O comportamento tipo-depressivo foi avaliado utilizando protocolo de infusão bilateral de 6-OHDA (10 μ g/hemisfério) no estriado dorsolateral de ratos. A infusão de 6-OHDA induziu comportamento tipo-anedônico no teste do “*splash*” e aumentou o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. As análises bioquímicas demonstraram alteração do potencial de membrana mitocondrial nas fatias de hipocampo, enquanto que a geração de EROs não foi alterada nas fatias corticais, estriatais e hipocampais dos animais que receberam a infusão de 6-OHDA. O tratamento com GUO 7,5 mg/kg i.p. durante 21 dias após a infusão de 6-OHDA apresentou um efeito parcialmente protetor no teste do “*splash*”, preveniu comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado e protegeu as fatias hipocampais da alteração do potencial de membrana mitocondrial induzido pela 6-OHDA. Ainda, o efeito do tratamento com GUO 7,5 mg/kg i.p. durante 20 dias em ratos submetidos à infusão intranasal de MPTP (1 mg/narina) foi avaliado. A infusão de MPTP induziu prejuízo nos testes de discriminação olfatória e

de reconhecimento social. Adicionalmente, foram observadas alterações no potencial de membrana mitocondrial e aumento da permeabilidade de membrana nas fatias de bulbo olfatório. No hipocampo também foi observado aumento da permeabilidade de membrana. Nenhuma alteração foi observada na expressão total ou na fosforilação dos sítios Ser19, Ser31 e Ser40 da enzima tirosina hidroxilase (TH). A GUO preveniu o prejuízo à habilidade olfatória e à memória de reconhecimento social, a alteração do potencial de membrana mitocondrial e a permeabilidade de membrana no bulbo olfatório. Em síntese, concluímos que a GUO apresenta um potencial efeito neuroprotetor em parâmetros relacionados à função mitocondrial e a sintomas não-motores da DP, mimetizados em modelos *in vitro* e *in vivo* pelas toxinas 6-OHDA e MPTP.

Palavras chave: Doença de Parkinson, 6-OHDA, MPTP, função mitocondrial, sintomas não- motores, depressão, prejuízo olfatório, guanosina, tirosina hidroxilase

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease worldwide and classically described as a motor symptoms disorder. Although current treatments presented effectiveness against motor symptoms, it is not possible to stop the progression of the disease or avoid the side effects. The guanine nucleoside (GUO) has been shown as an efficient antiparkinsonian agent against motor symptoms in classical animal models of PD, besides showing neuroprotective effects in *in vitro* models of PD. Here, the aim was to demonstrate the effectiveness of GUO in *in vitro* model, which reproduces early cellular events related to PD and in *in vivo*, using animal models which mimic non-motor symptoms of PD. *In vitro*, we evaluated the protective effects of GUO against 6-OHDA-induced toxicity in slices from the cortex, striatum and hippocampal of rats. 6-OHDA (100 μ M) presented selective toxicity on striatal slices in parameters related to mitochondrial function. In striatal slices, 6-OHDA decreases cell viability, increased reactive oxygen species (ROS) generation, disrupted mitochondrial membrane potential, induce intracellular ATP levels depletion and increased cell membrane permeability. Co-incubation with GUO protected striatal slices against increased ROS, mitochondrial membrane potential disruption and intracellular ATP depletion. In *in vivo* protocol, we highlight non-motor symptoms as depression and olfactory impairment. Depressive-like symptoms were mimicked using a 6-OHDA (10 μ g/hemisphere) bilateral infusion model into the dorsolateral striatum of rats. The 6-OHDA infusion induced anhedonic-like behavior in the splash test and increased the immobility time in the forced swimming test. Biochemical analyses demonstrated the disruption of the mitochondrial membrane potential in the hippocampal slices, whereas the ROS generation was not altered in the cortical, striatal and hippocampal slices in animals which received 6-OHDA infusion. Meanwhile, treatment with GUO (7.5 mg/kg, i.p.) during the 21 days after 6-OHDA infusion revealed a partial protective effect in the splash test, prevented increased immobility time in the forced swimming test, and finally protected the hippocampal slices 6-OHDA-induced disruption on mitochondrial membrane potential. Finally, the treatment with GUO 7.5 mg/kg i.p. for 20 days in rats submitted to an intranasal infusion of MPTP was evaluated. MPTP infusion induced behavioral impairments in the olfactory discrimination and the social recognition test. Additionally, MPTP-induced disruption on the mitochondrial membrane potential in olfactory bulb slices and increased cell membrane permeability in the olfactory bulb and hippocampal slices

were observed. Regarding tyrosine hydroxylase (TH) regulation, no changes in the expression or phosphorylation of the Ser19, Ser31, and Ser40 sites were observed 21 days after MPTP, although we demonstrated a different profile of phosphorylation of TH in the brain regions analyzed. Finally, we demonstrated the protective effects of GUO on the olfactory discrimination deficits, social recognition memory impairment and also on disruption of mitochondrial membrane potential in the olfactory bulb induced by MPTP. Thus, we conclude that GUO has a potential neuroprotective effect on parameters related to mitochondrial function and non-motor symptoms of PD mimicked *in vitro* and *in vivo* models based in the toxins 6-OHDA and MPTP.

Keywords: Parkinson's disease, 6-OHDA, MPTP, mitochondrial function, non-motor symptoms, depression, olfactory impairment, guanosine, tyrosine hydroxylase

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA 6-hidróxi-dopamina

A₁R Receptor de adenosina tipo 1

A_{2B}R Receptor de adenosina tipo 2B

A₃ Receptor de adenosina tipo 3

ADP Adenosina-5'-difosfato

Akt Proteína cinase B

AMP Adenosina-5'-monofosfato

AMP Adenosina-5'-monofosfato

ATP Adenosina-5'-trifosfato

BHE Barreira Hematoencefálica

BK Canal de Potássio de alta condutância dependente de Cálcio

COMT Catecol-O-metil transferase

D₁R Receptor de dopamina tipo 1

D₂R Receptor de dopamina tipo 2

DAT Transportador de dopamina

DBS “Deep brain stimulation”

DP Doença de Parkinson

EROs Espécies reativas ao oxigênio

GABA Ácido gama-aminobutírico

GDP Guanosina-5'-difosfato

Gi Proteína G inibitória do tipo i

GLU Glutamato

GMP Guanosina-5'-monofosfato

GPCR Receptores acoplados a proteína G

GPe Globo pálido externo

GPi Globo pálido interno

Gs Proteína G estimulatória do tipo s

GSH Glutathiona reduzida

GTP Guanosina-5'-trifosfato

GUO Guanosina

H₂O₂ Péroxido de hidrogênio

HO-1 Heme oxigenase 1

iNOS Óxido nítrico sintase induzível

L-DOPA Levodopa

MAO-B Enzima monoamina oxidase B

MAPK Proteína cinase ativada por mitógeno

mGLU Receptores metabotrópicos de glutamato

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

NF-κB Fator nuclear κB

NMDA *N*-metil-D-aspartato

NST Núcleo subtalâmico

O₂[·] Radical superóxido

OH[·] Radical hidroxil

PI3K Fosfatidilinositol-3-cinase

PNP Fosforilase de nucleosídeos de purinas

SNC Sistema Nervoso Central

SNpc Substantia nigra pars compacta

SNpr Substantia nigra pars reticulata

SOD Superóxido dismutase

TH Tirosina hidroxilase

VMAT Transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. DOENÇA DE PARKINSON	20
<i>1.1.1 Histórico</i>	20
<i>1.1.2 Etiologia e Epidemiologia</i>	23
<i>1.1.3 Sintomas e mecanismos</i>	26
<i>1.1.3.1 Sintomas não-motores: ênfase no prejuízo olfatório e depressão</i>	28
<i>1.1.3.1.1 Prejuízo olfatório</i>	28
<i>1.1.3.1.2 Depressão</i>	30
<i>1.1.3.2 Mecanismos celulares envolvidos na patologia da Doença de Parkinson</i>	32
<i>1.1.4 6-OHDA</i>	38
<i>1.1.5 MPTP</i>	41
<i>1.1.6 Tratamento da DP</i>	45
1.2 GUANOSINA	48
<i>1.2.1 Efeitos da GUO no SNC</i>	50
<i>1.2.2 Metabolismo e aplicação em modelos experimentais</i>	54
2 JUSTIFICATIVA	59
3 OBJETIVOS	61
3.1 OBJETIVO GERAL	61
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
4 MATERIAL E MÉTODOS	62
5 RESULTADOS	62
CAPÍTULO I	63
CAPÍTULO II	73
CAPÍTULO III	110
6 DISCUSSÃO	163
7 CONCLUSÕES	178
8 PERSPECTIVAS	179
REFERÊNCIAS	180

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

1.1.1 *Histórico*

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela perda dos neurônios dopaminérgicos na região da *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Figura 1). A perda neuronal na SNpc resulta em deficiência de dopamina na região do estriado (via nigroestriatal dopaminérgica), principal alteração relacionada ao desenvolvimento dos sintomas motores clássicos da doença como acinesia, bradicinesia, rigidez, tremor de repouso e instabilidade postural (Dexter e Jenner, 2013).

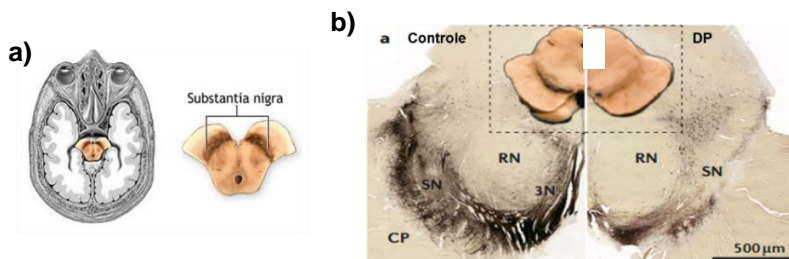
A primeira descrição da DP foi a pouco mais de 200 anos, quando James Parkinson publicou a clássica monografia intitulada “*Essay on the Shaking Palsy*” em 1817. Posteriormente, Jean-Martin Charcot adicionou importantes detalhes às observações de Parkinson, descrevendo os quatro principais sinais cardinais da DP: (i) tremor de repouso, (ii) bradicinesia, (iii) alterações posturais e de marcha, e (iv) rigidez muscular. Charcot também foi o responsável por nomear a doença em homenagem a James Parkinson (Goetz, 2002).

Em 1912, Fritz Henrich Lewy identificou agregados proteicos que até hoje definem a DP, os corpos de Lewy. Lewy primeiramente identificou os agregados em outras regiões do cérebro, e em 1919, Konstantin Nikolaevich Tretiakoff foi o primeiro a identificar alterações neuropatológicas na SNpc de pacientes com DP e foi quem nomeou esses agregados em homenagem a Lewy. Até hoje a presença dos corpos de

Lewy na SNpc é a principal característica histopatológica da DP (Przedborski, 2017).

Posteriormente, a identificação do papel da dopamina surgiu como grande descoberta neuroquímica, o que possibilitou o desenvolvimento dos primeiros modelos experimentais da DP (Carlsson, 1959). Carlsson e colaboradores (1959) demonstraram o papel da dopamina utilizando a administração de reserpina, um inibidor do transportador vesicular de monoaminas (VMAT) no final da década de 1950. Neste que é considerado um dos primeiros modelos experimentais da DP, foi demonstrado que a administração de L-diidroxifenilalanina (L-DOPA), precursor da dopamina, revertia a redução dos níveis de dopamina e da atividade motora induzida pela reserpina (Carlsson et al., 1957). Essas evidências foram cruciais para elucidar o papel da dopamina na sinalização dos gânglios basais e controle motor.

Figura 1 – Localização e alterações na SNpc na DP



a) Localização da região da SNpc, região responsável pela modulação do movimento e onde ocorre a perda de neurônios dopaminérgicos na DP (adaptado de Olson, 1998). b) Comparação entre SNpc de paciente saudável e com DP (adaptado de Poewe et al., 2017). 3N: fibras nervosas; CP: pedúnculo cerebral; RN: núcleo vermelho; SN: *substantia nigra*. Fonte: a) adaptado de Olson, 1998; b) adaptado de Poewe et al, 2017.

Em seguida, a L-DOPA foi testada em pacientes com DP, tornando-se o principal tratamento sintomático para DP e outras condições semelhantes (Fahn, 2015). O papel da dopamina e a introdução da L-DOPA abriram as portas para, nos anos seguintes, o desenvolvimento de outros modelos experimentais que visaram elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos sintomas motores. Assim, modelos utilizando toxinas como a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) tornaram-se amplamente utilizados para estudar a DP (Bové e Perier, 2012). Desde então, inúmeros mecanismos, características, sintomas e possíveis tratamentos foram descritos.

Na década de 1990, a proteína alfa-sinucleína (α -sinucleína) foi identificada como a principal constituinte dos corpos de Lewy, que além de serem considerados centrais para a identificação da DP, já foram identificados em outras patologias neurodegenerativas como a demência causada por corpos de Lewy e a atrofia multissistêmica (Goedert et al., 2013). Os estudos genéticos e os modelos experimentais com 6-OHDA e MPTP esclareceram também o papel da função mitocondrial na patologia da doença. Ainda que as formas hereditárias da DP representem apenas 5-10% de todos os casos, muito do conhecimento relacionado aos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença estão relacionados com o estudo os estudos genéticos (Perfeito et al., 2012).

Mais recentemente Braak e colaboradores desenvolveram um sistema de estagiamento para a DP de causa idiopática (Braak et al., 2004). Esse estudo demonstrou que a presença de agregados de α -

sinucleína primeiramente acontece no núcleo dorsal motor e então ocorre a progressão para outras regiões como a SNpc.

Recentemente um avanço importante para o tratamento da DP foi a implantação da técnica de DBS, do inglês “*deep brain stimulation*”. Em 1994, Benabid demonstrou os efeitos benéficos da estimulação de alta frequência no núcleo subtalâmico (NST) de pacientes com DP (Benabid et al., 1994). Enquanto isso, o trabalho de Siegfried e colaboradores havia demonstrado efeitos benéficos desse tipo de estimulação também no *globus pallidus* interno (GPi) (Siegfried., 1987). A cirurgia de DBS já foi realizada em milhares de pessoas ao redor do mundo e os resultados mostraram a eficácia e segurança do método. Assim, a cirurgia de DBS tornou-se uma importante estratégia terapêutica no tratamento paliativo de sintoma motores na DP.

Atualmente, a DP permanece como uma doença sem cura, com tratamentos paliativos eficazes que atenuam principalmente os sintomas motores sem, todavia, retardar a progressão do processo neurodegenerativo. Os desafios atuais da DP é seguir o curso de progressão da doença, identificar novos biomarcadores e métodos de diagnóstico, além de uma abordagem terapêutica anterior ao avanço neurodegenerativo que causa os sintomas motores.

1.1.2 *Etiologia e Epidemiologia*

A região da SNpc é destacadamente susceptível ao estresse oxidativo e aos processos relacionados ao envelhecimento, dois conhecidos fatores de risco para a DP. Gênero e etnia também são descritos como fatores de risco. Quanto ao gênero, são aproximadamente

3 homens para cada 2 mulheres acometidas com a doença. Esta diferença é atribuída, em parte ao efeito protetor dos hormônios sexuais femininos (estrogênio), a mecanismos genéticos relacionados ao gênero e pelas diferenças relacionadas à exposição aos riscos ambientais (exposição a agrotóxicos e traumatismo cranioencefálico) (Van Den Eeden et al., 2003). Em relação a etnia, um estudo de 2003 demonstrou que nos Estados Unidos, a incidência da DP é maior em indivíduos de origem hispânica, seguido de indivíduos brancos não-hispânicos, asiáticos e por fim afrodescendentes (Van Den Eeden et al., 2003).

Outros fatores de risco identificados incluem a exposição a pesticidas, uso de bloqueadores dos receptores beta-adrenérgicos, lesão craniana prévia, vida rural e trabalho agrícola (Noyce et al., 2012). De modo geral, acredita-se que a DP resulte de uma combinação da exposição a fatores ambientais como exposição frequente a contaminantes ambientais (metais, vírus, herbicidas e pesticidas) (Postuma et al., 2010) e predisposição genética (Gorell et al., 2004). Por outro lado, alguns fatores relacionados com a menor incidência de DP são o consumo de café, de tabaco, uso de anti-inflamatórios não esteroidais, uso de canais bloqueadores de cálcio, entre outros (Noyce et al., 2012).

Entretanto, a idade segue sendo o grande fator de risco para o desenvolvimento da DP. O envelhecimento pode acentuar a produção de estresse oxidativo, excitotoxicidade e neuroinflamação, que possuem papel importante no processo neurodegenerativo associado à DP. O estresse oxidativo pode levar a morte neuronal e consequente ativação da micróglia, que por sua vez induz a produção e a liberação de mediadores e citocinas inflamatórias pelas células da glia, aumentando a

neurotoxicidade e afetando os processos neurodegenerativos (Mosley et al., 2006; Subramaniam, 2013).

A prevalência e a incidência da DP aumentam exponencialmente com a idade, especialmente após os 80 anos (Driver et al., 2009). A prevalência que é cerca de 0,3 % na população em geral, passa a ser 1 % na população com mais de 60 anos (de Lau e Breteler, 2006) e para cerca de 3 % na população com mais de 80 anos (Pringsheim et al., 2014). Portanto, levando em consideração o aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento da população para os próximos anos, espera-se um aumento de 50 % nas pessoas com DP para 2030 (Dorsey et al., 2007). A incidência anual de DP é cerca de 8 a 18 acometidos a cada 100.000 pessoas (de Lau e Breteler, 2006).

A mortalidade entre os pacientes não aumenta nas primeiras décadas após os primeiros sintomas identificáveis da doença, porém com a progressão da doença o número de morte é duplicado quando comparado com a população em geral (Pinter et al., 2015). O desenvolvimento de tratamentos mais avançados tem levado a uma maior longevidade desses pacientes, o que pode ser associado com o aumento da prevalência de pacientes com DP nos últimos 20 anos de estudo (Lix et al., 2010).

Em termos mundiais, a prevalência da DP é maior na Europa (66-1500 a cada 100.000 habitantes) (von Campenhausen et al., 2005), América do Norte (111-320 a cada 100.000 habitantes) (Strickland, 2004) e América do Sul (470 a cada 100.000 habitantes) (Bauso et al., 2012), do que comparado com a África (10-43 a cada 100.000 habitantes) (Okubadejo et al., 2006), Ásia (15-119 a cada 100.000 habitantes)

(Muangpaisan, 2009) e países Árabes (27-43 a cada 100.000 habitantes) (Benamer et al., 2008). Segundo estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), existem aproximadamente 222 mil parkinsonianos no Brasil (IBGE, 2000).

Apesar de os tratamentos atuais apresentarem grande eficácia contra os sintomas motores, quais fatores desencadeiam o processo neurodegenerativo que precede em vários anos o desenvolvimento dos sintomas motores, bem como qual intervenção seria capaz de impedir o desenvolvimento da doença ainda não estão esclarecidos (Przedborski, 2017). Adicionalmente, com o avanço da doença, os sintomas não-motores acabam dominando o cenário clínico, e sintomas como depressão, prejuízo cognitivo, prejuízo do sistema autônomo, problemas de memória e distúrbios do sono são os principais responsáveis pelo declínio da qualidade de vida dos pacientes (Chaudhuri, 2010). Atualmente não existem tratamentos bem estabelecidos para os sintomas não-motores.

1.1.3 Sintomas e mecanismos

Classicamente, a DP é descrita como uma doença motora em virtude da deficiência de dopamina na via nigroestriatal. Os sintomas motores são identificáveis somente no estágio avançado da doença, quando aproximadamente 60-70 % dos neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal encontram-se em neurodegeneração, causando uma grande depleção de dopamina no estriado (cerca de 70-80 %) (Sharma et al., 2013). Os sintomas motores mais frequentes são o tremor de repouso, a bradicinesia (lentidão dos movimentos), rigidez muscular, instabilidade

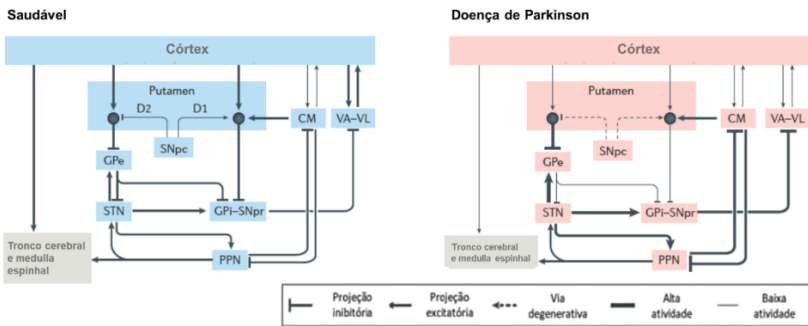
postural, alterações na marcha (marcha festinante) e também alterações da voz (Belvisi et al., 2017; Karunanayaka et al., 2016; Lees et al., 2009).

Além da via nigroestriatal, outras vias dopaminérgicas são afetadas na DP, como as vias mesolímbica e mesocortical (Braak et al., 2004; Dauer e Przedborski, 2003). Essas vias modulam a participação da dopamina no controle de funções motoras, mas também no controle de funções cognitivas e emocionais (Puig, 2014). Höglinger e colaboradores (2015) demonstraram a existência de uma subpopulação de neurônios que emitem projeções dopaminérgicas da substância negra para o bulbo olfatório (via *nigro-olfatória*), as quais apresentaram papel importante para a modulação do olfato (Höglinger et al., 2015).

A compreensão dos sintomas da DP vai além da regiões que compreendem a modulação dopaminérgica, outras regiões do sistema nervoso central (SNC) são afetadas, incluindo estruturas do sistema olfatório, núcleo motor dorsal, núcleo da rafe, *Locus coeruleus*, sistema nervoso autônomo, hipocampo e parte do córtex cerebral (Braak et al., 2003; Braak et al., 2004). Muitas dessas alterações se devem às mudanças no funcionamento do circuito motor basal que modula funções e comportamentos envolvendo diversas vias de neurotransmissão, as quais sofrem várias alterações na DP (Figura 2). Uma das alterações mais significativas se dá na regulação das vias transmissão inibitória nos gânglios basais, onde o tônus dopaminérgico regula a atividade GABAérgica (Nambu et al., 2000). Esse mecanismo apresenta-se modificado na DP, já que a deficiência de dopamina possui efeitos opostos na via direta e indireta. Enquanto a atividade na via direta mediada por receptor D_1R (receptor para dopamina tipo D_1) é reduzida, a

atividade na via indireta mediada por receptor D_2R (receptor para dopamina tipo D_2) torna-se aumentada, resultando em um efeito inibitório aumentado pela atividade GABAérgica nos gânglios basais, o que por sua vez aumenta a inibição nas áreas do tronco cerebral e tálamo-córtex (Poewe et al., 2017).

Figura 2 – Mudanças na circuitaria motora relacionada com diferentes sistemas neurotransmissores na DP.



(CM: núcleo centromediano, do inglês *centromedian nucleus*; GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; PPN: núcleo pedunculopontino, do inglês *pedunculopontine nucleus*; SNpr: substância negra *pars reticulata*; STN: núcleo subtalâmico, do inglês *subthalamic nucleus*; VA-VL: núcleos anterior-ventral lateral). Fonte: Adaptado de Przedborski, 2017.

1.1.3.1 Sintomas não-motores: ênfase no prejuízo olfatório e depressão

1.1.3.1.1 Prejuízo olfatório

A hipótese de Braak como é conhecido o estudo que levou a identificação de seis estágios que incluíam diversos sintomas não-motores que precediam o aparecimento dos sintomas motores estabeleceu uma

nova visão temporal da DP. Os sintomas não-motores, geralmente precedem os motores, mas alternativamente podem aparecer de forma tardia somando maior gravidade ao quadro clínico (Schapira et al., 2017). Os sintomas não-motores incluem déficit olfatório, doenças relacionadas à afetividade e prejuízo da memória, bem como disfunções autônomas e do sistema digestório (Chaudhuri, 2010). Dentre esses primeiros sintomas destacam-se o prejuízo olfatório e a depressão, além de sintomas cognitivos (como prejuízo nas memórias operacionais) (Braak et al., 2003; Braak et al., 2004; Chaudhuri et al., 2006).

A hiposmia (redução da capacidade de identificar odores) é observada em mais de 90% dos pacientes com a DP de causa idiopática (Haehner et al., 2009; Doty, 2012; 2008). O desenvolvimento da hiposmia pode estar relacionado a distribuição dos corpos de Lewy como descrito por Braak e colaboradores. As alterações no sistema olfatório na DP parecerem ser causadas por mudanças no processamento central da olfação, já que amostras de biópsia de epitélio olfatório de pacientes não apresentam alterações (Wang et al., 2011). Porém, o mesmo estudo observou que, comparado com indivíduos saudáveis, os pacientes com DP apresentam vários graus de diminuição do volume e da profundidade dos sulcos no bulbo olfatório (Wang et al., 2011). Adicionalmente, é possível detectar corpos e neuritos de Lewy através de imunorreatividade para α -sinucleína no bulbo olfatório, no córtex olfatório e outras regiões relacionadas com a olfação (Silveira-Moriyama et al., 2009). Nessa mesma linha, estudos utilizando camundongos que super expressavam α -sinucleína, modelo transgênico da DP, apresentaram progressivo déficit olfatório (Fleming et al., 2008). Outro modelo transgênico utilizando α -

sinucleína com a mutação A53T demonstrou acúmulos de agregados de α -sinucleína no bulbo olfatório (Ubeda-Bañon et al., 2012). Nesses estudos foi observado que os animais apresentavam uma perda progressiva da habilidade de detectar e discriminar odores, o que foi associado com o acúmulo de α -sinucleína no bulbo olfatório. Em ambos os estudos não foram observados acúmulo de agregados de α -sinucleína ou alteração do número de células dopaminérgicas na SNpc. Os resultados em roedores podem refletir uma grande representação do que acontece na DP em humanos e são consistentes com o conceito de que as alterações no sistema olfatório precedem o aparecimento dos sintomas motores, relacionados com a perda dopaminérgica e também que podem estar relacionados com a progressão do acúmulo de α -sinucleína (McDowell, 2012). Dessa forma a função olfatória tem emergido como um componente importante do quadro clínico da DP e seu estudo contribuiu para a compreensão da progressão da doença. Bem como, o estudo do dano olfatório pode facilitar o diagnóstico diferencial da DP em relação a outras doenças que promovem alterações motoras (Prediger et al., 2012; Sampaio et al., 2017).

1.1.3.1.2 Depressão

Dentre os sintomas não-motores da DP, é importante destacar que a depressão é o que mais impacta o dia-a-dia e a qualidade de vida dos pacientes além de aumentar a suscetibilidade a diversas comorbidades como doença arterial coronariana, hipertensão, acidente vascular cerebral e diabetes mellitus tipo 2 (Marsh, 2013; van Der feltz-cornelis, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2012), a depressão (depressão

maior – denominação oficial) define-se como um transtorno psiquiátrico crônico que afeta aproximadamente 350 milhões de indivíduos no mundo. Diferentes regiões do cérebro estão envolvidas na fisiopatologia da depressão, como o hipocampo e o córtex pré-frontal e sistemas neurotransmissores como o glutamatérgico e colinérgico (Aarsland et al., 2011). Ainda, alguns aspectos motivacionais da doença, como a anedonia ou alterações de sono e apetite estão relacionadas com alterações no núcleo accumbens e no hipotálamo, respectivamente (Drevets, 2001).

A depressão afeta cerca de 35-40% dos pacientes, pode preceder em até 20 anos o diagnóstico e está associada com o agravamento do quadro clínico (Frisina, 2009; Aarsland et al., 2011). A hipótese mais aceita para explicar a fisiopatologia da depressão na DP é a da redução das aminas cerebrais (hipótese monoaminérgica) associada à hipótese psicogênica (como consequência das limitações motoras) e a redução do conteúdo de neurotrofinas no SNC (hipótese neurotrófica) (Ffytche et al., 2017; Kanda et al., 2008; Santiago 2016).

Em relação aos sintomas, a depressão pode ser caracterizada por um somatório de efeitos somáticos e emocionais como perda de apetite, distúrbios do sono, lentificação motora, fadiga, perda de energia e interesse em atividades cotidianas, anedonia e dificuldade de tomar decisões (Schrag, 2004; Duman, 2014; Marsh, 2013). Os indivíduos com a DP apresentam mais disforia e irritabilidade, menor sentimento de culpa, bem como menor incidência de suicídio comparados a indivíduos com depressão maior (Sung, 2013).

Atualmente não existem tratamentos específicos para a depressão associada a DP. Alguns estudos já demonstraram que os

pacientes com DP não apresentam boa resposta aos tratamentos clássicos com antidepressivos (50 % dos pacientes são refratários) (Aarsland et al., 2011). É importante salientar que a estimulação elétrica no núcleo subtalâmico (utilizada no tratamento com DBS) tem sido associada com a piora da depressão, inclusive com aumento dos níveis de suicídio após a cirurgia (Voon et al., 2008). Nesse sentido, outros alvos têm sido apontados como alternativa como o estímulo na região do *Globus pallidus*, que causa melhora dos sintomas depressivos e é mais indicado para pacientes com DP com sintomas psiquiátricos (Follett et al., 2010).

Sendo assim, é fundamental melhorar os estudos sobre novas estratégias terapêuticas que ofereçam tratamento adequado ou que associados aos antidepressivos clássicos possam apresentar melhores resultados. A depressão associada a DP pode ser estudada através dos modelos experimentais baseados em toxinas como a 6-OHDA e o MPTP. Em roedores, a administração dessas toxinas induz comportamentos tipo depressivo no teste do nado forçado e no teste do consumo de sacarose (Castro et al., 2012; Castro et al., 2013; Tadaiesky et al., 2008; Tadaiesky et al., 2010; Drui et al., 2014; Santiago et al., 2010), desamparo aprendido (Winter et al., 2007) e também no teste de suspensão pela cauda (Mori et al., 2005).

1.1.3.2 Mecanismos celulares envolvidos na patologia da Doença de Parkinson

Sendo a DP uma doença multidimensional que atinge vários sistemas neurotransmissores, a fisiopatologia da doença envolve vários mecanismos celulares, que muitas vezes se apresentam interligados pelas

mesmas vias de toxicidade. Alguns exemplos são alterações celulares que envolvem múltiplas vias e mecanismos tais como: homeostase proteica da α -sinucleína, função mitocondrial, estresse oxidativo, homeostase de cálcio, neuroinflamação e excitotoxicidade (Figura 3).

Embora a presença de corpos de Lewy não seja característica exclusiva da DP, o acúmulo dos mesmos permanece como uma das características definitivas para o diagnóstico de casos idiopáticos, junto com a perda de neurônios na região da SNpc (Goedert et al., 2013). A deposição dos corpos de Lewy em diferentes regiões do cérebro foi relacionada com a progressão dos sintomas da doença (Braak et al., 2004). Algumas teorias tem defendido que os agregados de α -sinucleína uma vez formados nos neurônios, podem ser transportados através dos axônios para outras regiões, liberados no meio extracelular e formar novos agregados dentro de novas células hospedeiras (Angot et al., 2010, Brundin et al., 2010). Além da formação inicial no bulbo olfatório, regiões sistêmicas também seriam afetadas pela formação dos agregados nas fases iniciais. A presença de agregados aconteceria primeiramente no intestino e gradualmente atingiria as regiões no SNC. Essa hipótese suporta a ideia de que estes seriam os primeiros sítios de agregação, já que estariam associados aos primeiros sintomas das fases iniciais da doença como hiposmia e constipação, por exemplo (Berg et al., 2015; George et al., 2013; Mahlknecht et al., 2015). Vários mecanismos estão relacionados ao acúmulo de α -sinucleína, como a função proteolítica dos lisossomos, do sistema ubiquitina/proteassoma, autofagia mediada por chaperonas, entre outros (Alvarez-Erviti et al., 2010; Emmanouilidou et al., 2010; Martinez-Vicente et al., 2008). Alterações no funcionamento

desses sistemas perturbam a homeostase proteica da α -sinucleína e causam o acúmulo e formação dos corpos de Lewy (Malek et al., 2014).

Muitas linhas de pesquisa tem associado a interação dos distúrbios relacionados com a α -sinucleína e a função mitocondrial (Nakamura, 2013). Segundo esses estudos, os dois mecanismos podem atuar de forma somatória como em um ciclo vicioso, o que torna a função mitocondrial um elemento chave nos mecanismos da DP (Schapira, 2007; Bose, 2016). O primeiro estudo que demonstrou o papel da mitocôndria na patogênese da DP foi a infusão acidental em humanos de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), um inibidor de complexo I na cadeia transportadora de elétrons (Langston, 1983; Burns et al., 1985). Desde então foi demonstrado que a atividade do complexo I é diminuída em vários tecidos de pacientes com DP.

Além do MPTP, outras toxinas como rotenona e 6-OHDA que atuam causando danos à mitocôndria replicam a neuropatologia da DP (Schapira, 2007; Bose, 2016). Alguns dos mecanismos mitocondriais demonstrados na literatura que estão relacionados com a DP são: o déficit bioenergético; mutações no DNA mitocondrial e nuclear; mudança na dinâmica de fusão e fissão; tamanho e morfologia da mitocôndria; alterações no transporte e movimento; e expressão de proteínas que apresentam mutações (Bose, 2016). Diversos estudos mostram que danos mitocondriais levam a produção crônica de espécies reativas ao oxigênio (EROs) causando a morte dos neurônios dopaminérgicos (Dauer, 2003). Casos hereditários da DP estão relacionados a mutações em genes que codificam proteínas que regulam a função mitocondrial: Parkina, α -

sinucleína, DJ-1, UCHL-1, LRRK2, PINK1 (*PTEN-induced kinase1*), NURR1, VPS35 (*vacuolar protein sorting 35*), and HtrA2 (Perfeito, 2012). Ainda que as formas hereditárias da DP representem apenas 5-10 % de todos os casos, os estudos genéticos tem permitido esclarecer vários mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença, já que muitos dos genes associados com a doença são responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas em vias moleculares alteradas nas formas esporádicas da doença (Perfeito, 2012).

O estresse oxidativo, como uma causa/consequência do dano mitocondrial, está descrito como um dos mecanismos celulares da DP, porém ainda não está definido em que momento (fase inicial ou tardia) o aumento das espécies reativas torna-se dominante (Subramaniam, 2013). Os neurônios dopaminérgicos são particularmente mais vulneráveis ao estresse oxidativo por diversas razões: possuem processos particularmente longos (mais de 4,5 metros); além de axônios não mielinizados; alta demanda de energia requerida para a atividade desses neurônios (Bolam, 2012; Pissadaki, 2013) e oscilações citosólicas de cálcio (Surmeier et al., 2017). Adicionalmente, altos níveis de dopamina no citosol e seus metabólitos podem aumentar a produção de espécies reativas, causando estresse oxidativo e dano mitocondrial, que por sua vez podem levar ao dano da função proteolítica no citosol (Lotharius, 2002; Dehay et al., 2010).

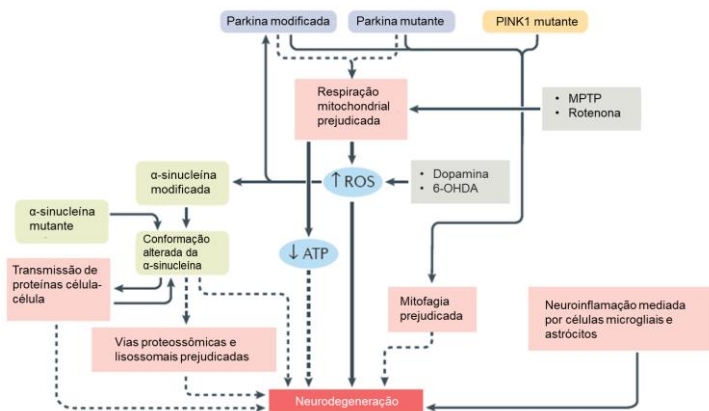
Estudos *post-mortem* de imagem e pesquisas de biomarcadores em fluidos têm relatado a neuroinflamação como um forte contribuinte para a patogênese da DP. A neuroinflamação pode promover o acúmulo de α -sinucleína (Gao et al., 2008), sugerindo a interação dos dois

processos. Estudos de fase prodrômica da DP (fase que precede os sintomas motores) mostram processos inflamatórios nos tecidos do sistema olfatório e intestino, regiões consideradas como iniciais da patologia da doença (Lema Tomé et al., 2013).

A redução de dopamina no corpo estriado resulta na superativação do núcleo subtalâmico, causando um aumento na liberação de glutamato nos corpos celulares dos neurônios glutamatérgicos localizados na SNpc. Esses neurônios são ricos em receptores glutamatérgicos do sub-tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico (AMPA), bem como os receptores metabotrópicos mGluR1 e mGLUR2/3, provocando excitotoxicidade (Rodríguez, 1998). A excitotoxicidade é um processo patológico no qual excessiva estimulação dos receptores glutamatérgicos resulta no aumento do influxo de Ca^{2+} e Na^+ na célula, levando a um grande aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , o que pode causar dano ou morte celular (Choi, 1987; Ambrosi et al., 2014).

Como representado na Figura 3, muitas vezes, os mecanismos envolvidos na patologia e progressão da DP estão interligados, formando uma rede complexa de alterações celulares que comprometem aos poucos a função motora além de implicar em diversos sintomas não-motores ao longo dos anos. De fundamental importância para o estudo das características da DP, são os modelos experimentais que mimetizam os sintomas da doença em animais de laboratório.

Figura 3 - Alguns dos mecanismos celulares envolvidos na DP.



O esquema acima inclui alguns dos mecanismos propostos para a patogênese da DP. As flechas sólidas representam os mecanismos já bem estabelecidos na literatura, enquanto que as flechas tracejadas representam algumas hipóteses não tão bem estabelecidas. Adaptado de Przedborski (2017).

O uso de modelos animais com toxinas tem sido crucial para elucidar a fisiopatologia, bem como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tratar os sintomas da DP. Os animais como os roedores usados em laboratório não desenvolvem a doença espontaneamente, por isso é necessário o uso de diferentes toxinas e compostos que são capazes de mimetizar sintomas motores, não-motores e alterações bioquímicas características da doença. Dois protocolos com toxinas, usando rotenona e paraquat em roedores, emergiram ganhando o “*status*” de modelos, (Bové e Perier, 2012). No entanto, modelos de DP em mamíferos com MPTP e 6-OHDA são os mais usados e com melhor caracterização definida (Figura 6).

1.1.4 6-OHDA

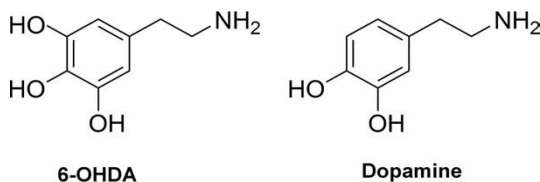
A 6-OHDA foi a primeira substância a ser usada para induzir sintomas da DP (Ungerstedt, 1968) e é considerada a toxina *par excellence* em roedores para modelo da doença (Bové e Perier, 2012). Possui alta afinidade pelos transportadores de catecolaminas devido a sua similaridade com as catecolaminas (Figura 4), sendo capaz de danificar seletivamente neurônios catecolaminérgicos (Luthman et al., 1989). Por outro lado, a 6-OHDA não possui uma boa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), por isso é necessário que sua administração seja feita diretamente no SNC. Normalmente em estudos *in vivo* a 6-OHDA é usada em associação com a administração de desipramina, um inibidor do transporte de noradrenalina, obtendo-se assim, uma maior seletividade de dano para os neurônios dopaminérgicos.

Nas últimas décadas, diversos modelos experimentais com abordagens consideradas mais acessíveis e viáveis, sem necessidade de procedimento cirúrgico por exemplo, surgiram no meio científico. Porém, a administração de 6-OHDA permanece como o protocolo mais utilizado para reproduzir características comportamentais e bioquímicas da DP. Isso deve-se a algumas características específicas: (i) relativa baixa complexidade e custo de produção; (ii) altos índices de reprodutibilidade e; (iii) a versatilidade do modelo, podendo reproduzir vários tipos de lesão nigroestriatal com diferentes perfis temporais dependendo da região ou dose de infusão da toxina (Blandini et al., 2008).

O mecanismo de ação neurotóxico da 6-OHDA está intimamente associado ao estresse oxidativo, por ser análoga a dopamina, a 6-OHDA,

uma vez dentro da célula, gera espécies reativas por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Simola et al., 2007). A 6-OHDA sofre auto-oxidação formando EROs, *para*- e *orto*-quinonas, estas últimas interagem com grupamentos nucleofílicos de macromoléculas (SH, NH², OH⁻), desnaturando-as (Saner, 1971). A metabolização enzimática da 6-OHDA é catalisada pela enzima monoamina oxidase (MAO), formando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que, além de sua ação citotóxica *per se*, induz a formação de outras EROs, como o radical superóxido (O₂•) e hidroxil (OH•) (Cohen, 1974). Somado a esses eventos, tanto as quinonas quanto a 6-OHDA podem inibir a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, induzindo déficit energético celular (Glinka, 1995). Como consequência à perda do equilíbrio oxidativo, ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios pelas células da glia, culminando no processo de morte neuronal (Sheng et al., 1993).

Figura 4 – Comparação da estrutura química da 6-hidroxi-dopamina e da dopamina



Fonte: Bové e Perier (2012).

A administração de 6-OHDA em diferentes regiões cerebrais pode causar diferentes padrões de dano celular. *In vivo*, os modelos mais

bem estabelecidos na literatura são com administrações feitas na SNpc, no estriado ou no feixe medial do prosencéfalo (MFB, do inglês “*Medial Forebrain Bundle*”). Na SNpc, a infusão geralmente é feita unilateralmente, com o hemisfério contralateral sendo usado como controle, já que a injeção bilateral envolve cuidados extras com a saúde dos animais em experimento e uma maior taxa de mortalidade (Ungerstedt, 1971).

A administração de 6-OHDA na SNpc produz uma perda massiva dos neurônios dopaminérgicos nigrais nas primeiras 12 horas após a infusão. As lesões alcançam o estriado, e em paralelo a depleção de dopamina na mesma região pode ser detectada em 2 a 3 dias (Faull, 1969; Lee et al., 1996). Classicamente, a infusão de 6-OHDA na SNpc é amplamente usada para estudar sintomas motores da DP em modelos animais. A confirmação da lesão geralmente é feita usando apomorfina, um agonista dopaminérgico, que causa comportamento estereotipado com rotações contralaterais (Blandini et al., 2008). O modelo usando 6-OHDA no MFB produz uma redução significativa dos níveis de dopamina no estriado é encontrada 3-4 dias após a lesão, restando uma pequena porcentagem residual de 20 % em relação ao controle (Faull, 1969). O número de neurônios na SNpc diminui gradualmente alcançando 90 % em 5 semanas (Sarre et al., 2004).

A injeção de 6-OHDA no estriado, onde estão os terminais dos neurônios que se projetam da SNpc foi proposto nos anos 1990 como uma variante do modelo original na SNpc (Sauer, 1994). No estriado, a 6-OHDA induz um dano imediato nos terminais dopaminérgicos estriatais,

seguido por uma progressiva e lenta morte celular nos neurônios da SNpc. O dano é cerca de 50 - 70 % de morte celular na SNpc (Deumens, 2002; Lee, 1996; Sauer, 1994; Blandini et al., 2007). Dessa forma o efeito do modelo no estriado mimetiza efeitos comparáveis aos observados nos estágios iniciais da doença (Fearnley, 1991).

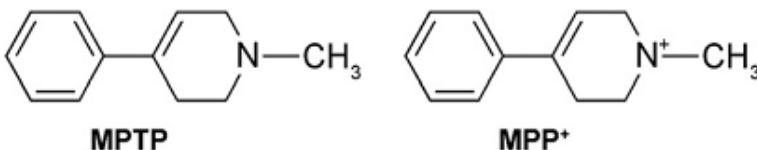
1.1.1.5 MPTP

No fim do século 20, um análogo sintético do opióide miperidina com o nome químico 1-metil-4-fenil-4-propionpiperidina (MPPP) foi introduzido como droga recreativa nos Estados Unidos, possuindo um efeito comparável ao da heroína. Um estudante de 23 anos produziu um novo lote de MPPP em um laboratório caseiro e após a injeção teve sintomas graves de bradicinesia que respondeu ao tratamento com L-DOPA (Langston, 1983). A investigação sobre a etiologia da condição apresentada pelo estudante mostrou o subproduto MPTP como causador dos sintomas (Bové e Perier, 2012). Após alguns testes em macacos e outros casos de usuários com sintomas parkinsonianos, ficou estabelecido a capacidade do subproduto MPTP causar sintomas graves e irreversíveis, característicos da DP como tremor, rigidez, lentidão de movimento, instabilidade postural e comportamento acinético (Langston, 1986).

O MPTP é uma protoxina com cinética complexa que dá origem ao metabólito tóxico 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP⁺) (Heikkila et al., 1984) (Figura 5). Devido a sua alta lipofilicidade, o MPTP atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e posteriormente é convertido em MPP⁺ em duas etapas (Markey et al., 1984; Riachi et al., 1989). Primeiro

é metabolizado pela enzima monoamina oxidase B (MAO-B) produzindo o intermediário 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinium (MPDP⁺) (Chiba et al., 1984), esta é uma molécula instável que sofre rapidamente dismutação espontânea a MPP⁺ e MPTP (Chiba et al., 1984; Peterson et al., 1985). O MPP⁺ é liberado no espaço extracelular e entra nos neurônios dopaminérgicos através do transportador de dopamina (DAT) da membrana plasmática, pelo qual possui uma alta afinidade (Bezard et al., 1999; Javitch et al., 1985). A interação com o DAT é crucial na ação do MPTP, já que a ablação genética do transportador impede os efeitos da protoxina (Javitch et al., 1985). Uma vez dentro dos neurônios, o MPP⁺ se acumula em vesículas sinápticas (Liu et al., 1992) e por transporte passivo chega a matriz mitocondrial (Davey et al., 1987), onde inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons e diminui a produção de ATP em até 20 % no mesencéfalo *in vivo* (Chan et al., 1991), além de aumentar a produção EROs (Rossetti et al., 1988; Hasegawa et al., 1990).

Figura 5 – Estrutura química do MPTP e MPP⁺.



Fonte: Bové e Perier (2012).

O modelo de MPTP é tradicionalmente aplicado utilizando roedores via intraperitoneal, como a administração sistêmica para causar

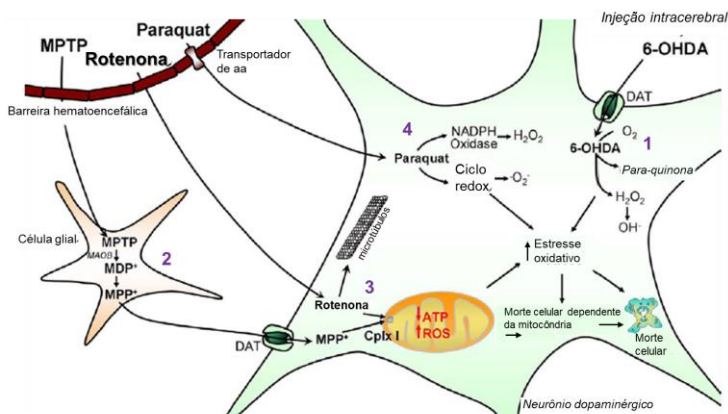
dano dopaminérgico exige uma dose que implica alta taxa de mortalidade, o modelo com injeção estereotáxica do metabólito tóxico MPP⁺ tem sido mais utilizado para modelo de DP (Giovanni et al., 1994; Staal, 2000). As características multifatoriais que atingem vários sistemas na DP exigem uma investida na evolução dos modelos experimentais, permitindo um estudo que vá além dos sintomas motores, já que esses aparecem tardiamente, quando o processo neurodegenerativo encontra-se em estágio bem avançado. Diante disso, nos últimos anos, vem sendo proposto o modelo de infusão intranasal da protoxina (Prediger et al., 2011; Prediger et al., 2012; Prediger et al., 2006), no qual uma única administração em cada narina de roedores tanto em ratos (Castro et al., 2012; Castro et al., 2013; Moreira et al., 2010; Prediger et al., 2006; Prediger et al., 2009) quanto em camundongos (Matheus et al., 2012; Prediger et al., 2010; Schamne et al., 2018) reproduz sintomas como danos olfativo, cognitivo, emocional, motor e também diminuição na expressão da enzima marca-passo para a biossíntese de dopamina, Tirosina Hidroxilase (TH), no bulbo olfatório e SNpc de ratos (Prediger et al., 2006). Dessa forma, a administração intranasal de MPTP parece ser uma forma válida de avaliar os tratamentos neuroprotetores para os sintomas motores e não-motores da DP. Além disso, o modelo de via intranasal exclui fatores como a manipulação excessiva dos animais, cirurgia e medicações que podem causar variações nos resultados e também sofrimento ao animal.

Além dos modelos acima citados que usam toxinas (Figura 6) para mimetizar as características da DP, existem ainda outros modelos, como por exemplo o uso de inibidores de proteossoma (PSI, do inglês

“Proteosome inhibitors) (Duty e Jenner, 2011). Também os modelos genéticos, como as mutações na α -sinucleína, parkina e LRKK2, tentam mimetizar os sintomas da doença. Apesar da validade para estudar a DP de origem hereditária (Parkinson familiar) que corresponde a minoria dos casos, vários estudos demonstram que o fator ambiental é decisivo no desenvolvimento da doença e que muitas vezes, a mutação por si só não mimetiza a maioria dos sintomas (Duty e Jenner, 2011).

Finalmente, alguns modelos utilizando agentes farmacológicos como por exemplo reserpina e haloperidol são considerados modelos discriminativos, ou seja, reproduzem apenas uma característica pontual, enquanto os modelos usando toxinas são considerados modelos fidedignos reproduzindo o máximo de características da doença (Russell, 1959). Apesar dos modelos farmacológicos não reproduzirem as características da doença ao mesmo nível que as toxinas, algumas características pontuais podem se tornar relevantes dentro desse tipo de estudo. O modelo com reserpina, por exemplo, possui grande importância histórica, porque foi responsável por esclarecer o papel da dopamina na patologia da doença (Carlsson et al., 1957). A reserpina é um inibidor do VMAT, mecanismo que leva à depleção reversível de dopamina. O experimento realizado por Carlsson em 1957 demonstrou que o efeito da reserpina podia ser revertido com a administração de L-DOPA, um precursor da dopamina.

Figura 6- Mecanismos das principais toxinas usadas como modelo da DP.



6-OHDA entra nos neurônios dopaminérgicos através do transportador de dopamina (DAT), em seguida em consecutivas reações é oxidada, gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e para quinona. O aumento do estresse oxidativo e o dano à função mitocondrial (inibição do complexo I) levam a ativação de vias de morte celular (1). O MPTP e a rotenona são compostos lipofílicos que atravessam a barreira hematoencefálica (BHE). O MPTP é metabolizado ao cátion 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺). MPP⁺ entra nas células dopaminérgicas via DAT onde inibe o complexo I na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria diminuindo os níveis de ATP e consequentemente levando a morte celular (2). A rotenona além dos danos relacionados a função mitocondrial também pode levar a despolimerização dos microtúbulos, evento que é parte do processo de morte celular (3). O paraquat entra no cérebro através do transportador de aminoácidos neutro e catalisa a formação de espécies reativas induzindo dano ao equilíbrio (ou ciclo) redox e ativação de enzimas geradores de EROs como a NADPH oxidase (4). Adaptado de Bové e Perier (2012).

1.1.6 Tratamento da DP

Até os dias de hoje a L-DOPA é o principal tratamento farmacológico para a DP disponível, sendo eficaz para os sintomas motores. Porém seu uso se torna ineficaz com a evolução dos sintomas motores e agravamento da doença, além do aparecimento de efeitos

colaterais como o desenvolvimento de discinesias com o uso crônico (LeWitt, 2016). Com a crescente necessidade de alternativas para novos tratamentos e diversos estudos em torno da circuitaria dos gânglios basais e mecanismos relacionados com a DP, em 1993 ocorreu a identificação do núcleo subtalâmico como um possível alvo para o DBS (do inglês “Deep brain stimulation” (Limousin et al., 1995). O DBS consiste em uma estimulação elétrica de alta frequência (100-200 Hz) usando eletrodos implantados dentro da caixa craniana. Desde então diversos estudos clínicos tem confirmado o efeito antiparkinsoniano do DBS no núcleo subtalâmico (Fukaya, 2015). Atualmente, a cirurgia para implantação dos eletrodos é usada como terapia para flutuações motoras e discinesia em pacientes com DP (Fox et al., 2011). O paciente ideal para a cirurgia é aquele com Parkinson idiopático, ou seja sem cunho genético, com boa resposta a L-DOPA, mas com complicações motoras devido ao longo tempo de tratamento (Volkman, 2010). Alguns fatores como demência, psicose aguda e depressão são fatores de exclusão para esse tipo de tratamento, além de idade avançada e baixa resposta a L-DOPA (Volkman, 2010).

Outras formas de tratamento também são usadas na clínica como por exemplo, agonistas dopaminérgicos ou inibidores da MAO e da catecol-O-metil transferase (COMT), enzimas responsáveis pela metabolização da dopamina. Além de terapias não relacionadas com o sistema dopaminérgico, como a amantadina que é um antagonista de receptor NMDA (Fox et al., 2011), também moduladores do sistema colinérgico (relação com sintomas cognitivos), terapias baseadas em exercício, entre outros (Jankovic, 2012).

Embora os tratamentos para os sintomas motores estejam em primeiro plano nos estudos clínicos da DP, a introdução de medidas de qualidade de vida levou ao reconhecimento de que a multiplicidade dos sintomas possui um impacto mais amplo sobre os pacientes do que apenas a deficiência motora (Chaudhuri, 2009). A deterioração da qualidade de vida dos pacientes fica mais evidente com o avanço da doença e muito se deve aos sintomas não-motores, em particular os aspectos autonômicos, cognitivos e psiquiátricos. O sintoma não motor mais reconhecido como característica da DP é a depressão, mas muitos outros sintomas não são mencionados, reconhecidos ou estudados (Weintraub, 2011). Diante desse cenário, é importante o desenvolvimento de estudos com modelos experimentais que permitam estudar a progressão dos sintomas e mimetizem tanto os sintomas motores como os sintomas não-motores. Esses modelos são uma ferramenta importante na busca de novas alternativas terapêuticas que possam atuar significativamente no quadro geral da DP, levando em consideração o aspecto geral da doença e a qualidade de vida dos pacientes, e não apenas os sintomas motores. Sendo assim, em virtude dos efeitos colaterais do tratamento com L-DOPA, a seletividade necessária e a complexidade do procedimento cirúrgico para o tratamento com DBS, existe a necessidade de evidenciar estratégias terapêuticas adjuvantes às utilizadas atualmente, ou novas estratégias que minimizem os efeitos colaterais causados pelas mesmas.

1.2 GUANOSINA

A guanosina (GUO) (Figura 7) é um nucleosídeo endógeno derivado da guanina que compõe o sistema purinérgico. As purinas constituem uma classe de moléculas orgânicas essenciais para as células, tendo em vista seus papéis como moduladores intra e extracelulares. Os componentes do sistema purinérgico são derivadas das bases nitrogenadas adenina e guanina, incluindo os nucleotídeos com um ou mais fosfatos, como adenosina-5'-trifosfato (ATP), adenosina-5'-difosfato (ADP), adenosina-5'-monofosfato (AMP), guanosina-5'-trifosfato (GTP), guanosina-5'-difosfato (GDP), guanosina-5'-monofosfato (GMP), os nucleosídeos adenosina, inosina e guanosina, as bases nitrogenadas adenina, guanina, hipoxantina e seus metabólitos xantina e ácido úrico.

Primeiramente, as purinas foram identificadas como componentes estruturais dos ácidos nucleicos e de algumas coenzimas, além de apresentarem atividade como segundo mensageiros na sinalização intracelular. Após a descoberta de importantes funções biológicas da adenosina (Drury, 1929), o conceito de sinalização purinérgica foi introduzido por Burnstock em 1970. Burnstock foi o primeiro a sugerir o papel do nucleotídeo ATP como um neurotransmissor, uma ideia que gerou críticas e controvérsia, uma vez que o papel energético dessa molécula em vias bioquímicas já estava bem estabelecido (Burnstock, 1972; Abbracchio et al., 2009). Posteriormente, diversos estudos revelaram importantes receptores transmembrana para os integrantes do sistema purinérgico, o que permitiu a categorização e divisão dos mesmos em grupos de acordo com o respectivo ligante.

Atualmente, receptores purinérgicos constituem uma família de subtipos de receptores amplamente distribuídos no SNC e que participam da modulação da função sináptica e de processos de interações entre neurônio-glia ou glia-glia (Burnstock, 2008). Os receptores pertencentes à família P2 são receptores de ATP e ADP, e são subdivididos em P2X [receptores ionotrópicos, ou seja, canais iônicos permeáveis a Cálcio (Ca^{2+}), Sódio (Na^+) e Potássio (K^+)] e P2Y (receptores metabotrópicos acoplados às proteínas G). Os receptores da família P1 são receptores metabotrópicos para adenosina, e são divididos em quatro subtipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (Burnstock, 2007). Os receptores A_1 são acoplados à proteína G_i levando a uma diminuição da atividade da adenilato ciclase e consequente diminuição nos níveis de AMP cíclico intracelular e são expressos em todo o SNC, enquanto que os receptores A_{2A} são acoplados à proteína G_s , 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 G_s , mas são pouco expressos no cérebro, enquanto os receptores A_3 são moderadamente expressos no cerebelo e hipocampo (Palmer, 1995; Burnstock, 2007).

Os primeiros estudos do sistema purinérgico foram focados nos derivados da adenina e no nucleosídeo adenosina, enquanto os derivados da guanina receberam menos atenção. Hoje, os efeitos intracelulares dos derivados da guanina durante a transdução de sinais através dos receptores de membrana acoplados a proteína G são bem conhecidos (Rathbone et al., 1999; Abbracchio et al., 2009). As proteínas G possuem ação central na transdução de sinal, acoplando receptores transmembrana

a efetores intracelulares (Rodbell et al., 1971). A modulação da atividade das proteínas G ocorre via interação com o GDP no estado basal (associado ao p-loop da subunidade alfa das proteínas G heterotriméricas), e com o GTP no estado ativado, quando a subunidade alfa se dissocia da beta-gama subunidades (Taylor et al., 1990). Os nucleotídeos da guanina também modulam as proteínas G monoméricas como a Ras, Rab Ef-Tu, entre outras.

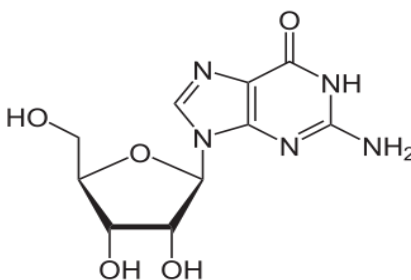
Os derivados da guanina tiveram sua importância reconhecida após inúmeros estudos que demonstraram as ações extracelulares do GTP, GMP e da guanosina, especialmente em efeitos neuromoduladores no SNC (Schmidt et al., 2007). Um crescente número de evidências tem demonstrando que a guanosina parece ser uma importante molécula sinalizadora no meio extracelular, ativando alvos relacionados a uma resposta neuroprotetora (Neary et al., 1996; Rathbone et al., 2008; Ribeiro et al., 2016). A principal fonte de guanosina extracelular vem do catabolismo de nucleotídeos da guanina liberados pelos astrócitos (Ciccarelli et al., 1999; Ciccarelli et al., 2001).

1.2.1 Efeitos da GUO no SNC

A GUO vem sendo amplamente estudada como alternativa para neuroproteção por atuar sobre vários modelos experimentais de doenças neurológicas *in vivo* e *in vitro*. Os efeitos neuroprotetores da GUO foram demonstrados em modelos de convulsões, isquemia, DP, Doença de Alzheimer, entre outros. Além disso, estudos tem demonstrado que a GUO possui efeito antinociceptivo, tipo-antidepressivo, ansiolítico e também efeito neurogênico (Lanznaster et al., 2016; Bettio et al., 2016) .

Ao passo em que a adenosina é rapidamente metabolizada em situação de isquemia, as concentrações de guanosina continuam a sofrer um aumento progressivo nesta condição, chegando a apresentar um aumento de 3,5 vezes em comparação aos níveis fisiológicos (Ciccarelli et al., 1999). Cabe ressaltar ainda que os níveis elevados desse nucleosídeo após dano isquêmico podem permanecer elevados durante um período de até 7 dias após a ocorrência do insulto (Uemura et al., 1991). Sendo assim, esses achados indicam a presença prolongada de altos níveis de guanosina em condições patológicas, podem sugerir que a guanosina seja uma molécula neuroprotetora endógena liberada em resposta a situações de dano celular.

Figura 7 – Estrutura química da guanosina.

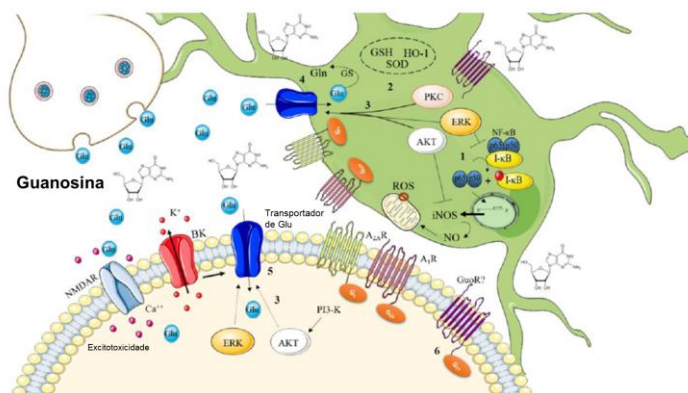


Fonte: (Nelson 2014).

O mecanismo de ação da GUO não está bem elucidado, no entanto, tem sido sugerido que a GUO previne o estresse oxidativo, a neuroinflamação além de alterações mitocondriais e na transmissão glutamatérgica, em células, fatias de tecido cerebral ou modelos animais submetidos a diferentes protocolos de dano celular. Diferentes

mecanismos foram relacionados com os efeitos neuroprotetores da GUO no SNC (Figura 8). Foi demonstrado que a GUO pode atuar como um agente modulador do sistema redox, através da redução dos níveis de EROs em modelo de toxicidade induzida por glutamato *in vitro* em diferentes regiões do córtex, estriado e hipocampo de ratos (Dalla Corte et al., 2012). Outras evidências relacionadas às defesas antioxidantes são a modulação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e expressão da Heme-oxigenase (HO-1) (Hansel et al., 2015; Dal-Cim et al., 2012; Quincozes-Santos et al., 2014; Bellaver et al., 2015; Bettio et al., 2014). Também foi evidenciado que a GUO inibe a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B através da modulação das vias de sinalização intracelular envolvidas na sobrevivência celular como a via MAPK/ERK e também pela prevenção da indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em fatias de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio, um modelo de isquemia cerebral *in vitro* (Dal-Cim et al., 2013). Um dos mecanismos mais estudados da GUO é sua ação sobre o transporte de glutamato, conferindo a capacidade de prevenir a excitotoxicidade glutamatérgica. A GUO modula a excitotoxicidade através do aumento da captação e redução dos níveis extracelulares de glutamato, e também modulando a atividade de enzimas que metabolizam glutamato (glutamina sintetase) (Dal-Cim et al., 2016).

Figure 8 – Principais mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor da Guanosina



1) redução dos níveis de EROs por inibição do NF- κ B, ativação da via de sinalização MAPK/ERK e também pela prevenção da ativação da enzima iNOS. 2) GUO também modula as defesas antioxidantes (aumento da atividade da SOD, aumento dos níveis de GSH e HO-1). 3) ativação da PI3K/Akt, PKC e MAPK/ERK pelo GUO estimula a atividade dos transportadores de GLU, reduzindo os níveis de GLU extracelular e protegendo contra a excitotoxicidade; 4) GUO restaura a funcionalidade dos receptores de GLU e aumenta a atividade da enzima GS, reduzindo os níveis de GLU extracelular e protegendo contra a excitotoxicidade glutamatérgica; 5) inibição da ativação de canais BK e inibição do receptor A_{2A}R aumenta a captação de glutamato; 6) GUO promove restauração da viabilidade celular através da modulação de canais BK, A₁R e A_{2A}R. Um sítio específico para a ligação da GUO foi identificado como um GPCR, porém esse receptor para a GUO (GuoR) ainda não foi bem caracterizado, nem seu envolvimento nos efeitos neuroprotetores. GUO: guanosina; EROs: espécies reativas ao oxigênio; NF- κ B: fator de transcrição nuclear NF- κ B; MAPK/ERK: proteínas cinases ativadas por mitógenos/ cinases reguladas por sinal extracelular, vias de sinalização envolvidas na sobrevivência celular; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; SOD: superóxido dismutase; GSH: glutatona; HO-1: Heme-oxigenase; PI3K/Akt: fosfatidilinositol-3- cinase / proteína cinase B, vias de sinalização relacionadas com a sobrevivência celular; PKC: proteína cinase C; GLU: glutamato; BK: canais de potássio do tipo cálcio-dependente; A_{2A}R: receptor de adenosina A_{2A}; A₁R: receptor de adenosina A₁; GPCR: receptores acoplados a proteína G (Lanznaster et al., 2016).

Apesar de todas os estudos evidenciando o efeito neuroprotetor da GUO, alvos moleculares específicos ainda não foram identificados. Por outro lado, um sítio seletivo para a ligação da GUO vem sendo estudado, o “receptor para GUO” (GuoR), que seria um receptor acoplado à proteína G, porém sua caracterização não foi ainda completamente elucidada, bem como seu envolvimento nos efeitos neuroprotetores (Di liberto et al., 2012). Nesse sentido, alguns possíveis alvos moleculares foram mostrados através da inibição dos canais de potássio do tipo cálcio-dependente (BK) e ativação de receptores A_{2A} de adenosina, que inibem o efeito da GUO sobre a captação de glutamato (Dal-Cim et al., 2011), sendo assim esses mecanismos poderiam estar relacionados ao efeito neuroprotetor da GUO.

Finalmente, sabemos que a GUO não é neurotóxica mesmo quando incubada em altas concentrações em fatias hipocâmpais (Molz, 2009) e não apresenta efeitos sobre a função motora *in vivo*, avaliados pela coordenação motora de animais submetidos a testes do campo aberto e barra giratória (Roesler et al., 2000; Lara et al., 2001). Adicionalmente, Jackson (2014) demonstrou que o tratamento com GUO não causa alteração na pressão arterial quando administrada periféricamente. Também não foi observada presença de nefrotoxicidade, avaliados por parâmetros como fluxo sanguíneo e resistência vascular renal (Jackson, 2014).

1.2.2 Metabolismo e aplicação em modelos experimentais

Os níveis plasmáticos de guanosina aumentam de forma dose- e tempo-dependentes após administração intraperitoneal desse nucleosídeo (Giuliani et al., 2012), sendo que sua concentração se encontra dobrada

90 min após tratamento com dose de 8 mg/kg (Jiang et al., 2008). Além disso, as concentrações máximas de seus metabólitos (guanina, xantina e ácido úrico) no plasma foram detectadas 15-30 min após a administração de guanosina, indicando que esse nucleosídeo é rapidamente metabolizado após administração exógena. Adicionalmente, a administração intraperitoneal de GMP ou guanosina (7,5 mg/kg) aumenta significativamente os níveis de GUO no líquido cefalorraquidiano (LCR) após 30 minutos (Soares et al., 2004), enquanto que a administração de GUO aumentou os níveis de GUO e guanina na medula espinal (Jiang et al., 2008). Quando administrada por via oral, ocorre um aumento dose-dependente nas concentrações de guanosina e seus metabólitos no líquido cefalorraquidiano (Schmidt et al., 2010; Vinadé et al., 2005). Adicionalmente, a guanosina é captada por transportadores de nucleosídeos (Nagasawa et al., 2007; Peng et al., 2005), que podem ser encontrados em células intestinais, microvasos encefálicos e na BHE (Jones e Hammond, 1995; Patil e Unadkat, 1997). Finalmente, evidências *in vitro* demonstram que a concentração de guanosina é reduzida em até 50% na primeira hora após tratamento, mas seus metabólitos permanecem constantemente elevados por até 3 h. Sendo assim, possivelmente esse nucleosídeo apresenta uma meia-vida prolongada no meio extracelular (Ciccarelli et al., 2001).

De fato, a enzima fosforilase de nucleosídeos de purinas (PNP, que converte GUO a guanina) e guanina deaminase foram identificadas em membranas cerebrais, e suas atividades podem resultar em um elevado níveis de metabólitos das purinas no cérebro (Rathbone et al., 2008). O estudo da distribuição da GUO nos tecidos após a administração sistêmica

em ratos utilizando [³H]-guanosina demonstrou que os animais que receberam 8 mg/kg i.p. apresentaram um pico de radioatividade no coração, rins, fígado e pulmões 15 minutos após a injeção. No tecido adiposo e SNC o pico de concentração foi identificado 30 minutos (Jiang et al., 2008), sugerindo uma rápida metabolização da GUO. No plasma, a presença dos traços de [³H]-guanosina (administrada a 2, 4, 8 e 16 mg/kg i.p.) aumentou de forma tempo e dose dependente no plasma, atingindo um platô após 60 minutos. Em todos os tecidos estudados foram encontrados níveis mais elevados de GUO e guanina nos tecidos quando comparados com o plasma, o que sugere a rápida distribuição e acúmulo nos tecidos. O alto nível de atividade da enzima PNP no plasma encontrado no mesmo estudo também evidencia um rápido metabolismo.

Diante do exposto, a GUO tem sido considerada uma molécula de interesse terapêutico para o tratamento e profilaxia em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas. Poucos estudos avaliaram o efeito da GUO em modelos animais ou celulares da DP.

Su e colaboradores (2009) demonstrou os efeitos benéficos do tratamento com GUO em um modelo de parkinsonismo com a administração de um inibidor de proteassoma. Neste estudo, o tratamento diário com GUO (8 mg/kg) durante 8 semanas foi capaz de melhorar os sintomas motores e aumentar as células positivas para TH no estriado. Dados recentes de nosso laboratório demonstraram que a GUO protege fatias de estriado contra danos ao potencial de membrana mitocondrial e depleção de ATP induzidos com 6-OHDA *in vitro* (Marques, 2019). Outros estudos *in vitro* utilizando células de neuroblastoma SH-SY5Y

demonstraram que a GUO previne apoptose induzida por MPP⁺ (Pettifer et al., 2007). Em um modelo celular de exposição a 6-OHDA, a GUO aumentou a fosforilação da proteína Akt e a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, duas vias de sinalização intracelular favoráveis a sobrevivência celular (Giuliani et al., 2012). *In vivo*, quando administrada oralmente nas doses de 7,5 mg/kg, GUO apresenta efeito anti-discinético frente ao tratamento com reserpina, que induz discinesias orofaciais devido à depleção de monoaminas (Massari et al., 2017). Outra sugestão do efeito neuroprotetor da GUO foi observado em um modelo transgênico da DP com α -sinucleína A53T. Nesse estudo, a análise metabolômica mostrou tanto os animais idosos com a mutação A53T apresentavam um aumento dos níveis de GUO no cérebro (Chen et al., 2015). Na mesma linha, foi demonstrado que camundongos A53T apresentavam dano motor precoce com um mês de idade, esse efeito foi correlacionado com a diminuição dos níveis de GUO em animais A53T jovens (Lin et al., 2012). Assim, o aumento dos níveis de GUO nos animais transgênicos idosos poderia representar um mecanismo compensatório neuroprotetor.

Nenhum estudo utilizando modelos animais que mimetizem os sintomas não-motores da DP avaliou o efeito da GUO, porém estudos prévios demonstraram o efeito tipo-antidepressivo da GUO (Bettio et al., 2012), sendo a depressão é um dos sintomas não-motores mais bem estabelecidos na DP. Nesses estudos, foi demonstrado que o tratamento agudo com GUO (5 mg/kg) diminui o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e teste do nado forçado, dois testes comportamentais utilizados como preditivos para efeitos tipo antidepressivo (Bettio et al., 2012).

Apesar dos inúmeros estudos, o exato mecanismo de ação da GUO ainda não é conhecido, o que reforça a necessidade de investigação dos eventos celulares que medeiam a neuroproteção. Os estudos *in vitro* tem demonstrado grande relevância na avaliação dos mecanismos relacionados com os efeitos neuroprotetores da GUO. Dessa forma, nesse estudo, usando estratégias *in vitro* e *in vivo* serão avaliados os efeitos da GUO em diferentes modelos da DP usando protocolos com toxinas em ratos, especificamente estudando a capacidade protetora nos eventos celulares e comportamentais que antecedem o desenvolvimento de sintomas motores.

2 JUSTIFICATIVA

A DP é a principal doença que afeta o controle motor e a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo. Sendo o envelhecimento o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença, é esperado um grande aumento da prevalência da DP nas próximas décadas, em virtude do aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento populacional. Classicamente, a DP é descrita como uma doença motora e seu diagnóstico é baseado na presença de três sintomas ou mais sintomas motores como rigidez, tremor de repouso e bradicinesia. O estudo da DP levou a descoberta de vários mecanismos relacionados com a patogênese da doença e ao estagiamento dos chamados sintomas não-motores, esclarecendo mecanismos relacionados com a progressão da doença. Apesar disso, os tratamentos atuais são paliativos, não impedem a progressão da doença e são ineficazes para pacientes em estágios mais avançados. Além disso, os efeitos colaterais são significativamente graves, como é o caso do desenvolvimento de discinesia no tratamento com L-DOPA.

A guanosina tem demonstrado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, efeito neuroprotetor em modelos de doenças neurodegenerativas. Em modelos da DP, já demonstrou efeitos protetores *in vitro* e *in vivo* contra danos celulares induzidos por modelos baseados em toxinas e contra discinesia induzida por L-DOPA, além de catalepsia induzida em modelo com reserpina. Apesar do potencial antiparkinsoniano em modelos experimentais já demonstrado na literatura, nenhum estudo avaliou os efeitos da GUO em modelos que mimetizam os sintomas não-motores da DP. Além disso, o efeito da guanosina no sistema dopaminérgico é pouco

explorado na literatura apesar de inúmeros estudos mostrarem seu efeito neuroprotetor. O fato de ser uma substância endógena e não tóxica enriquece o interesse em analisar seu efeito em modelos de doenças neurodegenerativas como da DP.

O presente estudo buscou num primeiro momento avaliar os efeitos da GUO em um modelo *in vitro* da DP utilizando 6-OHDA em diferentes regiões do cérebro contra alterações consideradas eventos celulares precoces da patologia da doença. Para investigar o efeito da GUO em alterações comportamentais não-motores da DP, utilizamos dois modelos experimentais, a infusão intranasal de MPTP e a infusão intraestriatal de 6-OHDA, dando ênfase ao déficit olfatório e a depressão, respectivamente. Adicionalmente investigamos alguns parâmetros bioquímicos relacionados com a patogênese da DP no bulbo olfatório (MPTP), córtex, estriado e hipocampo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da Guanosina sobre alterações comportamentais e bioquímicas em modelos experimentais que mimetizam eventos celulares iniciais e sintomas não-motores da doença de Parkinson.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar os efeitos *in vitro* da GUO na toxicidade induzida por 6-OHDA em fatias de córtex, estriado e hipocampo de ratos;

3.2.2 Avaliar os efeitos *in vivo* da GUO em parâmetros comportamentais e bioquímicos, utilizando o protocolo de infusão de 6-OHDA no estriado de ratos;

3.2.3 Avaliar os efeitos *in vivo* da GUO em parâmetros comportamentais e bioquímicos em modelo experimental com infusão intranasal de MPTP em ratos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados para realização dos experimentos contidos nesta tese encontram-se nos respectivos capítulos da mesma, descritos na sessão dos resultados.

5 RESULTADOS

Os resultados desta tese estão divididos na forma de capítulos serão apresentados na forma de 3 artigos científicos, seguindo a distribuição abaixo:

- Capítulo I: *“Guanosine protects striatal slices against oxidative damage, mitochondrial dysfunction and ATP depletion in 6-OHDA-induced toxicity in vitro”*
- Capítulo II: *“Guanosine prevents depressive-like behaviors in rats following bilateral dorsolateral striatum lesion induced by 6-hydroxydopamine”*
- Capítulo III: *“Evaluation of guanosine effects following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) infusion in rats: implications on behavioral and biochemical changes related to non-motor symptoms of Parkinson’s disease”*

CAPÍTULO I

Guanosine Protects Striatal Slices Against 6-OHDA-Induced Oxidative Damage, Mitochondrial Dysfunction, and ATP Depletion

Este capítulo apresenta os resultados relacionados ao objetivo específicos I desta tese. Avaliamos o efeito neuroprotetor da GUO em um modelo *in vitro* que foi recentemente padronizado em nosso laboratório com o objetivo de identificar possíveis agentes neuroprotetores para os eventos celulares iniciais relacionados a DP. Os resultados referentes ao efeito da GUO em fatias de córtex, estriado e hipocampo de ratos expostos a 6-OHDA *in vitro* estão apresentados como o artigo científico intitulado “*Guanosine Protects Striatal Slices Against 6-OHDA-Induced Oxidative Damage, Mitochondrial Dysfunction, and ATP Depletion*” publicado no periódico *Neurotoxicity Research*.



Guanosine Protects Striatal Slices Against 6-OHDA-Induced Oxidative Damage, Mitochondrial Dysfunction, and ATP Depletion

Naiani Ferreira Marques¹ · Caio Marcos Massari¹ · Carla Inês Tasca^{1,2} Received: 3 July 2018 / Revised: 26 October 2018 / Accepted: 30 October 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by loss of dopaminergic neurons in *substantia nigra pars compacta* which induces severe motor symptoms. 6-OHDA is a neurotoxin widely used in PD animal models due to its high affinity by dopamine transporter, its rapid non-enzymatic auto-oxidation which generates reactive oxygen species (ROS), oxidative stress, and for induced mitochondrial dysfunction. We previously reported an in vitro protocol of 6-OHDA-induced toxicity in brain regions slices, as a simple and sensitive assay to screen for protective compounds related to PD. Guanosine (GUO), a guanine-based purine nucleoside, is a neuroprotective molecule that is showing promising effects as an antiparkinsonian agent. To investigate the mechanisms involved on GUO-induced neuroprotection, slices of cortex, striatum, and hippocampus were incubated with GUO in the presence of 6-OHDA (100 μ M). 6-OHDA promoted a decrease in cellular viability and increased ROS generation in all brain regions. Disruption of mitochondrial potential, depletion in intracellular ATP levels, and increase in cell membrane permeabilization were evidenced in striatal slices. GUO prevented the increase in ROS generation, disruption in mitochondrial potential, and depletion of intracellular ATP induced by 6-OHDA in striatal slices. In conclusion, GUO was effective to prevent oxidative events before cell damage, such as mitochondrial disruption, intracellular ATP levels depletion, and ROS generation in striatal slices subjected to in vitro 6-OHDA-induced toxicity.

Keywords Parkinson's disease · 6-OHDA · Guanosine · In vitro

Abbreviations

6-OHDA	6-Hydroxydopamine
GUO	Guanosine
KRB	Krebs–Ringer buffer
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DCFH-DA	Dichlorodihydrofluorescein diacetate
DCFH	Dichlorodihydrofluorescein
DCF	Dichlorofluorescein
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone

PD	Parkinson's disease
ROS	Reactive oxygen species
TMRE	Tetramethylrhodamine ethyl ester
PI	Propidium iodide

Introduction

Parkinson's disease (PD) is an age-associated neurodegenerative disorder affecting 1–2% of people aged over 65 years and 4% of people aged over 85, characterized by a loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) leading to a subsequent depletion of dopamine in the striatum (de Lau and Breteler 2006). Also, other neurotransmitters and other brain areas are involved in the pathophysiology of this disease, including the hippocampus and cerebral cortex (Braak et al. 2004). Even though the neuropathological hallmarks of PD are well described, the specific biochemical mechanism responsible for the degeneration and disease progression remains unclear. Notably, studies suggest that

✉ Carla Inês Tasca
carla.tasca@ufsc.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

² Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brazil

mitochondrial dysfunction is a relevant target in PD pathogenesis (Bose and Beal 2016).

Mitochondria is the main source of ATP production, essential for the survival and maintenance of neurons, and protein phosphorylation reactions that mediate synaptic signaling in neuronal function (Parker et al. 1989). Alterations in mitochondrial complexes of the respiratory chain have a direct impact on the overall energy state of the cell. A deficiency in complex I activity (about 35% of activity reduction) was described in *post-mortem* studies in the *substantia nigra* and cortex of PD patients (Mizuno et al. 1989; Navarro et al. 2009).

PD studies are mainly reported using toxins designed to mimic the neurodegeneration in the nigrostriatal pathway. 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induces dopaminergic degeneration due to a high affinity for the dopaminergic transporter (Garver et al. 1975). Once inside the neuron, 6-OHDA crosses mitochondrial membranes and inhibit the complex I activity in the electron transport chain (Perier and Vila 2012). Also, 6-OHDA can accumulate in the cytosol, where it undergoes a non-enzymatic auto-oxidation, promoting reactive oxygen species (ROS) formation (Blandini et al. 2008). In vitro evaluation of 6-OHDA toxicity showed it directly inhibits mitochondrial complex I and IV, without involving a free-radical mechanism (Glinka and Youdim 1995). This effect might be an earlier toxic event followed by free radicals toxicity in the cytosol, which occurs lately and probably is responsible for lipid peroxidation in vitro. Therefore, 6-OHDA causes respiratory inhibition and oxidative stress, and both toxic mechanisms are not necessarily linked, but appear to act synergistically during neuron degeneration (Schober 2004). Due to these effects, 6-OHDA is one of the most used toxins for PD models and is a great tool for screening possible neuroprotective agents (Kostrzewa and Jacobowitz 1974; Segura-Aguilar and Kostrzewa 2015).

Several studies have shown that guanosine (GUO) protects against toxic events in the central nervous system (CNS), mainly attenuating excitotoxicity and mitochondrial damage (Thomaz et al. 2016; Dal-Cim et al. 2012; Dobrachinski et al. 2017). In a parkinsonism rodent model induced by a proteasome inhibitor, GUO showed protective effects against neuronal apoptotic cell death, increased tyrosine hydroxylase-positive cells in the SNpc with consequent improvement in motor function (Su et al. 2009). In this model, it was also demonstrated that GUO induced cellular proliferation in the SNpc and subventricular zone and increased expression of fibroblast growth factor. These results point to GUO as a promising therapeutic strategy in neurodegenerative disease, and specifically in PD.

Our group established a 6-OHDA-induced toxicity protocol in brain slices as an in vitro model, to evaluate neuroprotective agents related to PD. We showed that in vitro incubation with 6-OHDA induced increase in ROS generation, decrease in cellular viability in the cortical, striatal, and

hippocampal slices, and disruption in mitochondrial membrane potential in the cortex and striatum (Massari et al. 2016). Oxidative stress is reported as an important factor in early biochemical events in the pathogenesis of PD, before cell death and neurodegeneration process advance (Dias et al. 2013; Poewe et al. 2017). In the present study, we improved information on this new in vitro protocol of evaluating 6-OHDA-induced toxicity, by showing there is a selective loss of mitochondrial membrane potential and depletion of ATP levels in the striatal slices, followed by an increased cellular membrane permeabilization. Additionally, GUO prevented 6-OHDA-induced mitochondrial stress and ATP depletion in the striatal slices, displaying its protective effect against a PD-related toxin.

Materials and Methods

Animals

Male *Wistar* rats (3 months old, 350–400 g) were obtained for local colony, maintained in a 12-h dark/light cycle, at constant room temperature at 23 ± 1 °C and with food and water *ad libitum*. Experiments followed the “The ARRIVE Guidelines” published in 2010 and were approved by the local Ethical Committee for Animal Research (CEUA/UFSC PP00955).

Preparation of Brain Slices

Animals were euthanized and the whole brain was quickly removed and placed on ice. The cortex, striatum, and hippocampus were rapidly dissected in ice-cold Krebs–Ringer buffer (KRB) (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.3 mM CaCl₂, 0.4 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, and 10 mM D-glucose, bubbled with 95% CO₂/ 5% O₂ up to pH 7.4). Slices (0.4 mm) were prepared using a McIlwain Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., England) and separated in KRB at 4 °C. After sectioning, slices were incubated in 500 µL of KRB for each slice for 30 min, at 37 °C, for recovery from trauma slicing before starting the experiment.

Slices Treatment

6-OHDA (Sigma, St. Louis, MO, USA) was diluted in water at 0.1% sodium metabisulfite for avoiding oxidation and stored at –20 °C. For the experiment, 6-OHDA was diluted at 100 µM in KRB. To investigate 6-OHDA-induced damage, one slice from each brain region was selected and exposed to 6-OHDA (100 µM) during 1 h (Massari et al. 2016). GUO (Sigma, St. Louis, MO, USA) was diluted in KRB (at 30, 100, or 300 µM) and co-incubated with 6-OHDA for 1 h to determine its potential neuroprotective effect. Slices of control

group were incubated in a physiological KRB at 500 μL for each slice. All experiments were performed in triplicates. After the 1 h of co-incubation with 6-OHDA and GUO, ROS production, mitochondrial membrane potential, intracellular ATP levels, and membrane permeability were evaluated. In another set of experiments, following 6-OHDA + GUO co-incubation, slices were maintained for additional 3 h in a nutritive culture medium (DMEM/F12) composed of 50% KRB, 50% DMEM, and 20 mM HEPES, at 37 °C in a CO₂ atmosphere (Molz et al. 2008). After 3 h, cellular viability and membrane permeability parameters were assessed.

Cellular Viability and Membrane Integrity Evaluation

Cellular viability in the cortical, striatal, and hippocampal slices was quantified by measuring the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to a dark violet formazan product by mitochondrial dehydrogenases (Mosmann 1983; Liu et al. 1997). After 1 h of co-incubation with 6-OHDA and GUO and additional 3 h in culture medium, cellular viability was assessed. Slices were incubated with 500 μL of MTT (0.5 mg/mL) in KRB buffer for 20 min at 37 °C, and the formazan produced was solubilized by replacing the medium with 0.2 mL of dimethylsulfoxide (DMSO), resulting in a colored compound which was quantified spectrophotometrically at a wavelength of 550 nm.

Membrane integrity was assessed by evaluating uptake of the fluorescent exclusion dye propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). PI is a polar compound that enters only in cells with damaged membranes. Once inside the cells, PI complexes with DNA and emits an intense red fluorescence (630 nm) when excited by green light (495 nm). Following GUO and 6-OHDA co-incubation (1 h) or GUO and 6-OHDA co-incubation plus 3 additional hours in the nutritive culture medium, slices were incubated with 500 μL of PI (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and maintained for 30 min at 37 °C, and then washed with KRB for analysis on a fluorescence microplate reader TECAN (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland) (Piermartiri et al. 2009).

ROS Generation and Mitochondrial Membrane Potential

ROS generation was measured by using the molecular probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), which diffuses through the cell membrane and is hydrolyzed by intracellular esterases to the non-fluorescent form dichlorodihydrofluorescein (DCFH). DCFH reacts with intracellular ROS to form dichlorofluorescein (DCF), a green fluorescent dye. DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of ROS. Brain slices were incubated with 500 μL of DCFH-DA (80 μM) for 30 min at 37 °C and then washed and kept in KRB. Fluorescence was measured in

one slice from brain regions, assayed in triplicates, using excitation and emission wavelengths of 480 and 525 nm, respectively.

Mitochondrial membrane potential was measured using the molecular probe tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (100 nM) for 30 min at 37 °C (Egea et al. 2007). Fluorescence was measured using wavelengths of excitation and emission of 550 and 590 nm, respectively. Results were obtained as relative fluorescence units (RFU) from individual experiments. RFU variation among the experiments was normalized by expressing data as means and SEM of percentage relative to controls. Both ROS generation and mitochondrial membrane potential measurements were carried out after 1 h of GUO + 6-OHDA co-incubation.

Intracellular ATP Levels

After GUO and 6-OHDA co-treatment, the brain cortical, striatal, and hippocampal slices were homogenized in 320 μL of trichloroacetic acid (TCA) 2% aqueous solution. The homogenates were centrifuged at 14,000 rpm at 4 °C for 3 min. The supernatants were used for determination of ATP levels using a bioluminescent assay kit (catalog code FLAA) according to the manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Triplicates of 100 μL from the supernatant were incubated with the mix assay and ATP levels measured after 3 min of incubation at room temperature. The amount of protein in each sample was quantified using the method of (Lowry et al. 1951) and the results are expressed in μM ATP/ μg of protein in each sample (a pool of 3 slices per region). Bovine serum albumin (Sigma) was used as standard.

Statistical Analysis

Data are normalized among the experiments and represented as means and SEM of percentage of controls. Comparisons among experimental and control groups were performed by one- or two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post hoc test when appropriate. Statistical difference was accepted when $p < 0.05$.

Results

Cellular Viability

Previous results from our group showed that 6-OHDA (100 μM) causes an effective toxicity in brain slices (Massari et al. 2016). Now, to determine an effective GUO concentration that protects the brain slices from 6-OHDA toxicity, the cortical, striatal, and hippocampal slices were co-incubated with increasing GUO concentrations of 30, 100,

or 300 μM (Fig. 1a). As expected, we observed a decrease in cell viability in slices from the cortex, striatum, and hippocampus when incubated with 6-OHDA (Fig. 1 b, c, d). The co-incubation with GUO did not protect the cortical slices, at any concentration tested (Fig. 1b). However, in the striatal slices, we observed GUO attenuated 6-OHDA-induced reduction of cellular viability, in all GUO concentrations tested, although no statistical difference was observed among 6-OHDA and 6-OHDA + GUO groups (Fig. 1c). In the hippocampal slices, only 100 μM GUO attenuated the decreased cell viability induced by 6-OHDA, although it also did not reach statistical significance when compared to 6-OHDA group (Fig. 1d). Despite GUO effect did not reach statistical significance, attenuation (about 20%) of 6-OHDA-induced toxicity is observed. Thus, considering previous studies from our group showing a protective effect of GUO in *in vitro* neurotoxicity protocols (Dal-Cim et al. 2013a; Thomaz et al. 2016; Dal-Cim et al. 2011; Molz et al. 2011), next evaluations were conducted with 100 μM GUO.

ROS Generation

6-OHDA-induced toxicity is mainly attributed to a production of reactive species, mostly hydrogen peroxide (Schober 2004). Therefore, we evaluated early toxic effects of 6-OHDA as induction of ROS production (Fig. 2a). Slices incubated with 6-OHDA showed a significant increase in ROS generation in the striatum and hippocampus (Fig. 2c, d). In the cortical slices, 6-OHDA induced a slight increase in ROS

generation that did not reach statistical significance (Fig. 2b). Co-incubation with GUO displayed a total reduction of ROS generation in the striatal slices (Fig. 2c). In the hippocampus, reduction of ROS generation was also observed, although a significance of $p = 0.07$ was achieved (Fig. 2c).

Mitochondrial Membrane Potential and Intracellular ATP Levels

To evaluate the mitochondrial membrane potential in slices, we used the lipophilic and slightly cationic fluorescent dye TMRE (Fig. 3a). The cortical and hippocampal slices incubated with 100 μM 6-OHDA showed no significant alterations in TMRE fluorescence when compared with control group (Fig. 3b, d). However, in the striatal slices, we observed a significant decreased of TMRE fluorescence (Fig. 3c). Decrease in fluorescence can be related to a mitochondrial membrane depolarization, as the same effect was observed when slices were incubated with carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 10 μM), a mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler, as we previously showed (Massari et al. 2016). In the striatal slices, GUO treatment prevents the mitochondrial membrane depolarization (Fig. 3c), showing a protective effect in the mitochondrial disruption induced by 6-OHDA. Thus, in order to evaluate the effects of 6-OHDA in cellular energetic balance, we performed the measurement of intracellular levels of ATP in brain slices.

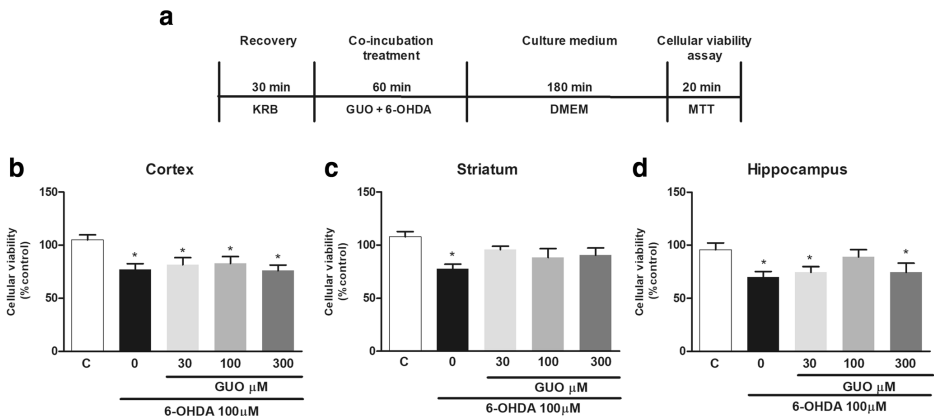


Fig. 1 Cellular viability measured in slices subjected to 6-OHDA-induced toxicity and GUO treatment *in vitro*. Timeline of experimental protocol *in vitro* (a) in cortical (b), striatal (c), and hippocampal (d) slices. Slices were co-incubated for 1 h with 100 μM 6-OHDA and GUO (30–300 μM) at 37 $^{\circ}\text{C}$ and then, the medium was changed to a fresh culture medium for 3 h. Cellular viability was measured by MTT reduction assay

as described in material and methods. Data are expressed as percentage of controls normalized among individual experiments and represent means with SEM ($n = 5$). Absolute values of optical density of control groups were 2038 ± 0.15 in cortical, 1725 ± 0.34 in striatal, and 1256 ± 0.15 in hippocampal slices. $p < 0.05$ compared with control (*) or 6-OHDA (#) groups (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls' test)

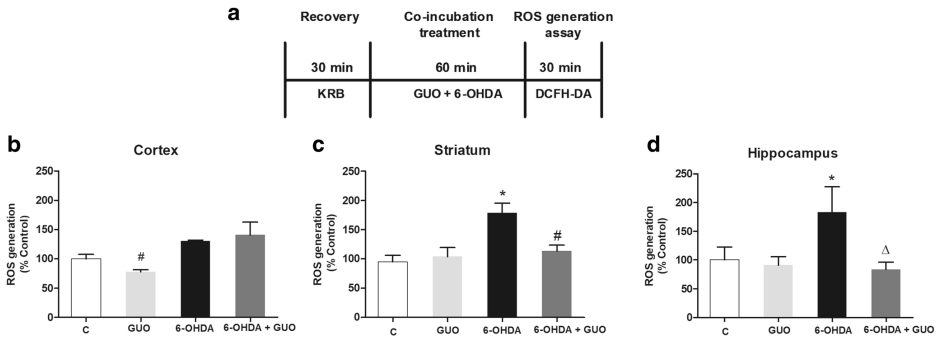


Fig. 2 ROS generation in slices subjected to 6-OHDA-induced toxicity and GUO treatment in vitro. ROS generation was measured by relative fluorescence units (RFU) of DCF probe emission. Timeline of experimental protocol in vitro (a) in cortical (b), striatal (c), and hippocampal (d) slices. Slices were co-incubated for 1 h with 100 μ M 6-OHDA and 100 μ M GUO at 37 $^{\circ}$ C. Data are expressed as percentage of controls

normalized among individual experiments and represent means with SEM ($n=5$). RFU for control groups were $11,247 \pm 1169$ in cortical, $13,953 \pm 1711$ in striatal, and $10,138 \pm 2250$ in hippocampal slices. $p=0.07$ when compared with 6-OHDA group (Δ), and $p<0.05$ compared with control (*) or 6-OHDA (#) groups (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls' test)

6-OHDA induced a reduction in the intracellular ATP levels in the striatum slices, but not in the cortical and hippocampal slices (Fig. 4b, c, d). This selectivity to this damaged area is in accordance which was observed in the mitochondrial membrane potential evaluation, as mitochondrial depolarization might cause ATP depletion. Therefore, we observe mitochondrial membrane disruption and ATP depletion in the striatal slices (Fig. 3c and Fig. 4c). Importantly, GUO treatment prevented both effects in the striatum, which indicates that GUO protects brain slices against energetic imbalance induced by 6-OHDA toxicity in the mitochondrial function.

Membrane Integrity Evaluation

Following ROS generation, loss of mitochondrial potential and reduction of bioenergetics, increased cell damage might occur. Then we evaluated the membrane integrity of cells from brain slices due to the uptake of the fluorescent exclusion dye PI after 1 h of 6-OHDA and GUO co-incubation and after 1 h of co-incubation plus 3 h of maintenance in culture medium. After 1 h of incubation with 6-OHDA, we did not observe any alteration in PI incorporation in all structures (Fig. 5c, d, e). However, when evaluated 3 h after 6-OHDA

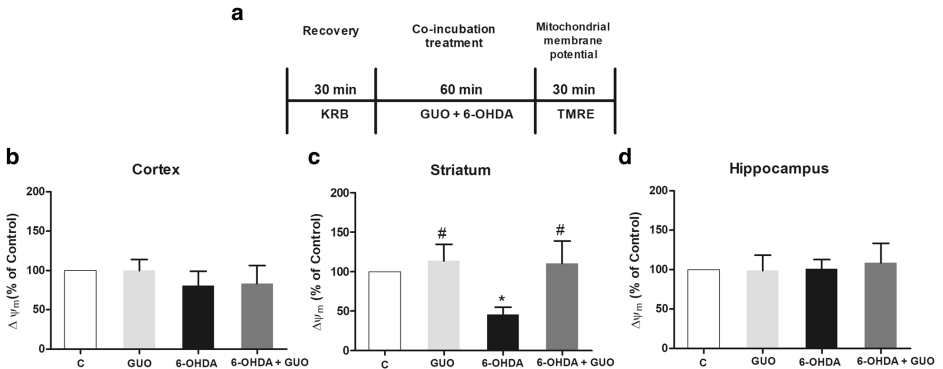


Fig. 3 Evaluation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in slices subjected to 6-OHDA-induced toxicity and GUO treatment in vitro. Mitochondrial membrane potential was measured by relative fluorescence units (RFU) of TMRE probe (100 nM). Timeline of experimental protocol in vitro (a) in cortical (b), striatal (c) and hippocampal (d) slices. Slices were co-incubated for 1 h with 100 μ M 6-OHDA and 100 μ M

GUO at 37 $^{\circ}$ C. Data are expressed as percentage of controls and represent means with SEM ($n=5$). RFU for control groups were $303,856 \pm 107,370$ in cortical, $295,068 \pm 130,535$ in striatal, and $176,654 \pm 79,006$ in hippocampal slices. $p<0.05$ compared with control (*) or 6-OHDA (#) groups (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls' test)

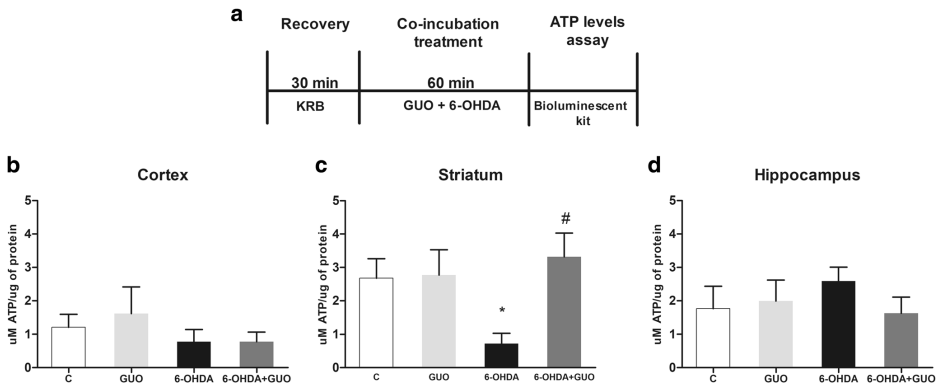


Fig. 4 Intracellular ATP levels in slices subjected to 6-OHDA-induced toxicity and GUO treatment in vitro. Timeline of experimental protocol in vitro (a) in cortical (b), striatal (c) and hippocampal (d) slices. Slices were co-incubated with 100 μ M 6-OHDA and 100 μ M GUO at 37 $^{\circ}$ C for

1 h. Intracellular ATP levels were measured by a bioluminescent assay kit as described in methods. Data represent means with SEM of five experiments ($n = 5$), $p < 0.05$ compared with control (*) or 6-OHDA (#) groups (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls' test)

incubation, we observed significant increased PI incorporation in the striatum (Fig. 5d), showing that cellular membrane permeabilization needs more time to develop and be detected. GUO co-incubation with 6-OHDA promoted an attenuation of PI incorporation (about 30%) in the striatum slices, although it did not reach statistical significance ($p = 0.2096$) (Fig. 5d).

Discussion

In vitro studies have been extensively used to understand the molecular events related to neurological diseases. PD is mainly considered a motor disease due to the degeneration in dopaminergic neurons that project to the striatum and are responsible for motor function modulation. However, it is known

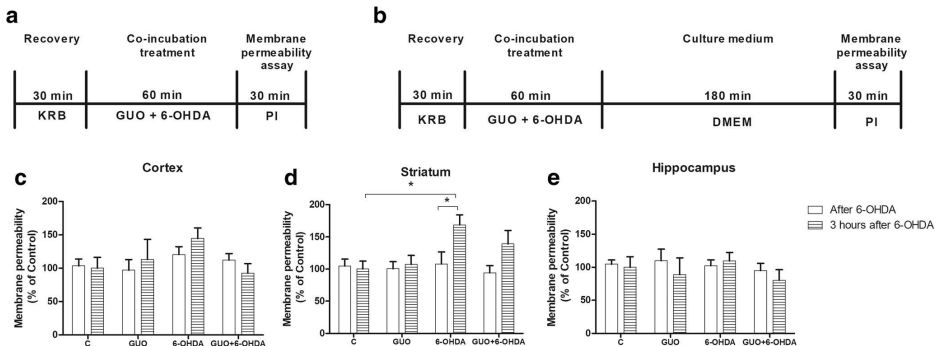


Fig. 5 Evaluation of cell membrane permeabilization by propidium iodide (PI) incorporation in slices after 1 h (a) or after 3 h (b) of co-incubation in vitro. Timeline of experimental protocol in vitro (a and b), in cortical (c), striatal (d), and hippocampal (e) slices. Slices were co-incubated with 100 μ M 6-OHDA and 100 μ M GUO at 37 $^{\circ}$ C for 1 h. In the first protocol (a), slices were incubated with PI (7 μ g/mL) after the co-incubation, while in the second protocol (b), after the co-incubation, the medium was changed to a fresh culture medium (DMEM) and

slices maintained for 3 h and then incubated with PI. Data expressed as percentage of controls normalized among individual experiments and represent means with SEM ($n = 5$). Relative fluorescence units (RFU) for control groups after 1 h were 25,361 \pm 2744 in cortical, 29,005 \pm 3222 in striatal, and 17,138 \pm 1220 in hippocampal slices; and after 3 h were 15,424 \pm 8369, 17,261 \pm 2105, and 13,793 \pm 2186 in cortical, striatal, and hippocampal slices, respectively. $p < 0.05$ compared with control group (*) (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls' test)

that other brain areas are also involved in this disease, being affected by accumulation of α -synuclein, Lewy bodies, and other PD pathophysiology characteristics (Goedert et al. 2013; Przedborski 2017). Thus, we performed an in vitro study to evaluate 6-OHDA-induced toxicity in brain slices from regions related with molecular events during PD progression. Here, we demonstrated GUO exerts a neuroprotective effect in the striatal slices against 6-OHDA-induced biochemical changes which leads to the cell damage. 6-OHDA decreased the cellular viability in the cortical, striatal, and hippocampal slices, according to previous study from our group (Massari et al. 2016). Also, GUO (100 μ M) attenuated 6-OHDA-induced damage in the hippocampal and striatal slices.

Additionally, we analyzed the PI incorporation 1 h after incubation with 6-OHDA and we did not observe any alterations in brain regions. Thus, we speculate that initial alterations in ROS generation and mitochondrial membrane potential induced by 6-OHDA incubation could lead a lipid membrane damage, which we observed in PI incorporation assay 3 h after 6-OHDA incubation in the striatum slices. Previous studies demonstrated 6-OHDA-induced lipid peroxidation in rat striatal slices at 300 μ M (Cunha et al. 2014) and in PC12 cells at 100 μ M (Magalingam et al. 2014). As expected, 6-OHDA increases ROS generation in brain slices from the striatum and hippocampus, we observed an increase of 30% in ROS generation in the cortex; however, this result did not show statistical difference as previously demonstrated (Massari et al. 2016). GUO 100 μ M protects brain slices against ROS

generation induced by 6-OHDA in the striatum and hippocampus, also protects the hippocampal slices against oxygen and glucose deprivation (Thomaz et al. 2016). This increase in ROS generation can be due the auto-oxidation of 6-OHDA in cellular cytosol, as well as the disruption of the energetic metabolism by the inhibition of complex I in the mitochondria (Blandini et al. 2008), both related with aging and neurodegenerative disease. It was also showed that 6-OHDA can generate hydroxyl radicals (OH) which can react with deoxyguanosine (Herraiz and Galisteo 2015). Then, one might speculate that the mechanism of GUO protection against 6-OHDA could be due to interaction with free radicals generated by 6-OHDA. However, we recently demonstrated that GUO did not present scavenger activity against the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical at different concentrations (Thomaz et al. 2016).

Regarding the effects of 6-OHDA in the mitochondrial membrane potential, we observed a restrict disruption in the striatum. Previous studies have shown differences in toxic effects between brain regions due to the difference of dopamine transporter (DAT) expression (Block et al. 2015; Hong et al. 2015). Whereas the striatum presented a major expression of DAT when compared with the hippocampus and cortex (Block et al. 2015), which would cause a lower accumulation of the toxin in the intracellular space in these regions compared with the striatum. Decreased TMRE fluorescence observed can be interpreted as a mitochondrial membrane depolarization, since FCCP (a mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler) produces similar results (Massari et al.

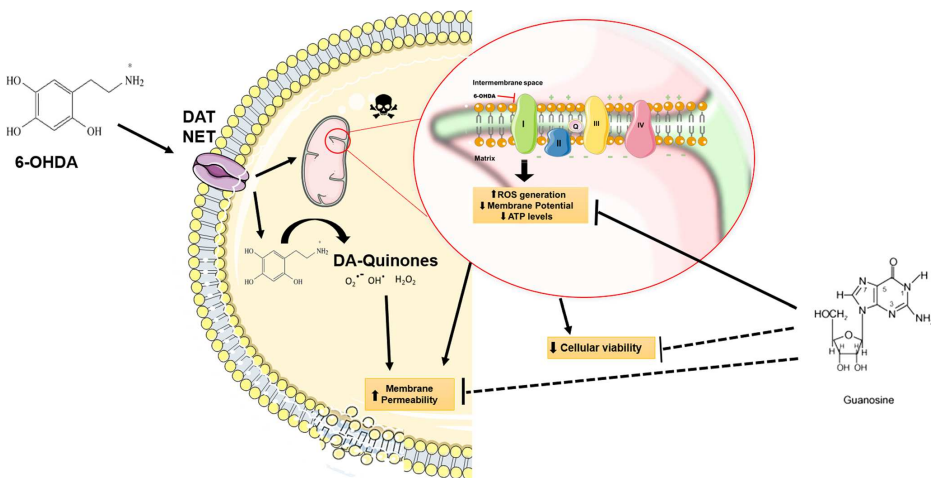


Fig. 6 Proposed mechanism of neuroprotection afforded by GUO against 6-OHDA toxicity in vitro in striatal slices. 6-OHDA increases ROS generation and membrane permeability, besides causing a decrease in ATP levels and loss of mitochondrial membrane potential. Guanosine protects

striatal slices against oxidative damage, mitochondrial dysfunction, and ATP depletion evoked by in vitro 6-OHDA-induced toxicity. Guanosine also attenuates membrane permeability and cellular viability alterations induced by 6-OHDA (dashed arrow)

2016). Once again, GUO protects the striatum slices, maintaining the normal mitochondrial membrane potential.

Guanosine *in vitro* exerts neuroprotective effect by regulating mitochondrial function and nitroxidative stress in an ischemic-like *in vitro* protocol (Thomaz et al. 2016; Dal-Cim et al. 2012; Dal-Cim et al. 2013b). These effects of guanosine were accompanied by prevention of damaging modulators that are active during an oxidative situation, such as reduction of the transcription factor NF- κ B and inducible nitric oxide synthase expressions (Dal-Cim et al. 2013a). Dysfunction in the mitochondrial respiratory chain and oxidative stress can also lead to reduction in ATP production. Therefore, we evaluated the intracellular ATP in brain regions and observed that GUO protects the striatal slices from 6-OHDA-induced ATP depletion. Then, GUO protects mitochondrial membrane potential and functionality by the capability of maintenance of intracellular ATP levels in the striatal slices.

Although the exact mechanisms of action of GUO are still not completely elucidated, this purine has clearly been shown to exert therapeutic potential, acting as a neuromodulator in experimental models of several brain disorders. The neuroprotective effect seems to be mainly due to capacity of modulating and protecting against cellular toxic mechanisms such as glutamatergic excitotoxicity, oxidative, nitroxidative stress, and mitochondrial disruption (Lanznaster et al. 2016). Some of these protective effects are dependent of adenosine receptors modulation and MAPK/ERK signaling pathways (Dal-Cim et al. 2013b). Further experiments are necessary to understand the mechanisms of GUO in this 6-OHDA-induced toxicity *in vitro*. Besides these *in vitro* evaluations, recently, we reported GUO showed promising results in *in vivo* studies, being effective to reverse motor deficits in two animal models of PD. GUO orally administered to mice or rats protected against reserpine-induced catalepsy, tremulous jaw movements, and L-DOPA-induced dyskinesia (Massari et al. 2017).

In summary, we observed a selective toxicity of 6-OHDA in the striatal slices from rats as compared with the cortical and hippocampal slices *in vitro*. In the striatal slices, 6-OHDA induces an increase in ROS generation, a decrease of cellular viability, a disruption in mitochondrial membrane potential, a depletion of intracellular ATP levels, and an increase in cellular membrane permeability. GUO protects the striatal slices against increased ROS generation, disruption of mitochondrial membrane potential, and depletion in intracellular ATP levels (Fig. 6). Guanosine prevents some of the cellular toxic events induced by 6-OHDA, protecting against disruption of mitochondrial-related process.

Funding Information Research supported by grants from the Brazilian funding agencies, CAPES (CAPES/PAJT), CNPq (INCT-EN for Excitotoxicity and Neuroprotection) and FAPESC (NENASC/PRONEX) to C.I.T. is recipient of CNPq productivity fellowship.

Compliance with Ethical Standards

Experiments followed the “The ARRIVE Guidelines” published in 2010 and were approved by the local Ethical Committee for Animal Research (CEUA/UFSC PP00955).

References

- Blandini F, Armentero MT, Martignoni E (2008) The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord* 14(Suppl 2):S124–S129. <https://doi.org/10.1016/j.parkreidis.2008.04.015>
- Block ER, Nuttle J, Balcita-Pedicon JJ, Caltagarene J, Watkins SC, Sesack SR, Sorkin A (2015) Brain region-specific trafficking of the dopamine transporter. *J Neurosci* 35(37):12845–12858. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1391-15.2015>
- Bose A, Beal MF (2016) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem* 139(Suppl 1):216–231. <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>
- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318(1):121–134. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>
- Cunha MP, Martin-de-Saavedra MD, Romero A, Egea J, Ludka FK, Tasca CI, Farina M, Rodrigues ALS, López MG (2014) Both creatine and its product phosphocreatine reduce oxidative stress and afford neuroprotection in an *in vitro* Parkinson's model. *ASN Neuro* 6(6):175909141455494. <https://doi.org/10.1177/1759091414554945>
- Dal-Cim T, Ludka FK, Martins WC, Reginato C, Parada E, Egea J, López MG, Tasca CI (2013a) Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions (research support, non-U.S. Gov't). *J Neurochem* 126(4):437–450. <https://doi.org/10.1111/jnc.12324>
- Dal-Cim T, Ludka FK, Martins WC, Reginato C, Parada E, Egea J, López MG, Tasca CI (2013b) Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. *J Neurochem* 126(4):437–450. <https://doi.org/10.1111/jnc.12324>
- Dal-Cim T, Martins WC, Santos AR, Tasca CI (2011) 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* 183:212–220. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.022>
- Dal-Cim T, Molz S, Egea J, Parada E, Romero A, Budni J, Martín de Saavedra MD, Barrio L, Tasca CI, López MG (2012) 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* 61(3):397–404. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.05.021>
- de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5(6):525–535. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9)
- Dias V, Junn E, Mouradian MM (2013) The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 3(4):461–491. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
- Dobrachinski F, da Rosa Gerbatin R, Sartori G, Ferreira Marques N, Zemolin AP, Almeida Silva LF, Franco JL, Freire Royes LF, Rechia Figuera M, Antunes Soares FA (2017) Regulation of mitochondrial function and glutamatergic system are the target of guanosine effect in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 34(7):1318–1328. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4563>

- Egea J, Rosa AO, Sobrado M, Gandía L, López MG, García AG (2007) Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice. *Neuroscience* 145(3):866–872. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.036>
- Garver DL, Cedarbaum J, Maas JW (1975) Blood-brain barrier to 6-hydroxydopamine: uptake by heart and brain. *Life Sci* 17(7):1081–1084
- Glinka YY, Youdim MB (1995) Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol* 292(3–4):329–332
- Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H (2013) 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 9(1):13–24. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.242>
- Herráiz T, Galisteo J (2015) Hydroxyl radical reactions and the radical scavenging activity of β -carboline alkaloids. *Food Chem* 172:640–649. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.091>
- Hong SJ, Zhang D, Zhang LH, Yang P, Wan J, Yu Y, Wang TH, Feng ZT, Li LH, Yew DTW (2015) Expression of dopamine transporter in the different cerebral regions of methamphetamine-dependent rats. *Hum Exp Toxicol* 34(7):707–717. <https://doi.org/10.1177/0960327114555929>
- Kostrzewa RM, Jacobowitz DM (1974) Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Rev* 26(3):199–288
- Lanznaster D, Dal-Cim T, Piemartiri TC, Tasca CI (2016) Guanosine: a neuromodulator with therapeutic potential in brain disorders. *Ageing Dis* 7(5):657–679. <https://doi.org/10.14336/AD.2016.0208>
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69(2):581–593
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275
- Magalingam KB, Radhakrishnan A, Haleagrahara N (2014) Protective effects of flavonol isoquercitrin, against 6-hydroxy dopamine (6-OHDA)-induced toxicity in PC12 cells. *BMC Res Notes* 7:49. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-49>
- Massari CM, Castro AA, Dal-Cim T, Lanznaster D, Tasca CI (2016) In vitro 6-hydroxydopamine-induced toxicity in striatal, cerebellar and hippocampal slices is attenuated by atorvastatin and MK-801. *Toxicol in Vitro* 37:162–168. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.09.015>
- Massari CM, López-Cano M, Núñez F, Fernández-Dueñas V, Tasca CI, Ciriuela F (2017) Antiparkinsonian efficacy of guanosine in rodent models of movement disorder. *Front Pharmacol* 8:700. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00700>
- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y (1989) Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 163(3):1450–1455
- Molz S, Dal-Cim T, Budni J, Martín-de-Saavedra MD, Egea J, Romero A, del Barrio L, Rodrigues ALS, López MG, Tasca CI (2011) Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase β pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. *J Neurosci Res* 89(9):1400–1408. <https://doi.org/10.1002/jnr.22681>
- Molz S, Decker H, Dal-Cim T, Cremonez C, Cordova FM, Leal RB, Tasca CI (2008) Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res* 33(1):27–36. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9402-1>
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1–2):55–63
- Navarro A, Boveris A, Bández MJ, Sánchez-Pino MJ, Gómez C, Muntané G, Ferrer I (2009) Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free Radic Biol Med* 46(12):1574–1580. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.007>
- Parker WD, Boyson SJ, Parks JK (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26(6):719–723. <https://doi.org/10.1002/ana.410260606>
- Perier C, Vila M (2012) Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(2):a009332. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009332>
- Piemartiri TC, Vandresen-Filho S, de Araújo Herculano B, Martins WC, Dal'agnolo D, Stroeh E et al (2009) Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res* 16(2):106–115. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9057-6>
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE (2017) Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 3:17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Przedborski S (2017) The two-century journey of Parkinson disease research. *Nat Rev Neurosci* 18(4):251–259. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.25>
- Schober A (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318(1):215–224. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0938-y>
- Segura-Aguilar J, Kostrzewa RM (2015) Neurotoxin mechanisms and processes relevant to Parkinson's disease: an update. *Neurotox Res* 27(3):328–354. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9519-y>
- Su C, Elfeki N, Ballerini P, D'Alimonte I, Bau C, Ciccarelli R, Caciagli F, Gabriele J, Jiang S (2009) Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism. *J Neurosci Res* 87(3):617–625. <https://doi.org/10.1002/jnr.21883>
- Thomaz DT, Dal-Cim TA, Martins WC, Cunha MP, Lanznaster D, de Bem AF, Tasca CI (2016) Guanosine prevents nitrooxidative stress and recovers mitochondrial membrane potential disruption in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. *Purinergic Signal* 12(4):707–718. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9534-3>

CAPÍTULO II

Guanosine prevents depressive-like behaviors in rats following bilateral dorsolateral striatum lesion induced by 6- hydroxydopamine

Este capítulo apresenta os resultados relacionados ao objetivo específicos II desta tese. Avaliamos o efeito neuroprotetor da GUO em um modelo *in vivo* com o objetivo demonstrar os efeitos da GUO em modelo animal que reproduz os sintomas não-motores da DP. Os resultados do Capítulo II estão apresentados como o artigo científico intitulado “*Guanosine prevents depressive-like behaviors in rats following bilateral dorsolateral striatum lesion induced by 6-hydroxydopamine*” submetido ao periódico *Behavior Brain Research*. Para as avaliações comportamentais presentes neste trabalho contamos com a colaboração do Laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Rui Prediger, LEXDON, do Departamento de Farmacologia da UFSC.

Guanosine prevents depressive-like behaviors in rats following bilateral dorsolateral striatum lesion induced by 6-hydroxydopamine

Naiani Ferreira Marques¹; Luisa Bandeira Binder²; Katiane Roversi³; Tuane Bazanella Sampaio³; Leandra Celso Constantino²; Rui Daniel Prediger^{2,3}, Carla Inês Tasca^{1,2*}

¹Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. ²Programa de Pós-Graduação em Neurociência, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. ³Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas, Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

***Corresponding author:**

Carla Inês Tasca, PhD

Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC

Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil

Telephone number: +55 48 3721-5046

E-mail address: carla.tasca@ufsc.br

ABSTRACT

The dorsolateral striatum (DLS) processes motor and non-motor functions and undergoes extensive dopaminergic degeneration in Parkinson's disease (PD). Beyond the nigrostriatal pathway, dopaminergic degeneration also affects other brain areas including the pre-frontal cortex (PFC) and hippocampus, which have been associated with the appearance of anhedonia and depression at pre-motor phases of PD. Herein, using behavioral and biochemical approaches, we investigated the protective effects of guanosine (GUO) (7.5 mg/kg i.p.) against emotional impairments and cellular events in cortical, striatal and hippocampal slices of rats submitted to a bilateral infusion of 6-OHDA (10 µg/hemisphere) in DLS. 6-OHDA-lesioned rats displayed anhedonic- and depressive-like behaviors addressed in the splash and forced swimming test (at 8 and 21 days after lesion, respectively). In addition, no alterations in motor performance in the open field test (14 days after lesion) and social interaction (22 days after lesion) were observed. Biochemical analyses were performed 22 days after 6-OHDA lesions. Mitochondrial membrane potential disruption was observed in the hippocampus at 22 days after the 6-OHDA lesions. However, intra-striatal 6-OHDA administration did not alter the ROS levels measured in cortical, striatal and hippocampal slices at 22 days after 6-OHDA infusion. GUO treatment attenuated anhedonic- and depressive-like behaviors in 6-OHDA-lesioned rats and protected hippocampal slices against the mitochondrial membrane potential disruption. These results demonstrate the antidepressant-like effects of GUO in a rat model of PD,

indicating the potential of GUO for the treatment of depression associated to PD.

Keywords: Parkinson's disease; Guanosine; Depression; Anhedonia, Dorsolateral striatum.

1. INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease mainly characterized by progressive degeneration of dopaminergic neurons projecting from the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) to striatum. However, there is increasing evidence that PD progression involves multiple brain areas and neurotransmitter systems that are associated with a range of clinical features (Schapira et al., 2017). Classically, PD is a motor system disease, and its diagnosis is based upon the presence of a set of cardinal motoric signs (e.g. rigidity, bradykinesia, tremor and postural reflex disturbance) (Poewe et al., 2017). Additionally, the non-motor symptoms of PD include olfactory deficits (Domellöf et al., 2017), sleep disturbance (Menza et al., 2010), anxiety and mood disorders (Menza et al., 2010; Prediger et al., 2012). These symptoms can precede in many years the onset of classical motor symptoms (Chaudhuri, 2010; Braak et al., 2004; Schapira, 2010).

Mood disorders such as anhedonia and depression are insidious non-motor symptoms of PD and they are recognized as very detrimental to the quality of life of PD patients (Marsh, 2013). There is a high prevalence of depression in PD, with an estimated rate of 35% (Aarsland et al., 2011). On average, 17% of individuals with PD suffer from major depressive disorder, 22% lower depression and 13% dysthymia (Tolosa et al., 2007; Reijnders et al., 2008). Depression has a heterogeneous symptomatology and responsiveness to treatment. Anhedonia, a decreased ability to experience pleasure, is a core symptom of this mental illness (American Psychiatric Association, 2013), and its occurrence

seems to be variable in intensity and duration depending on the subtype of depression affecting the patients (Benazzi, 2006). Of high interest, depressive symptoms of PD are underdiagnosed and undertreated, and it is critical to improve the knowledge about the neurobiology of these symptoms in PD.

In this context, functional connectivity between cortical and striatal neuronal systems plays a pivotal role in sensory, emotion, and motor functions (Rieger et al., 2008). In the other hand, decreased volume of the hippocampus is associated with the length of depressive illness and inversely related to the time of treatment (Sheline, 2003; Duman, 2014). In PD, the neurobiology of anhedonia and depression, and the possible participation of different brain regions, is still poorly understood. 6-hydroxydopamine (6-OHDA) is a neurotoxin-model of PD that undergoes a non-enzymatic auto-oxidation, generating reactive oxygen species (ROS) and inhibition of mitochondrial complex I activity (Bové, 2012). Recently, our research group demonstrated that a bilateral 6-OHDA injection (10 μ g/hemisphere) into the dorsolateral striatum (DSL) of rats mimicked some non-motor symptoms of PD such as anhedonia and defense behaviors relevant to depression without triggering motor deficits (Matheus et al., 2016).

Despite many antidepressants are currently available to treat depression in PD patients, they present reduced efficacy. In this scenario, the nucleoside guanosine (GUO) has been demonstrating as a substantial neuromodulator in health and disease (Tasca et al., 2018). Recently, we demonstrated GUO as a promising agent against 6-OHDA-induced damage *in vitro* (Marques et al., 2019) and *in vivo*, when administrated orally against motor deficits evoked by reserpine and 6-OHDA (Massari

et al., 2017). GUO has been tested on antidepressant-like effects using animal models predictive of antidepressant activity both acute and chronic treatment presented protective effects (Bettio et al., 2016; Bettio et al., 2014; Bettio et al., 2012).

In the present study, using behavioral and biochemical approaches, we investigated the protective effects of GUO against emotional impairments and cellular events in cortical, striatal and hippocampal slices of rats submitted to a bilateral infusion of 6-OHDA (10 µg/hemisphere) in DLS.

2. MATERIAL E METHODS

2.1 Animals

The experiments were conducted using male Wistar rats with 3 months old (300-350 g) provided by animal facility of the Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brazil). The animals were kept in controlled conditions at 23 ± 1 °C, under a 12/12 h light-dark cycle (lights on at 7 am), with free access to water and food. This study was developed in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory and followed the “The ARRIVE Guidelines” published in 2010 and were approved by the local Ethical Committee for Animal Research (CEUA/UFSC PP00955).

2.2 Stereotaxic surgery and experimental design

Stereotaxic surgery was performed under anesthesia with intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (75 mg/kg)/xylazine (8 mg/kg). All animals were treated with the noradrenaline transporter inhibitor

desipramine (20 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, USA), 30 min before surgery, in order to protect noradrenergic terminals from 6-OHDA toxicity (Matheus et al., 2016). 6-OHDA (10 µg/hemisphere) (Sigma-Aldrich, USA) was bilaterally injected into the DLS (AP, +0.2mm; ML, ±3.5mm; DV, -4.8 mm from bregma and dura) according to Matheus et al. (2016). SHAM-operated rats followed the same protocol except for the fact that vehicle (0.9% NaCl containing 0.01% sodium metabisulfite) was injected instead of 6-OHDA.

After surgery, animals were divided into 4 different groups: (a) SHAM and (b) SHAM+GUO received a stereotaxically bilateral infusion of vehicle (0.9% NaCl containing 0.01% sodium metabisulfite) in the DSL; (c) 6-OHDA and (d) 6-OHDA+GUO received 6-OHDA at 10 µg/hemisphere (diluted in 0.9% NaCl containing 0.01% sodium metabisulfite) in the DSL. GUO treatment (7.5 mg/kg, i.p.) started 24 h after the 6-OHDA (6-OHDA+GUO) or saline (SHAM+GUO) infusion until the 21th after the surgery. This schedule of GUO treatment was based in previous studies (Massari et al., 2017, Lanznaster et al., 2016). Figure 1 shows the timeline of experimental treatment and behavioral and biochemical analysis.

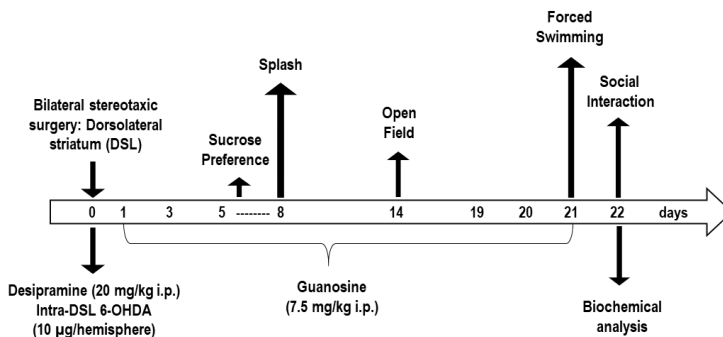


Figure 1 – Treatment schedule. Male *Wistar* rats were subjected to a bilateral stereotaxic surgery for the injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 10 µg/hemisphere) in the dorsolateral striatum (DLS) or vehicle (saline 0.9% sodium metabisulfite 0.1%) for SHAM and SHAM+GUO-group. All animals received previous desipramine administration (20 mg/kg i.p.), an inhibitor of the noradrenaline transporter (NET), to increase the selectivity of lesion for dopaminergic neurons. GUO treatment was performed once a day for 21 days (7.5 mg/kg, i.p.) and during a period of 22 days the animals (n = 9–10 rats/group) were submitted to a battery of behavioral tasks to address anhedonic- and depressive-like behaviors, locomotor activity and social interaction. After that, the animals were euthanized, and their brains collected for biochemical evaluation (n = 4–5 rats/group).

2.3 Behavioral analysis

During a period of 22 days after 6-OHDA injection, the animals were submitted to a battery of behavioral paradigms including sucrose consumption and splash test (5th - 8th days), open field (14th day), forced swimming test (21th day) and social interaction (22th day) (Figure 1). The behavioral tasks were run in the order listed, from the least aversive to the

most aversive, to minimize the chance that behavioral responses were markedly altered by prior test history. Indeed, these time points were chosen based on previous studies using the same 6-OHDA model (Matheus et al., 2016). Tests were performed in an observatory room where the rats had been habituated for at least 1 h before the beginning of the experiments. All behaviors were monitored through a video camera positioned above the apparatuses and the images were analyzed with the AnyMaze® video tracking (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) by an experienced experimenter who was blind to the animal condition.

2.3.1 Sucrose preference and splash test

Anhedonia is a classical feature of depression and involves decreased libido and a lack of desire for other pleasurable experiences. Sucrose consumption is frequently used as a measure of anhedonia in rodents, including experimental models of PD (Tadaiesky et al., 2008). At 5 days after i.n. 6-OHDA infusion, animals were transferred into single housing cages with free access to food. Each rat was provided with two water bottles on the extreme sides of the cage during the 24 h training phase to adapt the rats to drinking from two bottles. After training, one bottle was randomly switched to contain 0.8 % sucrose solution, as described previously (Slattery, 2007), and 24 h later the bottles were reversed to avoid perseveration effects. The use of a 48 h testing period allowed us to preclude any effects of neophobia, artefactual bias toward any side and perseveration effects. The consumption of water and sucrose solution was estimated simultaneously in groups by weighing the bottles.

Additionally, the splash test was performed, which evaluates a form of motivational behavior considered to parallel some symptoms of

anhedonia such as apathetic behavior (Willner, 2005). Splash test was carried out to measure the time spent grooming, which was recorded for a period of 15 min after squirting a 10% sucrose solution on the dorsal coat of the animals, as previously described (Machado et al., 2012).

2.3.2 Open field

Locomotor activity was assessed in the OFT. Rats were placed in the center of a wooden arena and allowed to freely explore it during 15 min. The apparatus, made of wood covered with impermeable Formica, had a white floor (100 x 100 cm) and white walls (40 cm high). The ANY-maze software was used to evaluate the total distance travelled and the time spent in the central “aversive” zone (10 x 10 cm) of the apparatus as indicator of locomotor activity and anxiety-like behavior, respectively.

2.3.3 Forced swimming test (FST)

Depressive-like behaviors were assessed 21 days after 6-OHDA administration in the FST as previously described by (Porsolt, 1977). Rats were placed in individual glass cylinders (40 cm in height and 17 cm in diameter) containing water (water depth was 30 cm; ± 25 °C). Two swimming sessions were conducted (initial 15-min training 24 h before a 5-min test). Total duration of immobility was manually scored continuously during a 5-min period. A rat was regarded as immobile when floating motionless or making only those movements necessary to keep its head above the water. Climbing behavior is defined as upward directed movements of the forepaw along the cylinder walls. Decrease in immobility time is indicative of a reduction in depression-related

behaviors, while time of climbing was used as a predictor of altered motor activity scored directly in the forced swimming test (Vieira et al., 2008).

2.3.4 Social interaction test.

Social interaction was evaluated as previously described (Koros et al., 2007, O'Shea et al., 2006) by measuring the amount of time spent by each rat in a pair sniffing, grooming, following, kicking, mounting, jumping on, wrestling/boxing, and crawling under/over the partner during a 10-min period of interaction.

2.4 Biochemical analysis

After the performance of the behavioral tests, the animals were euthanized and the frontal cortex, hippocampus and striatum were dissected, placed in liquid nitrogen and stored at -80°C until the biochemical evaluation. For ROS production and mitochondrial membrane potential evaluation, slices of 0.4 mm from the frontal cortex, striatum and hippocampus were obtained.

2.4.1 Slices preparation

The frontal cortex, striatum and hippocampus were rapidly dissected in ice-cold KREBS ringer buffer (KRB) (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 1.3 mM CaCl_2 , 0.4 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , and 10 mM D-glucose, bubbled with 95% CO_2 / 5% O_2 up to pH 7.4). Slices (0.4 mm) were prepared using a McIlwain Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., England) and separated in KRB at 4°C . After sectioning, slices were incubated in KRB for 30 minutes, at 37°C , for recovery.

2.4.2 Reactive species generation and mitochondrial membrane potential

After the recovery period, slices from brain regions were incubated with molecular probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), which diffuses through the cell membrane and is hydrolyzed by intracellular esterases to the non-fluorescent form dichlorodihydrofluorescein (DCFH). DCFH reacts with intracellular ROS to form dichlorofluorescein (DCF), a green fluorescent dye. DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of ROS. Brain slices were incubated with 500 μ L of DCFH-DA (80 μ M) for 30 min at 37 °C and then washed and kept in KRB. Fluorescence was measured in one slice from brain regions, assayed in triplicates, using excitation and emission wavelengths of 480 and 525 nm, respectively.

Mitochondrial membrane potential was measured by incubation with the molecular probe tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (100 nM) for 30 min at 37 °C (Egea et al., 2007). Fluorescence was measured using wavelengths of excitation and emission of 550 and 590 nm, respectively. Results were obtained as relative fluorescence units (RFU) from individual experiments. RFU variation among the experiments was normalized by expressing data as means and SEM of percentage relative to controls. Both ROS generation and mitochondrial membrane potential measurements were carried 22 days after the surgery and after 21 days of GUO treatment.

2.5 Statistical analyses

The analysis of sucrose consumption data was carried out using Student's *t* tests for comparing the sucrose and water consumption in each group. The rest of data was analysed using two-way analysis of variance

(ANOVA) followed by Newman-Keuls post-hoc test. The values were expressed as means \pm standard errors of means (SEM) and the significance level was $P \leq 0.05$. Statistical tests were performed using the Statistica software package (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. RESULTS

3.1 Sucrose consumption and splash test

Figure 2 represents anhedonic-like behaviors evaluated in two different tests, the sucrose consumption (Figure 2A) and the splash test (Figure 2B). In the training session of the sucrose consumption, two-way ANOVA revealed no significant effects of the treatment with GUO ($F_{(3,32)} = 2.50, P = 0.16$) or 6-OHDA ($F_{(3,32)} = 0.77, P = 0.78$) when compared to SHAM-group (Figure 2A). In the test phase, when compared with the sucrose solution consumption in the same group, paired Student's test revealed no significant differences in the SHAM-group ($P = 0.14$) (Figure 2A). In the test session, two-way ANOVA revealed that 6-OHDA-group displayed a lower consumption of sucrose when compared with SHAM-group ($F_{(3,32)} = 8.81, P = 0.05$). Additionally, two-way ANOVA revealed that treatment with GUO in the 6-OHDA+GUO-group significantly increased the sucrose consumption when compared with the 6-OHDA-group ($F_{(3,32)} = 3.56, P = 0.008$), indicating a protective effect of GUO treatment against the anhedonic-like behavior induced by 6-OHDA.

In the splash test, two-way ANOVA revealed a reduction in the grooming time in the 6-OHDA-treated group when compared with SHAM-group ($F_{(3,32)} = 5.17, P = 0.002$). 6-OHDA+GUO-group presented an increase in the grooming time when compared with 6-OHDA-group,

however this data did not reach significant statistical difference ($F_{(3,32)} = 3.77, P = 0.108$).

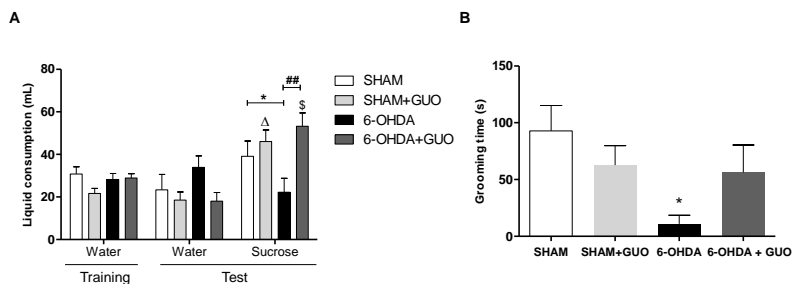


Figure 2- (A) Evaluation of anhedonic-like behaviors in rats in the sucrose preference test 8 days after 6-OHDA infusion (10 μ g/hemisphere) and GUO treatment (7.5 mg/kg) in rats ($n = 9 - 10$). Sucrose preference test (A) represented by the mean \pm S.E. M. of liquid consumption (mL) during the 48 h of sucrose and water intake and during 24 h of training phase compared to the water intake of the respective group. $P < 0.05$ (Δ) for SHAM+GUO-group and (\S) for 6-OHDA+GUO-group (Student's t-test); (*) represents mean \pm S.E.M. of sucrose consumption with $P < 0.05$ compared with SHAM-group and (#) represents mean \pm S.E.M. of sucrose consumption with $P < 0.05$ compared with 6-OHDA in the test phase (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test). (B) Splash test performed after 9 days after 6-OHDA infusion (10 μ g/hemisphere) and GUO treatment (7.5 mg/kg) in rats ($n = 9-10$). Data represents the grooming time registered during a period of 15 min after squirting a 10% sucrose solution on the dorsal coat of the animals. Data represent mean \pm S.E.M. $P < 0.05$ compared with SHAM-group (*) and 6-OHDA (#) (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test).

3.2 Open field test

To address non-specific effects of treatments, the locomotor activity of rats was assessed in the OFT. There were no significant differences in the total distance travelled (Figure 3A) ($F_{(3,32)} = 0.16$, $P = 0.352$) and time spent in the center (Figure 3B) ($F_{(3,32)} = 1.00$, $P = 0.43$) of the OFT during 15 minutes.

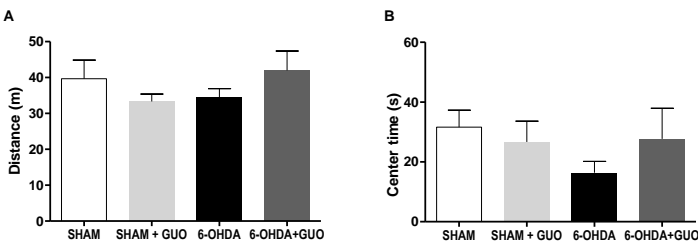


Figure 3 - Evaluation of locomotor activity in the open field test (OFT) performed 14 days after 6-OHDA infusion (10 $\mu\text{g}/\text{hemisphere}$) and GUO treatment (7.5 mg/kg) in rats ($n = 9 - 10$). The total distance travelled (A) and time spent in the center (B) of the OF were recorded during 15 minutes. Two-way ANOVA revealed no differences between the groups.

3.3 Forced swimming test

Two-way ANOVA revealed that animals treated with 6-OHDA presented an increased immobility time in comparison to the SHAM-group ($F_{(3,32)} = 9.82$, $P = 0.0007$) (Figure 4A). Meanwhile, we observed that the 6-OHDA+GUO-group presented a reduction in the immobility time ($F_{(3,32)} = 9.44$, $P = 0.0002$) when compared with SHAM-group (Figure 4A), which can be explain by an antidepressant-like effect of GUO treatment. The other parameters evaluated, swimming time (Figure

4B) and climbing time (Figure 4C), were not altered by treatments with GUO and 6-OHDA.

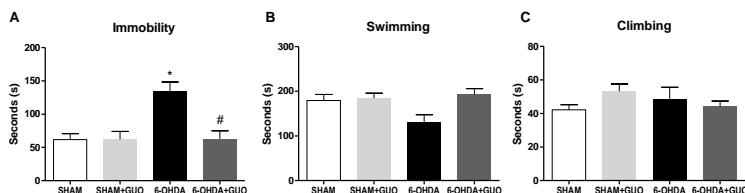


Figure 4 - Depressive-like behaviors evaluated in the forced swimming test (FST) at 21 days after 6-OHDA (10 μ g/hemisphere) and GUO treatment (7.5 mg/kg) in rats (n = 9 - 10). Immobility (A), swimming (B) and climbing (C) time were measured during a test session (5 min) performed 24 h after a training session (15 min). Data represents mean \pm S.E.M. $P < 0.05$ compared with control groups (*) and 6-OHDA (#) (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test).

3.4 Social interaction

Two-way ANOVA revealed no significant effects of the treatments with 6-OHDA ($F_{(3,32)} = 0.14$, $P = 0.530$) neither GUO ($F_{(3,32)} = 0.44$, $P = 0.0002$) (Figure 5). The combination of 6-OHDA+GUO did not reach statistical difference when compared with the 6-OHDA-group ($F_{(3,32)} = 0.26$, $P = 0.914$) or SHAM-group ($P = 0.740$).

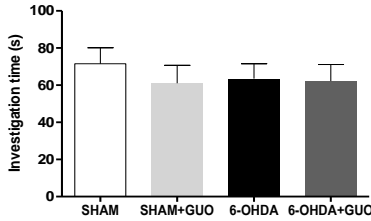


Figure 5 – Social interaction behavior was evaluated 22 days after 6-OHDA (10 $\mu\text{g}/\text{hemisphere}$) and GUO treatment (7.5 mg/kg) in rats. Data represent mean \pm S.E.M. ($n = 9 - 10$). Two-way ANOVA revealed no significant differences between groups.

3.5 Reactive oxygen species generation and mitochondrial membrane potential

Two-way ANOVA revealed no significant effects of the treatments with GUO ($F_{(3,21)} = 2.57$, $P = 0.897$) neither 6-OHDA ($F_{(3,21)} = 2.01$, $P = 0.107$) in cortical slices (Figure 6A). Also, in striatal slices two-way ANOVA revealed no statistical differences when compared to SHAM-group in the treatments with GUO ($F_{(3,21)} = 0.03$, $P = 0.864$) or 6-OHDA ($F_{(3,21)} = 0.53$, $P = 0.864$) (Figure 6B). We observed an increase of 27% in ROS production in hippocampus of rats treated with 6-OHDA when compared to SHAM-group, which did not reach statistical difference ($F_{(3,21)} = 1.35$, $P = 0.249$) (Figure 6C).

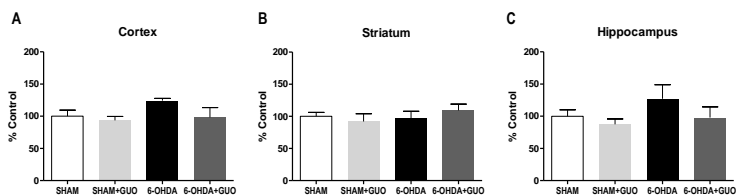


Figure 6 – Reactive oxygen species (ROS) generation was measured by relative fluorescence units of DCFH-DA, performed 22 days after 6-OHDA (10 $\mu\text{g}/\text{hemisphere}$) and GUO treatment (7.5 mg/kg) in rats ($n = 4-5$). Cortical (A) striatal (B) and hippocampal (C) slices incubated for 30 minutes with TMRE (100 μM) at 37°C. Data represent mean \pm S.E.M. Two-way ANOVA revealed no differences between groups.

Furthermore, we also analyzed the mitochondrial membrane potential in slices from these brain structures. In hippocampal slices incubated with TMRE, two-way ANOVA revealed a decrease in the fluorescent dye emission in the 6-OHDA-group ($F_{(3,21)} = 2.51$, $P = 0.059$) compared to SHAM-group (Figure 7C). GUO treatment in the 6-OHDA+GUO-group protected hippocampal slices against the mitochondrial membrane potential disruption ($F_{(3,21)} = 1.97$, $P = 0.054$) (Figure 7C). In cortical and striatal slices, two-way ANOVA revealed no significant differences following treatments with 6-OHDA or GUO (Figures 7A, B).

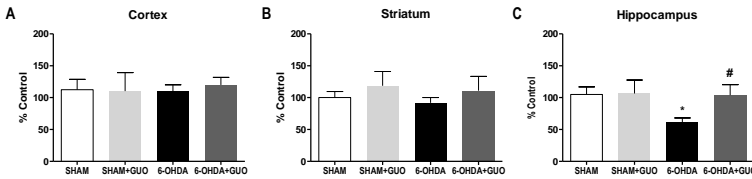


Figure 7 – Mitochondrial membrane potential was measured by relative fluorescence units of TMRE, 22 days after 6-OHDA (10 μ g/hemisphere) and GUO treatment (7.5 mg/kg) in rats. Cortical (A) striatal (B) and hippocampal (C) slices incubated for 30 minutes with TMRE (100 μ M) at 37°C. Data represent mean \pm S.E.M. (n = 4-5). P < 0.05 compared with control groups (*) and 6-OHDA (#) (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test).

4. DISCUSSION

PD is considered the most frequent movement disorder and the second most prevalent neurodegenerative disease. The major cause of the motor symptoms (akinesia, rigidity and tremor at rest) is the loss of dopaminergic neurons in the SNpc. However, there is a pre-motor period of many years, in which neuropathological changes are present without manifestation of gross motor symptoms. The treatment and diagnosis of early non-motor symptoms are challenging and much less established. The first symptomatic and the most effective treatment of PD is L-DOPA or dopamine agonists (i.e., ropinirole, pramipexole, apomorphine), which are the mainstay of clinical management (Poewe, 2009). However, according with the present knowledge, L-DOPA does not influence (delay) the progression of the disease (Oertel, 2016). In addition, while dopaminergic therapies are effective to treat motor symptoms, several

side effects are observed, including hallucinations, constipation, nausea, somnolence, on/off effects, and dyskinesia (Eggert et al., 2008). Therefore, limitations of the current pharmacological treatment of PD have led to extensive investigation of novel therapeutic agents that may provide alternative or adjunctive treatment for both motor and non-motor symptoms relief with a reduced side-effect profile. Additionally, it is essential to search for neuromodulators capable of modifying the course, delay or interrupt the progression of PD.

In the present study we demonstrated the antidepressive-like effects of GUO, a naturally occurring guanine-based purine nucleoside, in an animal model with 6-OHDA infusion in the DSL of rats, which mimics the early stages of PD progression. Additionally, we provide evidence to support the mitochondria as a target for GUO neuroprotective effects at damage conditions.

GUO, a naturally occurring guanine-based purine nucleoside, has been shown to exert neuroprotective effects in *in vitro* and *in vivo* models of PD. *In vitro*, GUO protected dopaminergic neurons differentiated from human SH-SY5Y neuroblastoma against 6-OHDA-induced toxicity (Giuliani et al., 2012) and MPP⁺-induced caspase-3 activity (Pettifer et al., 2007). Recently, we demonstrated that GUO prevented some cellular toxic events induced by 6-OHDA *in vitro*. In this study we demonstrated that GUO protected striatal slices against 6-OHDA-induced intracellular ATP depletion and mitochondrial membrane potential disruption (Marques, 2019). In an *in vivo* protocol, chronic treatment with GUO (8 mg/kg for 8 weeks) significantly reduced bradykinesia in proteasome inhibitor (PSI)-treated rats (Su et al., 2009), an animal model for slow-onset PD (McNaught et al., 2004). In the same

study using PSI model, GUO treatment reduced apoptotic cell death, induced proliferation of neural progenitor/stem cells, and increased the number of tyrosine hydroxylase-positive cells in the *SNpc* (Su et al., 2009). Additionally, previous study from our group described the therapeutic potential of GUO in *in vivo* rodent models of PD (Massari et al., 2017). Our results showed that orally administered, GUO antagonized reserpine-induced catalepsy and tremulous jaw movements and potentiated the number of contralateral rotations induced by L-DOPA in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. Furthermore, GUO (at 5 and 7.5 mg/kg) inhibited L-DOPA-induced dyskinesia in rodents (Massari et al., 2017). Despite *in vitro* evaluations and *in vivo* models of motor symptoms, data from GUO effects in models concerning the non-motor symptoms of PD are not reported yet.

Here, we investigated the effects of GUO chronic treatment in a temporal evaluation of behavioral tasks after 6-OHDA-induced damage. 6-OHDA (10 $\mu\text{g}/\text{hemisphere}$) lesion in DLS is insufficient to trigger motor deficits but is able to mimic some core non-motor symptoms of PD such as anhedonia and depressive-like as previous demonstrated (Matheus et al., 2016). In this study, we added information to this protocol by showing biochemical alterations in brain slices following 6-OHDA administration. We observed a slight increase in ROS production, and a significant disruption of mitochondrial potential in hippocampal slices obtained 22 days after 6-OHDA infusion. Decrease in the fluorescent signal of TMRE is interpreted as a disruption of the mitochondrial membrane potential, as observed in the presence of the protonophore carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 10 μM) effect in slices *in vitro*, used as a control for potential loss (data not

shown). FCCP is a mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupling compound which decreased the fluorescence of TMRE in slices submitted to incubation for 1 h as demonstrated in our previous study (Massari et al., 2016). The main finding of the present study is that GUO protected against 6-OHDA-induced depressive-like behavior and prevented the mitochondrial membrane potential disruption in the hippocampus. Although in the splash test the two-way ANOVA did not reveal statistical significance regarding GUO effects, we observed a partial effect in the GUO treatment in 6-OHDA+GUO-treated group when compared to 6-OHDA-group, which presented a decrease in the grooming time. This result reinforces GUO effects against emotional parameters related with prodromal phase of PD. Otherwise, the antidepressant-like effect of GUO could be confirmed in the FST test, when the treatment with GUO reduces the immobility time when compared to 6-OHDA-group. This finding corroborates with the antidepressant-like potential of GUO in animal models previously demonstrated (Bettio et al., 2012; Bettio et al., 2014).

GUO has a potential neuromodulator effect in models of neurological diseases and recently has been demonstrated as a potential neuroprotective agent in rodent models of movement disorder (Massari et al., 2017). Several cellular mechanisms have been associated with GUO protective effects in neurological disease models *in vivo* and *in vitro* (Lanznaster et al., 2016). However, the molecular target has not yet been fully characterized. Regarding antidepressant-like effect, some mechanisms were already described in a previous study. Bettio and collaborators (2012) demonstrated the potential antidepressant-like properties of acute and chronic treatments with GUO. In an evaluation of acute effects of GUO, it was observed that guanosine has antidepressant-

like effects in mice at 5 mg/kg, decreasing the immobility time of mice in both the TST and the FST, two behavioral models predictive of antidepressant activity (Bettio et al., 2012). In addition, the antidepressant-like effect of GUO seems to be mediated by the activation of PI3K/Akt signaling pathway, as well as its downstream target mammalian target of rapamycin (mTOR) (Bettio et al., 2012), an important signaling pathway implicated in synaptogenesis and fast-acting antidepressant responses (Li et al., 2010). Finally, GUO has been effective in preventing acute restraint stress-induced increase in immobility time in the FST (Bettio et al., 2014). This effect may be mediated, at least in part, by antioxidant properties of GUO, reducing oxidative stress through restoration of normal activity of endogenous antioxidant enzymes in the hippocampus. Interestingly in the present study, despite 6-OHDA-lesion did not increase ROS production in any brain regions tested, we observed a mitochondrial potential disruption in the hippocampus, which was reverted by chronic treatment with GUO. GUO efficacy against 6-OHDA-induced increase ROS production and mitochondrial dysfunction has been already demonstrated *in vitro* in a previous study from our group (Marques et al., 2019). Regarding chronic treatment, previous study showed GUO (21 days to 5 mg/kg, administered orally) presented an antidepressant-like effect in the TST, and this effect appears to be positively correlated with an increase in neuronal differentiation in the ventral hippocampal dentate gyrus (Bettio et al., 2016).

Importantly, hippocampus plays a key role in the pathophysiology of depression and in the action of antidepressant drugs (Duman, 2014). Notably, among the established non-motor symptoms, depression appears

to be clinically relevant for PD patients. Clinical studies demonstrated that depression is present in 35% of the PD patients (Aarsland et al., 2011). In this scenario, we demonstrated for the first-time results providing evidence of GUO effects in anhedonic-like behavior and mitochondrial potential disruption in a protocol that induces non-motor symptoms related to PD by using low dose of 6-OHDA in DSL. Interestingly, GUO might be promising for the management of depression in PD considering its low toxicity (Schmidt et al., 2010). Moreover, protective effects were observed in the combination of GUO and L-DOPA, which can potentiate L-DOPA effects in a reserpine model of movement disorder (Massari et al., 2017), indicating promising effects in motor symptoms as well.

Further studies are necessary to elucidate the cellular mechanism related to the temporal progression of 6-OHDA-lesion and how this mechanism can be affected by the GUO treatment. Together, our results support the hypothesis that GUO has potential use for non-motor symptoms of PD, particularly for emotional parameters as depression.

REFERENCES

- Aarsland, D., S. Pålhagen, C. G. Ballard, U. Ehrt, and P. Svenningsson. 2011. "Depression in Parkinson disease-epidemiology, mechanisms and management." *Nat Rev Neurol* 8 (1):35-47. doi: 10.1038/nrneurol.2011.189.
- Benazzi, F. 2006. "Various forms of depression." *Dialogues Clin Neurosci* 8 (2):151-61.
- Bettio, L. E., M. P. Cunha, J. Budni, F. L. Pazini, Á Oliveira, A. R. Colla, and A. L. Rodrigues. 2012. "Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways." *Behav Brain Res* 234 (2):137-48. doi: 10.1016/j.bbr.2012.06.021.
- Bettio, L. E., A. E. Freitas, V. B. Neis, D. B. Santos, C. M. Ribeiro, P. B. Rosa, M. Farina, and A. L. Rodrigues. 2014. "Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress." *Pharmacol Biochem Behav* 127:7-14. doi: 10.1016/j.pbb.2014.10.002.
- Bettio, L. E., V. B. Neis, F. L. Pazini, P. S. Brocardo, A. R. Patten, J. Gil-Mohapel, B. R. Christie, and A. L. Rodrigues. 2016. "The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation." *Eur J Neurosci* 43 (8):1006-15. doi: 10.1111/ejn.13172.
- Bové, J., and C. Perier. 2012. "Neurotoxin-based models of Parkinson's disease." *Neuroscience* 211:51-79. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.057.
- Braak, H., E. Ghebremedhin, U. Rüb, H. Bratzke, and K. Del Tredici. 2004. "Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology." *Cell Tissue Res* 318 (1):121-34. doi: 10.1007/s00441-004-0956-9.
- Chaudhuri, K. R., and P. Odin. 2010. "The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease." *Prog Brain Res* 184:325-41. doi: 10.1016/S0079-6123(10)84017-8.

- Lanznaster, D. 2016. "Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders." *Aging and Disease* 7 (82):23.
- Domellöf, M. E., K. F. Lundin, M. Edström, and L. Forsgren. 2017. "Olfactory dysfunction and dementia in newly diagnosed patients with Parkinson's disease." *Parkinsonism Relat Disord* 38:41-47. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.02.017.
- Duman, R. S. 2014. "Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections." *Depress Anxiety* 31 (4):291-6. doi: 10.1002/da.22227.
- Egea, J., A. O. Rosa, M. Sobrado, L. Gandía, M. G. López, and A. G. García. 2007. "Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice." *Neuroscience* 145 (3):866-72. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.12.036.
- Eggert, K. M., J. P. Reese, W. H. Oertel, and R. Dodel. 2008. "Cost effectiveness of pharmacotherapies in early Parkinson's disease." *CNS Drugs* 22 (10):841-60. doi: 10.2165/00023210-200822100-00005.
- Giuliani, P., S. Romano, P. Ballerini, R. Ciccarelli, N. Petragani, S. Cicchitti, M. Zuccarini, S. Jiang, M. P. Rathbone, F. Caciagli, and P. Di Iorio. 2012. "Protective activity of guanosine in an in vitro model of Parkinson's disease." *Panminerva Med* 54 (1 Suppl 4):43-51.
- Koros, E., H. Rosenbrock, G. Birk, C. Weiss, and F. Sams-Dodd. 2007. "The selective mGlu5 receptor antagonist MTEP, similar to NMDA receptor antagonists, induces social isolation in rats." *Neuropsychopharmacology* 32 (3):562-76. doi: 10.1038/sj.npp.1301133.
- Lanznaster, D., T. Dal-Cim, T. C. Piermartiri, and C. I. Tasca. 2016. "Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders." *Aging Dis* 7 (5):657-679. doi: 10.14336/AD.2016.0208.
- Lanznaster, D., J. M. Mack, V. Coelho, M. Ganzella, R. F. Almeida, T. Dal-Cim, G. Hansel, E. R. Zimmer, D. O. Souza, R. D. Prediger, and C. I. Tasca. 2016. "Guanosine Prevents Anhedonic-Like Behavior and

Impairment in Hippocampal Glutamate Transport Following Amyloid- β 1-40 Administration in Mice." *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-016-0082-1.

Li, N., B. Lee, R. J. Liu, M. Banasr, J. M. Dwyer, M. Iwata, X. Y. Li, G. Aghajanian, and R. S. Duman. 2010. "mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists." *Science* 329 (5994):959-64. doi: 10.1126/science.1190287.

Machado, D. G., M. P. Cunha, V. B. Neis, G. O. Balen, A. R. Colla, J. Grando, P. S. Brocardo, L. E. Bettio, J. B. Dalmarco, D. Rial, R. D. Prediger, M. G. Pizzolatti, and A. L. Rodrigues. 2012. "Rosmarinus officinalis L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice." *J Ethnopharmacol* 143 (1):158-69. doi: 10.1016/j.jep.2012.06.017.

Marques, N. F., C. M. Massari, and C. I. Tasca. 2019. "Guanosine Protects Striatal Slices Against 6-OHDA-Induced Oxidative Damage, Mitochondrial Dysfunction, and ATP Depletion." *Neurotox Res* 35 (2):475-483. doi: 10.1007/s12640-018-9976-1.

Marsh, L. 2013. "Depression and Parkinson's disease: current knowledge." *Curr Neurol Neurosci Rep* 13 (12):409. doi: 10.1007/s11910-013-0409-5.

Massari, C. M., A. A. Castro, T. Dal-Cim, D. Lanznaster, and C. I. Tasca. 2016. "In vitro 6-hydroxydopamine-induced toxicity in striatal, cerebrocortical and hippocampal slices is attenuated by atorvastatin and MK-801." *Toxicol In Vitro* 37:162-168. doi: 10.1016/j.tiv.2016.09.015.

Massari, C. M., M. López-Cano, F. Núñez, V. Fernández-Dueñas, C. I. Tasca, and F. Ciruela. 2017. "Antiparkinsonian Efficacy of Guanosine in Rodent Models of Movement Disorder." *Front Pharmacol* 8:700. doi: 10.3389/fphar.2017.00700.

Matheus, F. C., D. Rial, J. I. Real, C. Lemos, R. N. Takahashi, L. J. Bertoglio, R. A. Cunha, and R. D. Prediger. 2016. "Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense

- Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats." *Mol Neurobiol* 53 (6):3891-3899. doi: 10.1007/s12035-015-9330-z.
- McNaught, K. S., D. P. Perl, A. L. Brownell, and C. W. Olanow. 2004. "Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease." *Ann Neurol* 56 (1):149-62. doi: 10.1002/ana.20186.
- Menza, M., R. D. Dobkin, H. Marin, and K. Bienfait. 2010. "Sleep disturbances in Parkinson's disease." *Mov Disord* 25 Suppl 1:S117-22. doi: 10.1002/mds.22788.
- O'Shea, M., I. S. McGregor, and P. E. Mallet. 2006. "Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats." *J Psychopharmacol* 20 (5):611-21. doi: 10.1177/0269881106065188.
- Oertel, W., and J. B. Schulz. 2016. "Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists." *J Neurochem*. doi: 10.1111/jnc.13750.
- Pettifer, K. M., S. Jiang, C. Bau, P. Ballerini, I. D'Alimonte, E. S. Werstiuk, and M. P. Rathbone. 2007. "MPP(+)-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine." *Purinergic Signal* 3 (4):399-409. doi: 10.1007/s11302-007-9073-z.
- Poewe, W., and P. Mahlknecht. 2009. "The clinical progression of Parkinson's disease." *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 4:S28-32. doi: 10.1016/S1353-8020(09)70831-4.
- Poewe, W., K. Seppi, C. M. Tanner, G. M. Halliday, P. Brundin, J. Volkmann, A. E. Schrag, and A. E. Lang. 2017. "Parkinson disease." *Nat Rev Dis Primers* 3:17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13.
- Porsolt, R. D., M. Le Pichon, and M. Jalfre. 1977. "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments." *Nature* 266 (5604):730-2.

Prediger, R. D., F. C. Matheus, M. L. Schwarzbold, M. M. Lima, and M. A. Vital. 2012. "Anxiety in Parkinson's disease: a critical review of experimental and clinical studies." *Neuropharmacology* 62 (1):115-24. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.039.

Reijnders, J. S., U. Ehrt, W. E. Weber, D. Aarsland, and A. F. Leentjens. 2008. "A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease." *Mov Disord* 23 (2):183-9; quiz 313. doi: 10.1002/mds.21803.

Rieger, J. W., M. A. Schoenfeld, H. J. Heinze, and I. Bodis-Wollner. 2008. "Different spatial organizations of saccade related BOLD-activation in parietal and striate cortex." *Brain Res* 1233:89-97. doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.108.

Schapira, A. H., and E. Tolosa. 2010. "Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment." *Nat Rev Neurol* 6 (6):309-17. doi: 10.1038/nrneurol.2010.52.

Schapira, A. H. V., K. R. Chaudhuri, and P. Jenner. 2017. "Non-motor features of Parkinson disease." *Nat Rev Neurosci* 18 (8):509. doi: 10.1038/nrn.2017.91.

Schmidt, A. P., A. E. Böhmer, C. Schallenberger, C. Antunes, R. G. Tavares, S. T. Wofchuk, E. Elisabetsky, and D. O. Souza. 2010. "Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of guanosine in mice." *Br J Pharmacol* 159 (6):1247-63. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00597.x.

Sheline, Y. I., M. H. Gado, and H. C. Kraemer. 2003. "Untreated depression and hippocampal volume loss." *Am J Psychiatry* 160 (8):1516-8. doi: 10.1176/appi.ajp.160.8.1516.

Slattery, D. A., A. Markou, and J. F. Cryan. 2007. "Evaluation of reward processes in an animal model of depression." *Psychopharmacology (Berl)* 190 (4):555-68. doi: 10.1007/s00213-006-0630-x.

Su, C., N. Elfeki, P. Ballerini, I. D'Alimonte, C. Bau, R. Ciccarelli, F. Caciagli, J. Gabriele, and S. Jiang. 2009. "Guanosine improves motor

behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism." *J Neurosci Res* 87 (3):617-25. doi: 10.1002/jnr.21883.

Tadaiesky, M. T., P. A. Dombrowski, C. P. Figueiredo, E. Cargin-Ferreira, C. Da Cunha, and R. N. Takahashi. 2008. "Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease." *Neuroscience* 156 (4):830-40. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.08.035.

Tasca, C. I., D. Lanznaster, K. A. Oliveira, V. Fernández-Dueñas, and F. Ciruela. 2018. "Neuromodulatory Effects of Guanine-Based Purines in Health and Disease." *Front Cell Neurosci* 12:376. doi: 10.3389/fncel.2018.00376.

Tolosa, E., Y. Compta, and C. Gaig. 2007. "The premotor phase of Parkinson's disease." *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl:S2-7. doi: 10.1016/j.parkreldis.2007.06.007.

Vieira, C., T. C. De Lima, A. e P Carobrez, and C. Lino-de-Oliveira. 2008. "Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test." *Neurosci Lett* 445 (2):170-3. doi: 10.1016/j.neulet.2008.09.001.

Willner, P. 2005. "Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS." *Neuropsychobiology* 52 (2):90-110. doi: 10.1159/000087097.

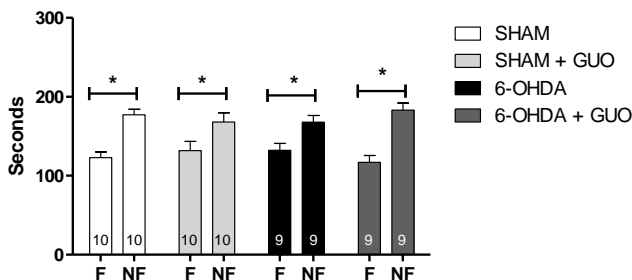
1. Resultados adicionais:

Os resultados referentes a avaliação da habilidade de discriminação olfatória realizado 3 dias após a infusão de 6-OHDA no estriado dorsolateral de ratos está descrito abaixo como a Figura 1. A memória de curto prazo nos testes de reconhecimento de objetos e no teste do labirinto em Y realizado 16 e 20 dias após a 6-OHDA, respectivamente, estão descritos abaixo como as Figuras 2 e 3.

1.1 Discriminação olfatória

O teste constituiu em alocar o animal em um aparato dividido em dois compartimentos idênticos ($30 \times 30 \times 20$ cm) separados por uma porta aberta que permite o acesso livre dos animais para os dois compartimentos. O chão de um dos compartimentos foi forrado com a serragem retirada da gaiola na qual o animal permaneceu nas últimas 48h antes do teste, enquanto que o outro compartimento foi forrado com serragem limpa. O experimento consistiu em colocar o rato na caixa de discriminação olfatória e registrar, durante um período de 5 min, o tempo que o animal gastou investigando cada um dos compartimentos. A discriminação olfatória foi avaliada pela preferência do animal em ficar no compartimento familiar (impregnado com o seu cheiro) em relação ao não-familiar (serragem limpa).

Figura 1 – Avaliação da habilidade de discriminação olfatória (n = 9 - 10) em ratos 3 dias após a infusão com 6-OHDA (10 µg/hemisfério) no EDL e tratamento com GUO (7,5 mg/kg i.p.).



Os valores representam a média + o erro padrão do tempo gasto em cada compartimento. * $P \leq 0.05$ comparando o tempo gasto no compartimento familiar (F) com o tempo gasto no compartimento não familiar (NF) (teste t Student).

Como demonstrado acima, a análise estatística pelo teste t Student não revelou diferença estatística na discriminação olfatória através do tempo de investigação entre os compartimentos em todos os grupos 3 dias após a infusão de 6-OHDA. Esse resultado representa que os animais testados apresentaram habilidade de diferenciar os compartimentos, apresentando preferência por um dos compartimentos, no qual permaneceu por mais tempo. Portanto, a infusão de 6-OHDA no EDL de ratos não causa prejuízo olfatório 3 dias após a administração.

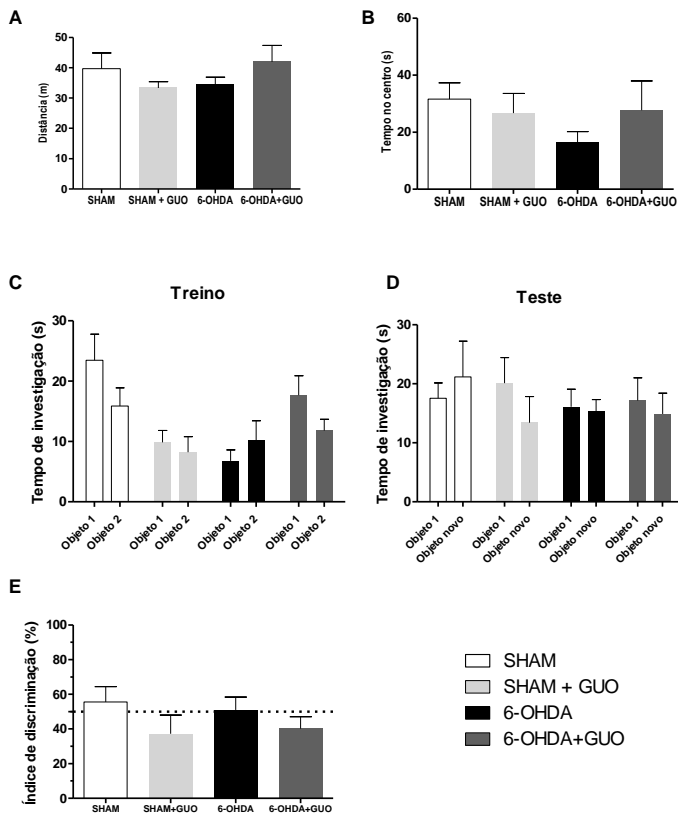
1.2 Reconhecimento de objeto

A memória de curta duração foi avaliada no teste de reconhecimento do objeto, conduzido conforme previamente descrito por (Abe, 2004). Esta tarefa consistiu em três sessões distintas: a habituação,

o treino e o teste. A fase de habituação foi realizada 24 horas antes da fase de teste, na qual os animais exploraram livremente o aparato do campo aberto por 15 min. Essa fase objetiva reduzir o estresse, ansiedade e exploração do meio. Após 24 h, os animais realizaram a sessão de treino. No treino, os animais são expostos a dois objetos idênticos durante 3 min 24 horas antes da sessão de teste. A sessão de teste foi realizada 30 min após a sessão de treino. A sessão de teste teve duração de 5 min, sendo que um dos objetos presentes na sessão de treino foi substituído por um novo objeto de tamanho similar, mas formato e coloração diferente. A porcentagem de reconhecimento do objeto novo (Índice de reconhecimento) na fase de teste foi calculada de acordo com a seguinte equação: % reconhecimento = (tempo de exploração do objeto novo x 100)/ tempo total de exploração de ambos os objetos.

A distância percorrida e o tempo gasto no centro do campo aberto na sessão de treino estão representados por A e B respectivamente, enquanto que o tempo de investigação dos objetos na sessão de treino e na sessão de teste estão representados por C e D. O índice de discriminação foi calculado através da fórmula $[(T \text{ novo} \times 100) / (T \text{ novo} + T \text{ objeto } 1)]$ e está representado em E. Os valores estão apresentados como as médias + o erro padrão dos parâmetros avaliados. Nas figuras A, B e E * representa $p \leq 0,05$ comparado com o grupo SHAM enquanto que # representa $p \leq 0,05$ quando comparado com o grupo 6-OHDA (ANOVA de duas vias seguida Newman-Keuls). Na figura C e D * representa $P \leq 0,05$ comparado com o tempo de investigação dos objetos 1 e 2 no mesmo grupo (teste t student).

Figura 2 – Avaliação da memória de curto prazo em ratos (n = 9-10) 16 dias após a infusão com 6-OHDA (10 µg/hemisfério) no EDL e tratamento com GUO (7,5 mg/kg).



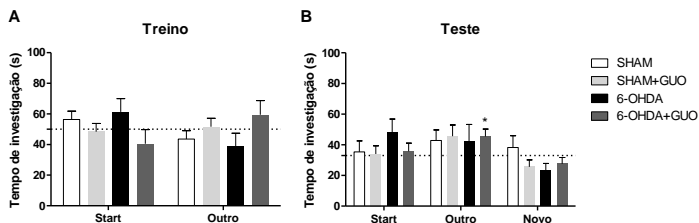
No teste de reconhecimento de objetos, observamos que o tempo de exploração no treino não teve diferença em nenhum dos grupos. Quando calculamos o índice de discriminação, nenhum dos grupos apresentou diferença estatística em relação ao valor hipotético de 50%, que representa a probabilidade de explorar cada um dos objetos.

1.3 Teste do Labirinto em Y modificado

Esse teste avaliou a memória espacial de curto prazo e foi realizado como previamente descrito (Soares et al., 2013). O aparato do labirinto em Y é constituído de 3 braços (50 x 10 x 20 cm). O teste é baseado na preferência inata dos roedores em permanecer em áreas que não foram previamente exploradas (Dellu et al., 1997) e consiste em 2 sessões (treino e teste) de 5 minutos cada, separadas por um intervalo de 120 minutos. Durante a sessão de treino, um dos braços do aparato (“novo”) foi bloqueado por uma porta removível e os animais foram alocados no final de um dos braços que estavam abertos (“start”) de frente para o centro do labirinto para que pudessem escolher entre o braço “start” e o braço “outro”. Durante a fase de teste, o braço “novo” foi aberto e a porcentagem de tempo gasto em cada braço foi analisada.

Também avaliamos a memória de curto prazo espacial através do teste do labirinto em Y. Em acordo com o teste anterior não foram observadas diferenças entre a exploração dos braços “start”, “outro” e o “novo” nos grupos SHAM e 6-OHDA. Porém, o grupo tratado com 6-OHDA+GUO apresentou diferença estatística quando comparado com o valor hipotético de 33%.

Figura 3 – Memória de curto prazo avaliada em ratos (n=9-10) no labirinto em Y modificado 20 dias após a infusão com 6-OHDA (10 µg/hemisfério) no EDL e tratamento com GUO (7,5 mg/kg).



O tempo de investigação nos braços na sessão de teste apresentados em A e na sessão de treino em B. Em A, a análise estatística por test t student não apresentou diferença estatística no tempo de investigação comparado com o valor hipotético de 50% (probabilidade de exploração para 2 braços). Em B, * representa $p \leq 0,05$ comparado com o valor hipotético de 33% (probabilidade de exploração para 3 braços).

CAPÍTULO III

Evaluation of guanosine effects following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) infusion in rats: implications on behavioral and biochemical changes related to non-motor symptoms of Parkinson's disease

Este capítulo apresenta os resultados relacionados ao objetivo específicos III desta tese. Os resultados referentes ao efeito protetor da GUO em modelo experimental com infusão intranasal de MPTP em ratos estão apresentados como o Anexo C desta Tese, compondo o Capítulo III, que exibe o artigo científico intitulado “*Evaluation of guanosine effects following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) infusion in rats: implications on behavioral and biochemical changes related to non-motor symptoms of Parkinson's disease*” que será submetido a publicação em periódico científico.

Os resultados desse capítulo são fruto do trabalho realizado em parceria com o “*TH group*” na School of Biomedical Science and Pharmacy, Faculty of Health and Medicine, University of Newcastle, Australia através do Programa de Estágio Sanduíche no Exterior (PSDE-CAPES) realizado no período de Setembro de 2017 a Março de 2018, sob a orientação do Prof. Dr. Phillip Dickson e do Prof. Dr. Peter Dunkley.

Para as avaliações comportamentais também contamos com a colaboração do Laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Rui Prediger, LEXDON, do Departamento de Farmacologia da UFSC.

1. A regulação da Tirosina Hidroxilase e progressão da DP

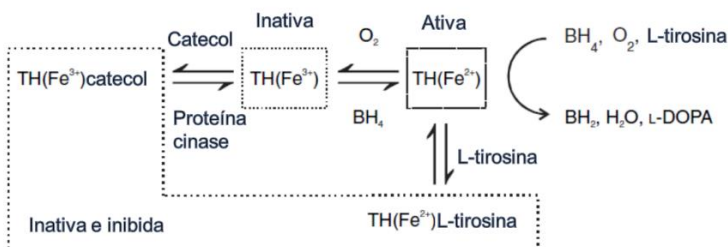
A tirosina hidroxilase (TH) é a primeira enzima da síntese das catecolaminas e realiza a etapa limitante para síntese das mesmas. A TH converte L-tirosina a L-DOPA que é subsequentemente convertida a dopamina pela enzima dopa-descarboxilase, que então pode ser convertida a noradrenalina pela enzima β -hidroxilase. Finalmente a noradrenalina pode ser convertida a adrenalina pela enzima N-metiltransferase. As células catecolaminérgicas são classificadas de acordo com a enzima da cascata de síntese catecolaminérgica que expressam. Algumas evidências demonstram que a taxa de progressão da DP pode estar relacionada com a regulação da síntese catecolaminérgica (Salvatore et al., 2014), o que caracteriza a importância de avaliar a funcionalidade e expressão da TH.

A atividade da TH pode ser modulada por dois mecanismos diferentes: regulação de médio e longo prazo (estabilidade da enzima, regulação da transcrição gênica, estabilidade de RNA, *splincing* alternativo de RNA e regulação da tradução); e regulação de curto prazo (inibição por *feedback*, regulação alostérica e fosforilação) (Kumer e Vrana, 1996). Na sua reação, a TH usa tetrahydrobiopterina (BH₄) e oxigênio (O₂) para adicionar uma hidroxila ao anel aromático da tirosina (Fitzpatrick, 1999). O Fe²⁺ ligado a enzima é oxidado pelo O₂ a Fe³⁺ que tem a capacidade de se associar ao anel catecol das catecolaminas e inativar a enzima, completando o mecanismo de *feedback* (Figura 1). A TH pode ser fosforilada nos resíduos de serina (Ser8, 19, 31 e 40) por várias proteínas cinases (Dunkley et al., 2004), porém a enzima só é

ativada quando fosforilada na Ser40, o que desencadeia a dissociação da catecolamina do sítio de ligação (Ramsey e Fitzpatrick, 2000). Enquanto isso, as Ser19 e 31 seriam responsáveis por aumentar a atividade da TH por um fenômeno de hierarquia de fosforilação, ou seja, a fosforilação desses resíduos pode aumentar a taxa de fosforilação da Ser40. Sendo a Ser19 capaz de aumentar em 3 vezes a taxa de fosforilação da Ser40, e a Ser31 em cerca de 9 vezes (Dickson e Briggs, 2013).

Em contrapartida Ong et al (2012) demonstrou que a fosforilação na Ser40 e aumento da atividade, ocorre 4 horas após a administração de LPS, sem quaisquer alterações nas Ser19 e 31, sugerindo que existe uma fase sustentada de ativação *in vivo*, que vai além das alterações agudas 1h após o dano. Demonstrando também que o aumento da fosforilação das Ser19 e 31 causa o aumento da atividade da enzima, sem alterar os níveis de expressão da proteína, que por sua vez só é observado 24h horas após a administração de LPS (Ong et al., 2012).

Figura 1- Reação catalisada pela Tirosina hidroxilase segundo o modelo desenvolvido por Ramsey e Fitzpatrick (2000)].



Adaptado de Dunkley *et al*, 2004.

Alguns estudos têm demonstrado que o papel dos sítios fosforilados vai além da ativação pelo mecanismo de hierarquia, assim a fosforilação na Ser19 e na Ser31 teriam outros papéis além de aumentar a taxa de fosforilação na Ser40, como a estabilidade e a degradação da TH (Nakashima et al., 2011; Nakashima et al., 2013). A fosforilação na Ser19 foi apontada como um marcador para a ativação do sistema ubiquitina-proteossoma, levando ao aumento da degradação da TH em estudo *in vitro*. Nesse trabalho foi observado que na presença de um inibidor de proteossoma, a Ser19 foi fosforilada em grande escala, se comparada com a Ser31 e 40. Já na presença de um ativador do sistema ubiquitina-proteossoma, ocorreu a redução da fosforilação apenas na Ser19 (Nakashima et al., 2016). Por outro lado, a fosforilação pelas enzimas Erk 1/2 e pela cinase dependente de ciclina 5 (CDK5) na Ser31 foi relacionada com o aumento da estabilidade da TH *in vitro* e *in vivo* (Moy e Tsai, 2004). Ao contrário do que acontece quando a TH é fosforilada na Ser40, a Ser31 aumenta a atividade da enzima sem aumentar a taxa de degradação. Assim, a fosforilação na Ser31 poderia atuar como uma maneira compensatória à depleção de dopamina sem diminuir a expressão da TH. Esse mecanismo pode estar relacionado com a progressão da DP e as razões pelas quais os sintomas motores se manifestam apenas quando mais da metade dos neurônios dopaminérgicos já foi perdido. Por outro lado, o aumento da fosforilação na Ser19 ou na Ser40 poderia levar à perda da estabilidade da enzima e aumento da degradação da TH, reduzindo a expressão da enzima (Johnson et al., 2018).

Diante do exposto, estudos *in vivo* em modelos experimentais que avaliem a fosforilação em sítios específicos da enzima podem ajudar

a esclarecer o papel da regulação da TH na progressão dos sintomas da DP.

No presente capítulo avaliamos os efeitos da GUO em alterações compartamentais que precedem o dano motor, bem como a fosforilação da TH em diferentes regiões do cérebro de ratos que receberam infusão intranasal de MPTP. Os resultados estão apresentados a seguir na forma de artigo científico.

Evaluation of guanosine effects following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) infusion in rats: implications on behavioral and biochemical changes related to non-motor symptoms of Parkinson's disease

Naiani Ferreira Marques¹; Tuane Bazanella Sampaio²; Luisa Bandeira Binder¹; Leandra Celso Constantino¹; Katiane Roversi²; Ângela Patrícia França²; Josiel Milleno Mack²; Pedro Henrique Garcia-Sobrinho³; Rui Daniel Prediger²; Peter Dunkley³, Phillip Dickson³, Carla Inês Tasca^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

²Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

³School of Biomedical Sciences and Pharmacy, University of Newcastle, NSW, Australia

***Corresponding author:** Carla Inês Tasca

Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC

Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil

Telephone number: +55-48 3721-5046

E-mail address: carla.tasca@ufsc.br

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease associated with degeneration in dopaminergic neurons projections from *substantia nigra pars compacta* (SNpc) to striatum (nigrostriatal pathway), which is associated with motor symptoms of the disease. Evidence suggest that areas in the central nervous system (CNS) processing olfactory information are affected in the early stages of PD, before the development of classical motor symptoms. An rodent experimental model of PD with a single intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) promotes a time-dependent disruption of dopaminergic neurotransmission in different brain structures analogous to those observed in different stages of PD. MPTP intranasal infusion induced impairment on olfactory, emotional, cognitive and motor functions in rats and mice. In the present study, we investigated the effects of guanosine (GUO 7.5 mg/kg i.p.), a neuroprotective endogenous nucleoside, in a temporal evaluation of behavioral and biochemical assays after intranasal infusion of MPTP (1 mg/nostril) in rats. Additionally, we investigated the total content and the phosphorylation profile of tyrosine hydroxylase (TH), the rate limiting enzyme in the synthesis of dopamine, in brain regions following MPTP and GUO treatment. Behavioral alterations promoted by MPTP were olfactory discrimination (3 days) and social recognition (7 days) impairment, mitochondrial membrane potential disruption, increased membrane permeability in the olfactory bulb and in the hippocampus (21 days). However, MPTP caused no alterations in splash test (10 days), forced swimming test (11-12 days), in a working memory version of

Morris Water maze (MWM) (14-17) and motor performance in rotarod test (20 days). MPTP treatment did not alter biochemical parameters in slices from the cortex and thalamus. Regarding TH regulation, no statistical alterations were detected 21 days after the treatments. GUO treatment prevented the olfactory discrimination and social memory recognition impairment, and mitochondrial membrane potential disruption in olfactory bulb. In summary, these results provide evidence for a neuroprotective effect of GUO on MPTP-induced behavioral and biochemical impairments, in an animal model which reproduces non-motor symptoms associated with PD.

Keywords: Parkinson's disease, non-motor symptoms, tyrosine hydroxylase, MPTP, Guanosine.

1. INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder that involves multiple neurotransmitter pathways within the brain and autonomic nervous system that in turn are associated with a range of clinical features (Schapira, 2017). PD is one of the most common age-related brain disorders and is defined primarily as a movement disorder, with the typical symptoms being resting tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability, and is pathologically characterized by degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons and the presence of Lewy's bodies (misfolded α -synuclein aggregation) in the surviving neurons (Przedborski, 2017).

Although the diagnostic of PD relies on the clinical effects of dopamine deficiency, other neurotransmitter systems impairment are recognized to cause various motor and non-motor symptoms (Schapira et al., 2017). Non-motor symptoms as hyposmia, rapid eye movement (REM)-sleep disorder (RBD), depression and constipation can precede the motor symptoms for several years (Chaudhuri, 2009). Animal models of PD have proved highly effective discovery of treatments for motor symptoms and clues to underlying the progression of the neurodegeneration. Besides the limitations in recapitulating the clinical characteristics of PD, as well as its nature, animal models can provide insights into the pathology and pharmacological of non-motor symptoms.

Non-motor experimental model of PD with an intranasal (i.n.) infusion of the pro-neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rodents was established in the last years (Prediger et al., 2011). Previous findings demonstrate that rats (Prediger

et al., 2006; Prediger et al., 2009; Moreira et al., 2010; Castro et al., 2012; 2013) and mice (Prediger et al., 2010; Matheus et al., 2012) intranasally infused with MPTP suffer impairments in olfactory, cognitive, emotional and motor functions conceivably analogous to those observed during different stages of PD. Such infusion causes time-dependent loss of tyrosine hydroxylase (TH) immunoccontent in the olfactory bulb and in the *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) of rats, resulting in significant dopamine depletion in different brain areas (Prediger et al., 2006; Prediger et al., 2009; Castro et al., 2012). TH is the rate limiting enzyme in the synthesis of the catecholamines dopamine, noradrenaline and adrenaline. One of the major mechanisms for controlling the activity of TH is protein phosphorylation. TH is phosphorylated at serine (Ser) residues Ser8, Ser19, Ser31 and Ser40. The phosphorylation of TH at Ser40 increases the enzyme activity *in vitro* (Haycock et al., 1992; Salvatore et al., 2001; Gordon et al., 2009) *in situ* (Edelman et al., 1978; Sutherland et al., 1993) and *in vivo* (Haycock, 1991; Salvatore et al., 2000; Peres et al., 2016; Ong et al., 2012; Ong et al., 2017). Phosphorylation at Ser31 also increases the activity but to a much lesser extent than for Ser40 phosphorylation. The phosphorylation of TH at Ser19 or Ser8 has no direct effect on tyrosine hydroxylase activity. However, the phosphorylation at Ser19 and Ser31 increases the rate of Ser40 phosphorylation leading to an increase in enzyme activity creating a hierarchical phosphorylation mechanism (Dunkley et al., 2004; Bobrovskaya et al., 2004; Lehmann et al., 2006). Clinical studies and toxin-based models have pointed TH regulation in CNS and peripheral tissue as a promising target to predict motor impairment, as well as, for

molecular changes in the catecholamine pathway in PD progression (Johnson et al., 2018).

Development of disease modifying treatments to slow the progression of neurodegeneration and effective symptomatic interventions for non-motor features, to increase the quality of life of the patients are currently therapeutic challenges (Schapira et al., 2017). In this scenario, we sought to evaluate an endogenous compound with several neuroprotective effects in neurological disease models and lower toxicity, a purine-based nucleoside that might represent a promise alternative. Guanosine (GUO) is an endogenous nucleoside known to act by modulating excitotoxicity in central nervous system (CNS) and promoting neuroprotective effects against neurotoxic models. GUO showed neuroprotective effects against experimental models of seizures, spinal cord injury, pain, mood disorders and aging-related diseases, such as ischemia, PD and Alzheimer's disease and others *in vivo* and *in vitro* studies (Lanznaster et al., 2016). GUO treatment increased neurogenesis markers, reduced apoptotic cell death, increased TH positive cells in the SNpc and recovery the motor function in a PD model evoked by a proteasome inhibitor (Su et al., 2009). Recently, efficacy of GUO as an antiparkinsonian agent was identified due to its antidyskinetic effects in reserpine-induced catalepsy and tremulous jaw movements (Massari et al., 2017). In this study, we investigated the effects of GUO treatment in behavioral and biochemical alterations related with PD progression in an experimental protocol of resembling non-motor PD symptoms by i.n. MPTP infusion. Furthermore, we investigated effects of MPTP and GUO in the TH expression and regulation by evaluating immunocontent of total

and phosphorylated isoforms at Ser19, Ser31 and Ser40 in olfactory bulb, cortex and striatum.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURE

1.1 Animals

Male Wistar rats (3 months-old) weighting 300-350g, supplied by animal facility of the Federal University of Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brazil), were kept in collective cages (4 animals per cage) and maintained in a room under controlled conditions, a 12-h light-dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) at constant room temperature ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) with free access to food and water. All tests were carried out during the light phase of the cycle. Efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The procedures used in this study were performed in accordance with the guidelines on animal care of UFSC Ethics committee (CEUA) on Use of Animals, which follows the “Principles of Laboratory Animal Care” from NIH.

2.2 Experimental design

Animals were treated with a single dose (1 mg/nostril) of MPTP-HCl (Sigma Chemical Co., USA) was administered by i.n. route according to the procedure described by (Prediger et al., 2006). Briefly, rats were lightly anesthetized with isoflurane 0.96% (0.75 CAM; Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brazil) using a vaporizer system (SurgiVet, Inc., USA) and a 10-mm piece of PE-50 tubing was inserted through the nostrils. The tubing was connected to a peristaltic pump set at a flow rate of 12.5 $\mu\text{l}/\text{min}$. The MPTP-HCl was dissolved in 0.9% NaCl

(saline) at a concentration of 20 mg/ml. The control solution consisted of saline. Animals were given a 1-min interval to regain normal respiratory function, and then, this procedure was repeated with infusions administered through the contralateral nostrils.

GUO treatment consisted of a 7.5 mg/kg dose dissolved in saline by intraperitoneal (i.p) route for 20 days (Figure 1). This schedule of GUO treatment was based in previous studies (Massari et al., 2017; Lanznaster et al., 2016; Dobrachinski et al., 2017). Control and MPTP-treated group received saline by i.p for the same 20 days. We establish the first dose of GUO 6 hours after i.n. MPTP, based in previous studies which demonstrated MPTP-induced alterations in different brain regions related to the etiology of PD (Franco et al., 2007). In the 21th day, the animals were euthanized, the brain was removed and structures (olfactory bulb, cortex, striatum and hippocampus) were dissected and kept on ice until slices preparation for biochemical evaluation as described below (Figure 1). For immunoblotting analyses, brain regions were immediately frozen and kept at -80°C until the sample preparation.

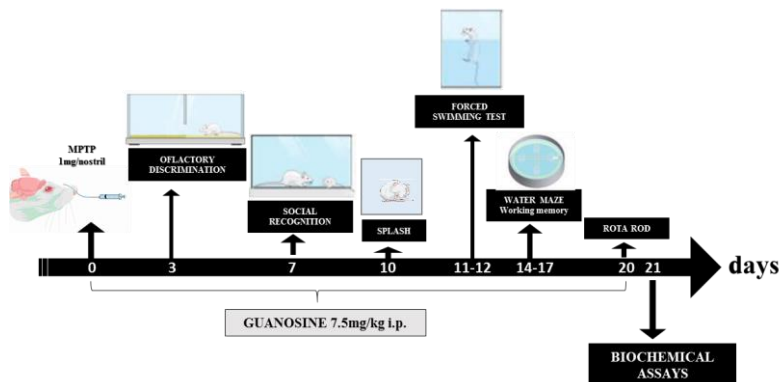


Figure 1. Schematic overview of behavioral protocols timeline carried out with MPTP and/or GUO-treated rats.

2.3 Behavioral tests

2.3.1 Olfactory discrimination

Olfactory discrimination ability of rats was assessed 3 days after i.n. administration of MPTP (Prediger et al., 2006). This task consisted of placing each rat for 5 min in a cage, which was divided into two identical compartments ($30 \times 30 \times 20$ cm) separated by an open door. Then, the animal could choose between one compartment with fresh sawdust (non-familiar compartment) and another with unchanged sawdust (familiar compartment) which same rat had occupied for 48h before the test. Each subject was initially placed in the center of the non-familiar compartment and the time (s) spent by the rat in both compartments (familiar vs. non-familiar) was recorded.

2.3.2 *Social recognition*

Short-term social memory was assessed with the social recognition task described by (Dantzer et al., 1987) and previously evaluated by (Prediger, 2005), 7 days after MPTP infusion. Adult rats were housed individually for 1 h in plastic cages (42 x 34 x 17 cm). All juveniles were isolated in individual cages for 30 min prior to the beginning of the experiment. The social recognition task consisted of two successive presentations (5 min each), separated by a short period of time, where the juvenile rat was placed in the home cage of the adult rat. The time spent by the adult investigating the juvenile (nosing, sniffing, grooming or pawing) was recorded. At the end of the first presentation, the juvenile was removed and kept on an individual cage during the delay period and re-exposed to the same adult rat after 30 min. In this paradigm, if the delay period is less than 40 min, the adult rodents display recognition of this juvenile, as indicated by a significant reduction in the social investigation time during the second presentation (Dantzer et al., 1987; Prediger et al., 2004). However, when the same juvenile is re-exposed after a longer time (more than 60 min) after the first presentation, the adult rat no longer recognizes this juvenile, i.e. the social investigation time in the second presentation is similar to that observed during the first one. Thus, a 30-min interval between two presentations of the same juvenile was used to demonstrate possible MPTP-related deficits in the social recognition memory.

2.3.4 *Splash test*

Splash test, which evaluates a form of motivational behavior considered to parallel some symptoms of anhedonia such as apathetic

behavior (Willner, 2005), was carried out and the time spent grooming and latency to the first grooming was recorded for a period of 15 min after squirting a 10% sucrose solution on the dorsal coat of the animals, as previously described (Machado et al., 2012).

2.3.5 *Forced swimming test (FST)*

Anhedonic depressive-like effects was assessed 12 days after i.n. MPTP administration in the FST as previously described (Porsolt, 1977). Rats were placed in individual glass cylinders (40 cm in height and 17 cm in diameter) containing water (water depth was 30 cm; ± 25 °C). Two swimming sessions were conducted (15-min training 24 h before a 5-min test). Total duration of immobility was manually scored continuously during a 5-min period. A rat was regarded as immobile when floating motionless or making only those movements necessary to keep its head above the water. Climbing behavior is defined as upward directed movements of the forepaw along the cylinder walls (Vieira et al., 2008).

2.3.6 *Morris Water maze task*

Presence of cognitive deficits was evaluated after i.n. MPTP infusion in the Morris Water maze (MWM) task. The sessions were performed in a circular swimming pool similar to described by (Morris et al., 1982). The pool was made of black painted fiberglass, 1.7 m inside diameter, 0.8 m high, and was filled to a depth of 0.6 m with water maintained at 25°C. The target platform (10 ×10 cm) was made of transparent Plexiglas and was submerged 1–1.5 cm beneath the surface of the water. Starting points for the animals were marked on the outside of the pool as north (N), south (S), east (E) and west (W). They were all

positioned with the lower edge 30 cm above the upper edge of the water tank, and in the standard setting the position of each symbol marked the midpoint of the perimeter of a quadrant (circle = NE quadrant, square = SE quadrant, cross = SW quadrant, and diamond = NW quadrant).

Apparatus was located in a room with indirect incandescent illumination and a monitor and a video-recording system were installed in an adjacent room. The experiments were video-taped and the scores for latency of escape from the starting point to the platform were measured. Animals were submitted to a working memory version of the water maze as previously described (Miyoshi et al., 2002). Test sessions were consisted of 4 training days, four consecutive trials per day, during which the animals were left in the tank facing the wall, then being allowed to swim freely to the submerged platform placed in the center of one of the four imaginary quadrants of the tank. One of the imaginary quadrants of the tank was the initial position in which the animal was left in and this was varied among trials in a pseudo-random way. If a rat did not find the platform during a period of 60s, it was gently guided to it. Animals were allowed to remain on the platform for 30 seconds and then moved to the next initial position without leaving the tank. On each subsequent training day, the platform position was moved to the center of another quadrant of the tank in a pseudo-random way.

2.3.7 *Rotarod*

Balance and coordination were measured in the Rotarod test (Insight®, Ribeirão Preto, Brazil), which the animals were submitted to a basal test with constant speed (12 rpm) during 1 min to confirm their ability to perform the task. All animals were able to perform this task.

Animals were submitted to a single session during which the rotation speed was progressively increased with automatic increase speed of the cylinder rotation (phase 1–2: 16 rpm; phase 3–4: 20 rpm; phase 5–6: 25 rpm; phase 7–8: 28 rpm; phase 9–10: 37 rpm) to measure the latency to fall, as previously described (Rial et al., 2014). The latency to fall was measured as an indicator of balance and motor coordination.

2.4 Biochemical Assays

2.4.1 Slices preparation

21 days after i.n. MPTP infusion, animals were euthanized and the whole brain was quickly removed. Olfactory bulb, cortex, striatum and hippocampus were dissected in ice-cold KREBS ringer buffer (KRB) (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.3 mM CaCl₂, 0.4 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, and 10 mM D-glucose, bubbled with 95% CO₂/ 5% O₂ up to pH 7.4). Slices (0.4 mm) were prepared using a McIlwain Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., England) and separated in KRB at 4°C. After sectioning, slices were incubated in KRB for 30 minutes, at 37°C, for recovery.

2.4.2 Reactive species generation, mitochondrial membrane potential and membrane permeability

Slices from brain regions were incubated with the molecular probe 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) for measured reactive oxygen species (ROS) generation. DCFH-DA (80 μM of DCFH-DA in KRB for 30 min at 37°C) diffuses through the cell membrane and is hydrolyzed by intracellular

esterases to the non-fluorescent form 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH). DCFH reacts with intracellular ROS to form dichlorofluorescein (DCF), a green fluorescent dye. DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of ROS and fluorescence was read using excitation and emission wavelengths of 480 and 525 nm, respectively.

Mitochondrial membrane potential was measured using the molecular probe tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) 100 nM for 30 min at 37°C. Fluorescence was measured using wavelengths of excitation and emission of 550 and 590 nm, respectively.

Membrane integrity was assessed by evaluating the uptake of the fluorescent exclusion dye, propidium iodide (PI, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), which is a polar compound that enters only in cells with damaged membranes. Once inside the cells, PI complexes with DNA and emits an intense red fluorescence (630 nm) when excited by green light (495 nm). Slices were incubated with PI (7 µg/ml) for 30 min at 37°C, and then washed with KRB for analysis on fluorescence microplate reader TECAN (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland). The results are expressed and normalized as percentages relative to the control conditions.

2.4.3 Tyrosine Hydroxylase expression assay

Brain regions were homogenized with lysis buffer (50mM Tris, pH 7.0, composition in millimolar: EDTA 1, NaF 100, PMSF 0.1, Na₃VO₄ 2; 1 % Triton X-100 and 10 % glycerol; and Sigma protease inhibitor cocktail). Thereafter, samples were incubated on ice for 10 min. Lysates were centrifuged (10,000 × g at 4 °C for 10 min) to eliminate

cellular debris. Supernatants were diluted 1/1 (v/v) in 100 mM Tris, pH 6.8, 4 mM EDTA, and 8 % SDS and then boiled for 5 min. Subsequently, the loading buffer (40 % glycerol, 100 mM Tris, bromophenol blue, pH 6.8) in the ratio 25:100 (v/v) and β -mercaptoethanol (final concentration 8 %) were added to the samples.

Samples (60 μ g of total protein) was separated by 10 % gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 10% gels (miniVE Vertical Electrophoresis System, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA), followed by transfer to nitrocellulose membranes using a semidry blotting apparatus (TE 70 SemiPhort Unit, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) (1.2 mA cm⁻²; 1 h 30 min). The membranes were blocked with 5% skim milk (SM) in Tris-buffered saline with Tween (TBST, 150 mM sodium chloride, 10 mM Tris, 0.075% Tween-20, pH 7.5) for 1 h. After blocking, the membranes were incubated with primary antibodies diluted in TBST 1% SM for total levels of TH (tTH, 1:2000) overnight at 4°C, pSer31 (1:500) for 1h at room temperature and pSer19 (1:2000) or pSer40 (1:500 in 1% SM) for 3h at room temperature. Subsequently, the membranes were incubated with anti-sheep–HRP (1:10 000) or anti-rabbit–HRP (1:5000) secondary antibodies for 1 h at room temperature. In between each incubation step, the membranes were washed in TBST. The membranes were then re-probed for detection of anti-b-actin–HRP (1:50 000) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Blots were developed by chemiluminescence reaction using a detection reagent (Luminata Classico HRP substrate). The density of the bands was measured using MultiGauge V3.0 (Fuji Film). The tTH was normalized to β -actin. pSer40, pSer31 and pSer19 were normalized to total-TH. Data

were expressed as a fold change of the mean + SEM relative to the mean of controls.

2.4.4 Protein Measurement

Protein content was evaluated by the method by the method of Peterson for Western blotting analyses (Peterson, 1977). Bovine serum albumin (Sigma Aldrich) was used as standard.

2.5 Statistical Analysis

Data were tested for normality by using the Kolmogorov-Smirnov normality test. For data obtained in the olfactory discrimination (familiar and non-familiar compartment) and in the social recognition time (second presentation and first presentation), Student's t test was used to determine whether the investigations time were different. Escape latency for finding the platform in the MWM test was analyzed using two-way ANOVA (repeated measures). For all other data, comparisons among groups were performed by two-way analysis of variance, followed by Newman-Keuls test if necessary. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant for all experiments. Statistical tests were performed using the Statistica software package (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

2 RESULTS

3.1 Guanosine prevents olfactory deficits and social recognition impairment induced by i.n. MPTP

Fig. 2 summarizes the effects of GUO treatment on olfactory ability if rats 3 days after i.n. MPTP infusion. Student's t test revealed an olfactory deficit, which is represented by the similar time of investigation

in two different compartments distinguished only by the smell in the MPTP-treated group ($P = 0.1860$). Animals in the MPTP+GUO-treated group presented a preference for one of the compartments ($P = 0.0511$), as well as the control-group (saline-treated animals) ($P = 0.034$) and GUO group ($P = 0.003$).

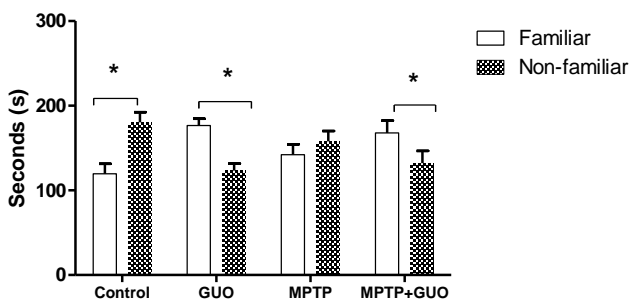


Figure 2 – Olfactory discrimination ability was evaluated 3 days after i.n. MPTP infusion (1 mg/ nostril) and treatment with GUO (7.5 mg/kg) ($n=7-9$). Animals were exposed to an apparatus with two identical compartments distinguished only by the smell and separated by an open door for 5 minutes. Each value represents the mean + SEM in each group. Data are expressed by time spend in each compartment and * $P \leq 0.05$ compared the time spend in each compartment in the respective group (Student's t test).

Fig. 3A shows MPTP-induced social memory impairment 7 days after i.n. MPTP infusion. Student's t test revealed statistical difference between investigation time in 1st and 2nd presentation in control-group ($P = 0.025$), GUO-treated group ($P = 0.034$) and in MPTP+GUO-treated group ($P = 0.016$). Additionally, ratio of the investigation duration (RID) (2nd time of investigation time/1st time of investigation time) is demonstrated in Fig 3B. Two-way ANOVA revealed that animals in the

MPTP-treated group showed significant difference in RID when compared with control-group ($F_{(3,30)} = 11.31$; $P = 0.002$). MPTP+GUO-treated group demonstrated ability of prevent significant increase observed in the RID compared with MPTP-treated group ($F_{(3,30)} = 3.77$; $P = 0.005$). Subsequent post-hoc comparisons indicated that MPTP-treated group present increased RID when compared with control-group ($P = 0.002$) and GUO treatment protects against social recognition impairment ($P = 0.005$).

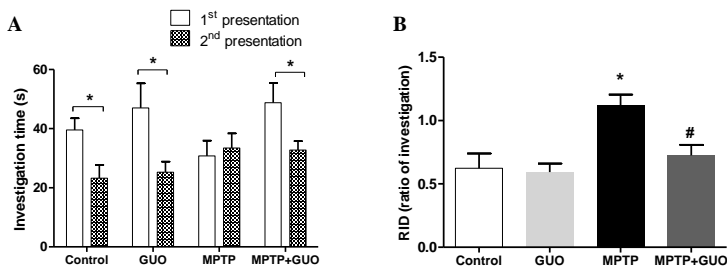


Figure 3 – Short time social memory recognition test was evaluated 7 days after i.n. MPTP infusion (1 mg/nostri) and treatment 0with GUO (7.5 mg/kg) ($n = 7-9$). Each value represents the mean + SEM in each group. (A) * $P \leq 0.05$. represents the investigation time in the first presentation (1st) to juvenile compared with the second presentation (2nd) in the respective group (Student's t test). (B) represents the ratio (2nd time of investigation / 1st time of investigation) and * $P \leq 0.05$. compared to the control-treated group and # compared with the MPTP-treated group (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

3.2 Depressive-like behavior evaluation after i.n. MPTP and GUO treatment

Self-cleanness and anhedonic behavior were evaluated in the splash test 10 days after the i.n. MPTP infusion. Two-way ANOVA revealed no significant differences in the grooming time among the MPTP-treated group ($F_{(3,30)} = 3.44$; $P = 0.57$), GUO-treated group ($F_{(3,30)} = 0.17$; $P = 0.68$) or MPTP+GUO-treated ($F_{(3,30)} = 0.52$; $P = 0.47$) when compared to the control-group (Fig. 4A). Also, latency to first grooming did not present statistical differences between GUO-treated group ($F_{(3,30)} = 0.36$; $P = 0.546$), MPTP-treated group ($F_{(3,30)} = 0.32$; $P = 0.828$) or MPTP+GUO-treated group ($F_{(3,30)} = 0.45$; $P = 0.501$) when compared with control-group (Fig. 4B).

Additionally, depressive-like behavior was evaluated through immobility time in the FST. No statistical difference was observed in the immobility time after GUO-treated group ($F_{(3,30)} = 0.12$; $P = 0.822$), MPTP-treated group ($F_{(3,30)} = 0.12$; $P = 0.689$) or MPTP+GUO-treated group ($F_{(3,30)} = 1.44$; $P = 0.998$) when compared with the control group (Fig. 4C, D and E, respectively). Swimming time revealed no statistical difference among GUO ($F_{(3,30)} = 0.50$; $P = 0.27$), MPTP ($F_{(3,30)} = 0.08$; $P = 0.49$) and MPTP+GUO-treated ($F_{(3,30)} = 3.6$; $P = 0.76$) (Fig. 4C). No significant differences were observed in Two-way ANOVA in the climbing time between GUO ($F_{(3,30)} = 0.50$; $P = 0.48$), MPTP ($F_{(3,30)} = 0.08$; $P = 0.77$) and MPTP+GUO-treated ($F_{(3,30)} = 3.6$; $P = 0.06$).

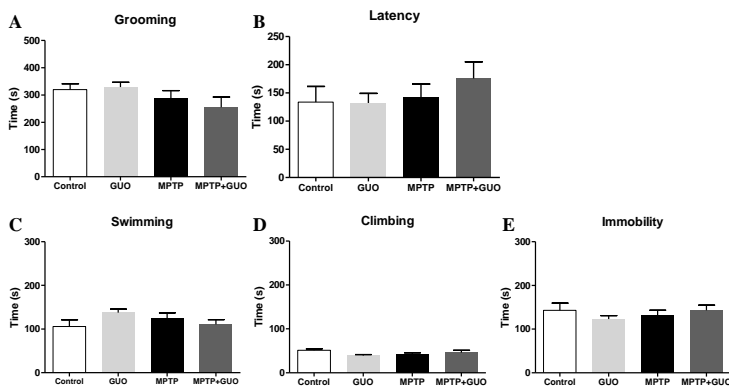


Figure 4 - Depressive-like behavior evaluated 10 and 12 days after i.n. MPTP infusion (1 mg/nostril) and GUO treatment (7.5 mg/kg) ($n = 7-9$). Each value represents the mean + SEM in each group. (A) and (B) represent grooming time and latency to first grooming in the splash test, which evaluated the self-cleanness behavior. (C), (D) and (E) represent swimming, climbing and immobility time in the forced swimming test (FST), respectively. No statistical difference was observed among the groups (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

3.3 Working memory evaluation in the Morris Water maze (MWM) task and motor function evaluation in the Rotarod

Working memory version of MWM task was performed 14-17 days after i.n. MPTP infusion is presented in Fig. 5. Treated-groups with GUO, MPTP and MPTP+GUO did not differ from their control-group in the escape latency for finding the platform in the training ($F_{(3,30)} = 0.13$; $P = 0.99$) using two-way ANOVA (repeated measures).

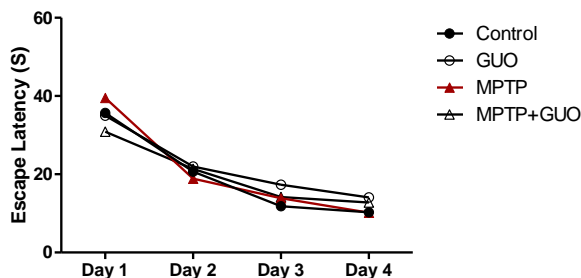


Figure 5 – Spatial working memory in the Morris water maze (MWM) task was evaluated 14-17 days after i.n. MPTP infusion (1 mg/ nostril) and treatment with GUO (7.5 mg/kg) ($n = 7-9$). Animals were placed in the MWM freely to swim to the submerged platform placed in the center of one of the four imaginary quadrants of the tank. No statistical difference was observed among the groups (two-way ANOVA repeat measures).

Motor function evaluated in the rotarod task 20 days after i.n. MPTP. Two-way ANOVA revealed that GUO ($F_{(3,30)} = 0.33$; $P = 0.56$), MPTP ($F_{(3,30)} = 2.57$; $P = 0.11$) or MPTP+GUO ($F_{(3,30)} = 0.33$; $P = 0.56$) did not present any differences when compared with control group (Fig. 6).

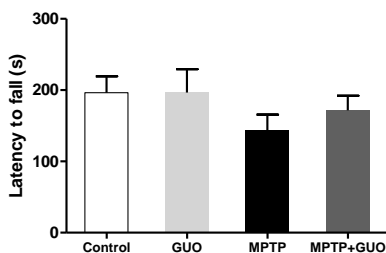


Figure 6 – Motor performance evaluated using the Rotarod 20 days after i.n. MPTP infusion (1 mg/ nostril) and GUO (7.5 mg/kg) treatment (n=7-9). Each value represents the mean + SEM in each group. No statistical difference was observed among the groups (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

3.5 Guanosine protects against mitochondrial membrane potential disruption and increased membrane permeability in olfactory bulb 21 days after MPTP intranasal infusion

In order to evaluate the biochemical changes involved in MPTP-induced toxicity, we assessed different brain regions related with mechanisms of PD pathology. Slices from olfactory bulb, cortex, striatum and hippocampus of rats were assayed for ROS generation, mitochondrial membrane potential and membrane permeability.

ROS generation analyses revealed no differences in slices from olfactory bulb ($F_{(3,19)} = 5.31$; $P = 0.386$), cortex ($F_{(3,19)} = 3.62$; $P = 0.334$), striatum ($F_{(3,19)} = 5.27$; $P = 0.256$) and hippocampus ($F_{(3,19)} = 0.017$; $P = 0.698$) of rats in the MPTP-treated group (Fig. 7).

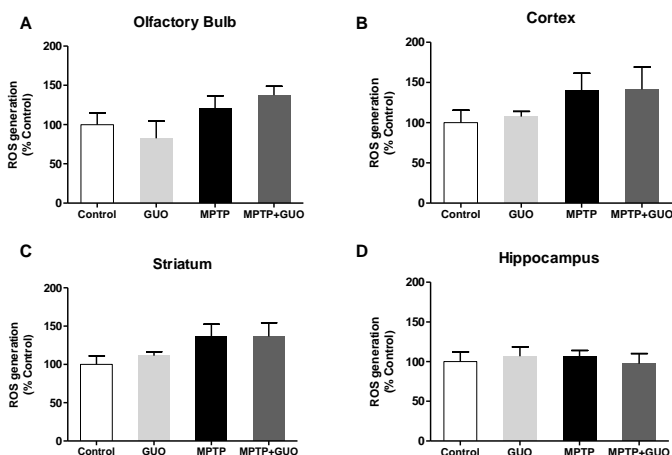


Figure 7 – Reactive species (ROS) generation was measured by relative fluorescence units of H₂DCFDA, performed 21 days after i.n. MPTP infusion (1mg/ nostril) and treatment with GUO (7.5 mg/kg). Olfactory bulb (A), cortical (B), striatal (C) and hippocampal (D) slices incubated for 30 minutes with DCFH-DA at 37°C. Data expressed as percentage of control represent means \pm SEM of five experiments (n = 5). No statistical difference was observed among the groups (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

Two-way ANOVA revealed increased TMRE fluorescence ($F_{(3,19)} = 1.10$; $P = 0.042$) (Fig. 8A) and increased PI incorporation ($F_{(3,19)} = 2.46$; $P = 0.045$) (Fig. 9A) in slices from olfactory bulb 21 days after i.n. MPTP. Increased PI incorporation was also observed in slices from the hippocampus ($F_{(3,19)} = 25.16$; $P = 0.005$) (Fig.9D). No statistically significant alterations were observed regarding PI incorporation in cortex ($F_{(3,19)} = 0.01$; $P = 0.539$) and striatum ($F_{(3,19)} = 0.87$; $P = 0.446$) after MPTP (Fig. 7B and C). Also, Two-way ANOVA revealed MPTP cause no alterations on mitochondrial membrane potential in slices from cortex

($F_{(3,19)} = 0.16$; $P = 0.989$), striatum ($F_{(3,19)} = 0.76$; $P = 0.449$) and hippocampus ($F_{(3,19)} = 0.17$; $P = 0.988$) (Fig. 9B, C and D). GUO treatment presented protective effects on MPTP-induced mitochondrial membrane potential disruption (TMRE) ($F_{(3,19)} = 7.41$; $P = 0.012$) (Fig. 8A) and on increased membrane permeability (PI) ($F_{(3,19)} = 2.38$; $P = 0.031$) (Fig. 9A) in slices from olfactory bulb. No alterations were observed after GUO treatment on MPTP-induced membrane permeability in hippocampus ($F_{(3,19)} = 0.16$; $P = 0.893$) (Fig. 9D).

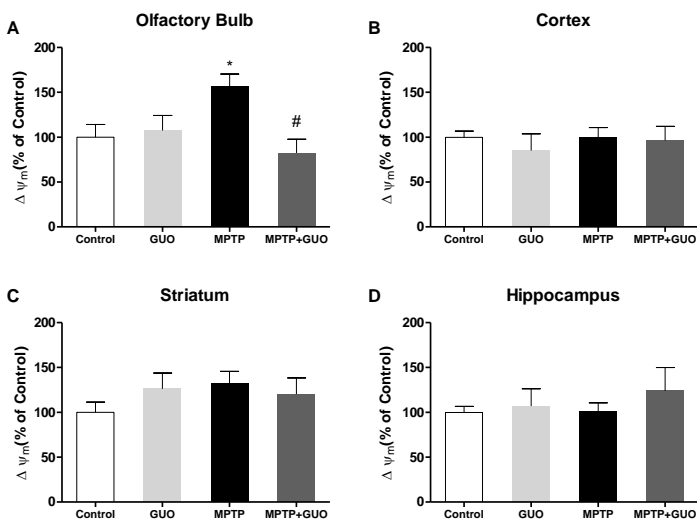


Figure 8 – Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was measured by relative fluorescence units of TMRE, performed 21 days after i.n. MPTP infusion (1mg/ nostril) and treatment with GUO (7.5 mg/kg). Olfactory bulb (A), cortical (B) striatal (C) and hippocampal (D) slices incubated for 30 minutes with TMRE at 37°C. Data expressed as percentage of control represent means \pm SEM of five experiments ($n = 5$). $P \leq 0.05$ compared with control-treated group (*) and MPTP-treated group (#) groups (two-way ANOVA followed by Newman-Keul's test).

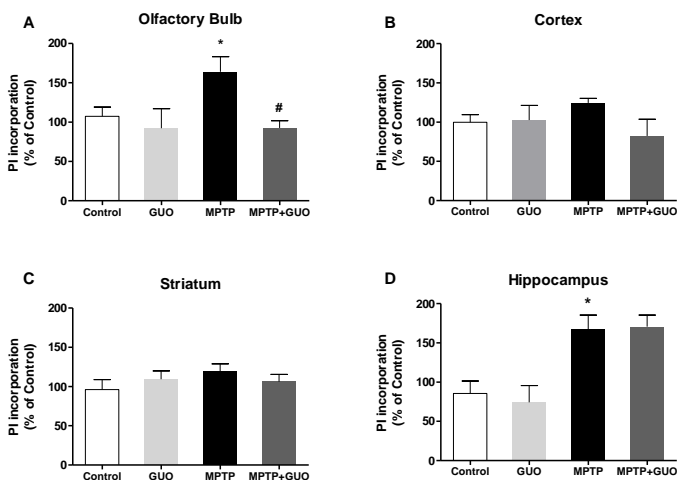


Figure 9 – Membrane permeability was measured by relative fluorescence units of PI, performed 21 days after i.n. MPTP infusion (1mg/ nostril) and treatment with GUO (7.5 mg/kg). Olfactory bulb (A), cortical (B) striatal (C) and hippocampal (D) slices incubated for 30 minutes with PI at 37°C. Data expressed as percentage of control represent means \pm SEM of five experiments (n = 5). *p < 0.05 compared with control-treated group and #compared with MPTP-treated group (two-way ANOVA followed by Newman-Keul’s test).

3.6 Evaluation of TH expression and regulation following intranasal infusion of MPTP and treatment with GUO

We investigated the TH expression in brain regions of rats 21 days after the intranasal infusion of MPTP and GUO treatment. Using immunoblotting analyses, we demonstrated that tTH expression is detectable in olfactory bulb (Fig. 10), cortex (Fig. 11) and striatum (Fig. 13) of rats. In the hippocampus TH immunocontent was not detectable.

Regarding the phosphorylated sites of TH, two-way ANOVA revealed no statistical differences in brain regions following the

treatments, suggesting that neither intranasal MPTP nor GUO treatment were effective in regulating the phosphorylation levels of TH. Although we observed a slight increase in pSer19 site in olfactory bulb ($F_{(3, 15)} = 0.89$; $P = 0.500$) (Fig. 10C), cortex ($F_{(3, 15)} = 0.23$; $P = 0.469$) (Fig. 11C) after GUO treatment when compared to the control-treated group. In the same line, a slight increase in pSer40 ($F_{(3, 15)} = 0.14$; $P = 0.252$) (Fig. 12E) was observed in the striatum after GUO treatment, which did not reach statistical significance as well.

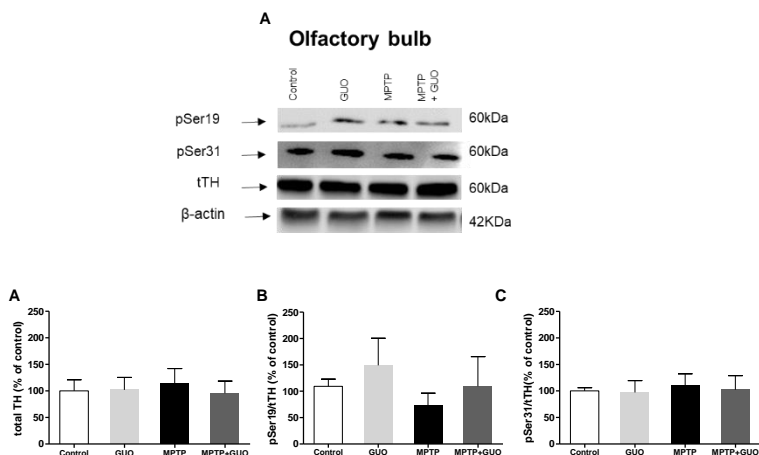


Figure 10 – Phosphorylation profile of TH in olfactory bulb of rats, evaluated 21 days after i.n. MPTP infusion (1 mg/nostril) and treatment with GUO (7.5 mg/kg) ($n = 4$). (A) Representative immunoblots of two different animals for total TH (tTH), pSer19, pSer31 and β -actin. (B) Immunocontent of tTH normalized to β -actin; (C) pSer19 and (D) pSer31 phosphorylation normalized to tTH content. No statistical difference was observed among the groups (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

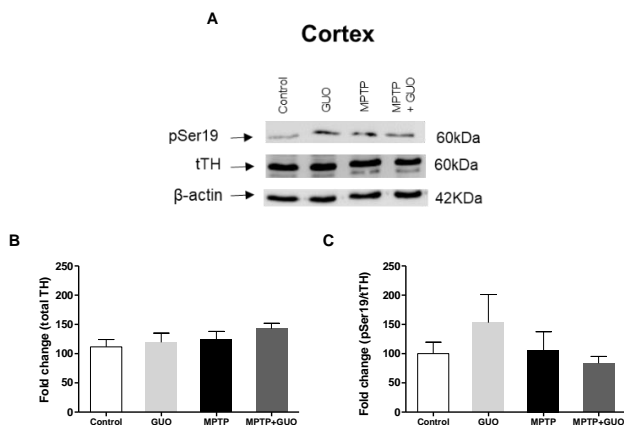


Figure 11 – Phosphorylation profile of TH in cortex of rats, evaluated 21 days after i.n. MPTP infusion (1 mg/nostril) and treatment with GUO (7.5 mg/kg) (n = 4). (A) Representative immunoblots of two different animals for total TH (tTH), pSer19 and β -actin. (B) Immunocontent of total tTH normalized to β-actin and (C) pSer19 phosphorylation normalized to tTH content. No statistical difference was observed among the groups (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

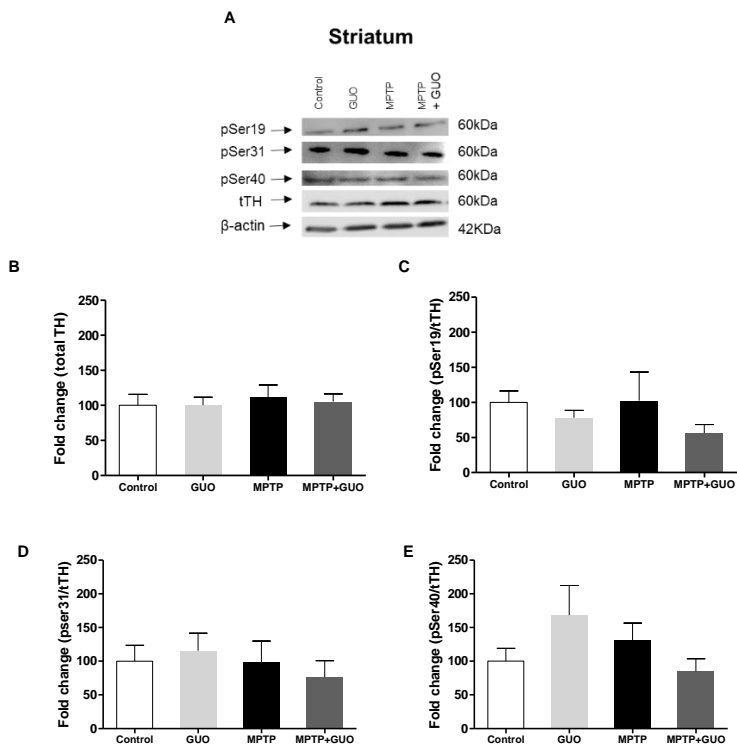


Figure 12 - Phosphorylation profile of TH in striatum of rats, evaluated 21 days after i.n. MPTP infusion (1 mg/nostiril) and treatment with GUO (7.5 mg/kg) (n = 4). (A) Representative immunoblots of two different animals for total TH (tTH), pSer19, pSer31, pSer40 and β -actin. (B) Immunocontent of tTH normalized to β-actin; (C) pSer19, (D) pSer31 and (E) pSer40 phosphorylation normalized to tTH content. No statistical difference was observed among the groups (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls test).

4. DISCUSSION

Motor symptoms of PD are preceded by non-motor symptoms that include hyposmia, sleep disorders, cognitive impairment, autonomic dysfunction, depression and constipation. The neuroanatomical and neuropharmacological bases of non-motor abnormalities in PD remain largely undefined (Schapira et al., 2017). Indeed, with the progression of disease, non-motor problems come to dominate the clinical picture and are the main determinants for the quality of life of patients (Chaudhuri et al., 2006). Recent evidence suggests that PD may have several endophenotypes and some of these are dominated by non-motor symptoms (Marras et al., 2016). In this scenario, not only models that demonstrated new biomarkers for early symptoms of PD, but also consider new therapies for non-motor symptoms are extremely important. Therefore, there is increasing evidence of the neuroprotective effects of GUO and its beneficial effects against degeneration in neurological disease models (Lanznaster et al., 2016).

Antiparkinsonian efficacy of GUO against motor symptoms in different rodent models of movement disorder were reported recently (Massari et al., 2017). Orally administered GUO prevented reserpine-mediated catalepsy, reduced reserpine-induced tremulous jaw movements, and potentiated the number of contralateral rotations induced by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) in unilaterally 6-hydroxidopamine-lesioned rats. Additionally, GUO inhibited L-DOPA-induced dyskinesia in unilaterally 6-hydroxidopamine-lesioned rats.

Here, we demonstrated that MPTP (1 mg/nostril) induced olfactory discrimination deficits 3 days after its infusion, similar to

observed with 0.1 mg MPTP/nostril in a previous study (Castro et al., 2012). In the present study, we showed for the first time, that GUO prevented the development olfactory impairment induced by i.n. MPTP in rats, related with non-motor symptoms observed in PD. Additionally, we demonstrated some biochemical alterations that remain in olfactory bulb and hippocampus three weeks after MPTP-induced damage.

Corroborating with previous results demonstrating the social memory impairment induced by i.n. MPTP (Prediger et al., 2006; Castro et al., 2013; Moreira et al., 2010) the present study shows i.n. MPTP induced social recognition impairment 7 days after infusion. Social recognition memory is a model of olfactory memory mediated by olfactory cues (Sawyer, 1984) involving a non-procedural form of a short-term working memory based upon the olfactory discriminative ability of rats. Our findings demonstrate that GUO treatment (7.5 mg/kg, i.p.) prevented short-term social recognition memory impairment induced by MPTP. Different brain areas are involved in the process of learning in short-term recognition memory as olfactory bulb, amygdala and cortex (Perna et al., 2015). Several studies demonstrated various neurotransmitters systems are involved in recognition memory of rodents as dopaminergic (Baulac et al., 1986; Seamans et al., 1998), β -adrenergic (Griffin, 1995), serotonergic (Letty et al., 1997; Cavalcante et al., 2017), and interaction between adenosine and dopamine receptors (Prediger et al., 2005). Further studies are necessary for explaining the mechanisms involved in GUO protection against MPTP induced short-term recognition memory. However, it is known that GUO exerts protective effects via adenosine receptors modulation (Dal-Cim et al., 2012; Dal-Cim et al., 2013). Then, it is feasible that GUO modulation of adenosine

receptors and interaction between adenosine and dopamine receptors may be involved in these effects.

In order to access motivational alterations following MPTP treatment, self-cleanness and motivational behavior and anhedonic depressive-like behavior were analyzed in the splash test and FST, respectively. No differences were observed among treatments in these behavioral tasks. In contrast, previous studies demonstrated i.n. MPTP induced depressive-like behavior by increase of immobility time in FST, 14 days (Castro et al., 2013) and 16 days (Moreira et al., 2010) after infusion. Also, we did not observed alterations in latency to scape in working memory evaluated in MWM test 14-17 days after i.n MPTP infusion. Prediger (2006) demonstrated that i.n. MPTP 0.1 mg/nostril induced impairment in working memory 7 days after i.n. MPTP infusion, thus we believe the impairment might overturned in a time-dependent way. Previous studies reported impairment in motor function evaluated in activity chamber, 32 days after i.n. MPTP 1 mg/nostril (Castro et al., 2013; Moreira et al., 2010). Balance and motor coordination of rats were tested in the accelerated rotarod 20 days after the infusion and did not show any significant alterations in the motor function, confirming that this protocol may resemble initial phases of non-motor symptoms of PD.

Early changes in oxidative stress in brain structures of rats were detected after i.n. MPTP administration (Franco et al., 2007). Also, we demonstrated biochemical alterations in oxidative parameters, ROS generation and decreased mitochondrial complex I activity in striatum 6 hours after i.n. MPTP infusion (Marques et al., 2018). Thus, several evidence suggest MPTP intranasal as a relevant model to investigate new treatments able to modify the progression of the disease since it allows to

detect early behavioral and biochemical events related with early stages of the disease (Prediger et al., 2011).

To evaluate putative bioenergetics and functional alterations in brain regions 21 days after the i.n. MPTP infusion, olfactory bulb, cortical, striatal and hippocampal slices were analysed. We reported altered mitochondrial membrane potential and increased membrane permeability in olfactory bulb slices 21 days after MPTP infusion. GUO treatment prevented those alterations. Protective effects of GUO on neurological *in vivo* and *in vitro* models have pointed to mitochondrial function as a putative GUO target (Dobrachinski et al., 2017; Dal-Cim et al., 2013; Thomaz et al., 2016). Oxidative stress is usually related with mitochondrial disruption and membrane permeability damage in toxic conditions in the SNC. We observed an increase of ROS generation of 20, 40 and 36% in olfactory bulb, cortex and striatum, respectively, although they do not reach statistical significance. In hippocampal slices, i.n. MPTP infusion did not induce ROS generation.

Evidence from clinical studies and toxin-based models has pointed TH regulation as a possible target for progression and prodromal phase of PD. Furthermore, changes in expression and phosphorylation of TH in brain and periphery tissues can potentially reveal how TH stability and functionality are compromised in PD. As such, these changes can reveal how catecholamine synthesis capacity is gradually compromised and how changes in cellular signaling may govern the functional status of remaining catecholaminergic neurons (Johnson, 2016).

Previous studies demonstrated intraperitoneal or intranasal administration of MPTP decreased TH expression in SNpc and striatum (Alcaraz-Zubeldia et al., 2009; Ambrosio et al., 1987; Hadjiconstantinou

et al., 1994; Neff et al., 2006; Khaldy et al., 2003; Mayer, 1986). However, studies of regulation of TH by phosphorylation in Ser19, 31 and 40 after MPTP administration are restricted to the nigrostriatal pathway. (Boukhzar et al., 2016) demonstrated decrease in the pSer31 phosphorylation (28.2%) and in the pSer40 (43.7%), followed by the dopamine depletion (35.8%) in the striatum of mice, 1 h after single administration of MPTP (15 mg/kg i.p.). Meanwhile, (Liu et al., 2008) demonstrated an increase in the pSer31 without alterations in pSer40, 7 days after four administration of MPTP (20 mg/kg i.p.) in the SNpc. In addition, (Naskar et al., 2015) demonstrated an increase in the pSer40, 7 days after a single administration of MPTP (30 mg/kg i.p) in the striatum of mice.

Intranasal MPTP (1 mg/nostril) decrease TH expression in olfactory bulb 1 day after infusion, this effect has been related with the olfactory deficits. In addition, TH expression and olfactory deficits returned to the baseline levels 21 days after MPTP infusion (Prediger et al., 2006). Accordingly, we did not observed alteration on tTH expression or phosphorylation sites in the olfactory bulb 21 days after MPTP i.n. infusion. Additionally, more evaluations for co-related biochemical changes and TH regulation and behavioral alterations are required to clarify the mechanisms involved in the MPTP progression lesion.

Additionally, phosphorylation at Ser40 was not detectable in the cortex and olfactory bulb, as well as phosphorylation at Ser31 in the cortex of rats. Phosphorylation rate of TH is regulated by the presence of kinases and phosphatases, which are involved in the mechanism of phosphorylation and dephosphorylation at each serine residue. Previous studies demonstrated that either kinases for pSer40 are more active as the

phosphatases are less active in the cell body regions as SN and ventral tegmental area (VTA), and there is a lower rate of phosphorylation at the neuron terminals as cortex, striatum and nucleus accumbens (NAC) (Salvatore et al., 2000; Ong et al., 2014; Saraf, 2010). Perhaps the same mechanism is observed in the nigro-olfactory pathway projections, that could explain the non-detection of pSer40 in the olfactory bulb.

The basal TH phosphorylation stoichiometry at Ser31 for neuron cell body regions of the brain, including the SN, VTA, hypothalamus and LC, is between 6-13%. For the nerve terminal regions of the brain, including the striatum, medial pre-frontal cortex (mPFC) and the NAC the basal phosphorylation stoichiometry at Ser31 is between 21-36%, indicating that Ser31 kinases are more active relative to Ser31 phosphatases at nerve terminals *in vivo* when compared to their corresponding cell bodies (Salvatore, 2012; Dunkley, 2019). Here, we detected pSer31 in striatum and olfactory bulb, but not in the cortex of rats.

Regarding phosphorylation at Ser19, immunohistochemical study in the rat brain demonstrated that phosphorylation at Ser19 is always detectable along with TH protein (Xu et al., 1998). Here, pSer19 was not detectable only in hippocampus, where TH was not detectable as well.

In summary, GUO protects against i.n. MPTP-induced olfactory (3 days) and social recognition memory impairment (7 days). Also, GUO prevents mitochondrial membrane disruption and increased membrane permeability induced by MPTP (21 days) in slices from olfactory bulb. Also, we demonstrated that ROS generation and TH regulation are not involved in MPTP-induced biochemical impairment in brain regions 3

weeks after the infusion. Further studies are necessary for characterizing the model as a tool to achieve biological markers of the progression of non-motor symptoms of PD and unravel mechanisms involved on GUO-induced antiparkinsonian effects.

REFERENCES

Alcaraz-Zubeldia, M., M. C. Boll-Woehrlen, S. Montes-López, F. Pérez-Severiano, J. C. Martínez-Lazcano, A. Díaz-Ruiz, and C. Ríos. 2009. "Copper sulfate prevents tyrosine hydroxylase reduced activity and motor deficits in a Parkinson's disease model in mice." *Rev Invest Clin* 61 (5):405-11.

Ambrosio, S., P. Gerli, C. Perego, and S. Algeri. 1987. "Different toxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the nigrostriatal and mesolimbic pathways." *Eur J Pharmacol* 133 (2):239-41.

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

Bobrovskaya, L., P. R. Dunkley, and P. W. Dickson. 2004. "Phosphorylation of Ser19 increases both Ser40 phosphorylation and enzyme activity of tyrosine hydroxylase in intact cells." *J Neurochem* 90 (4):857-64. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02550.x.

Boukhzar, L., A. Hamieh, D. Cartier, Y. Tanguy, I. Alsharif, M. Castex, A. Arabo, S. El Hajji, J. J. Bonnet, M. Errami, A. Falluel-Morel, A. Chagraoui, I. Lihmann, and Y. Anouar. 2016. "Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease." *Antioxid Redox Signal* 24 (11):557-74. doi: 10.1089/ars.2015.6478.

Castro, A. A., K. Ghisoni, A. Latini, J. Quevedo, C. I. Tasca, and R. D. Prediger. 2012. "Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease." *Behav Brain Res* 229 (1):208-15. doi: 10.1016/j.bbr.2012.01.016.

Castro, A. A., B. P. Wiemes, F. C. Matheus, F. R. Lapa, G. G. Viola, A. R. Santos, C. I. Tasca, and R. D. Prediger. 2013. "Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in

rats, an experimental model of Parkinson's disease." *Brain Res* 1513:103-16. doi: 10.1016/j.brainres.2013.03.029.

Cavalcante, L. E. S., C. G. Zinn, S. D. Schmidt, B. F. Saenger, F. F. Ferreira, C. R. G. Furini, J. C. Myskiw, and I. Izquierdo. 2017. "Modulation of the storage of social recognition memory by neurotransmitter systems in the insular cortex." *Behav Brain Res* 334:129-134. doi: 10.1016/j.bbr.2017.07.044.

Chaudhuri, K. R., D. G. Healy, A. H. Schapira, and National Institute for Clinical Excellence. 2006. "Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management." *Lancet Neurol* 5 (3):235-45. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70373-8.

Chaudhuri, K. R., and A. H. Schapira. 2009. "Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment." *Lancet Neurol* 8 (5):464-74. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70068-7.

Dal-Cim, T., F. K. Ludka, W. C. Martins, C. Reginato, E. Parada, J. Egea, M. G. López, and C. I. Tasca. 2013. "Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions." *J Neurochem* 126 (4):437-50. doi: 10.1111/jnc.12324.

Dal-Cim, T., S. Molz, J. Egea, E. Parada, A. Romero, J. Budni, M. D. Martín de Saavedra, L. del Barrio, C. I. Tasca, and M. G. López. 2012. "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* 61 (3):397-404. doi: 10.1016/j.neuint.2012.05.021.

Dantzer, R., R. M. Bluthé, G. F. Koob, and M. Le Moal. 1987. "Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides." *Psychopharmacology (Berl)* 91 (3):363-8.

Dobrachinski, F., R. da Rosa Gerbatin, G. Sartori, N. Ferreira Marques, A. P. Zemolin, L. F. Almeida Silva, J. L. Franco, L. F. Freire Royes, M. Rechia Figuera, and F. A. Antunes Soares. 2017. "Regulation of Mitochondrial Function and Glutamatergic System Are the Target of

Guanosine Effect in Traumatic Brain Injury." *J Neurotrauma* 34 (7):1318-1328. doi: 10.1089/neu.2016.4563.

Dunkley, P. R., L. Bobrovskaya, M. E. Graham, E. I. von Nagy-Felsobuki, and P. W. Dickson. 2004. "Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences." *J Neurochem* 91 (5):1025-43. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02797.x.

Dunkley, P. R., and P. W. Dickson. 2019. "Tyrosine Hydroxylase Phosphorylation In Vivo." *J Neurochem*. doi: 10.1111/jnc.14675.

Edelman, A. M., J. D. Raese, M. A. Lazar, and J. D. Barchas. 1978. "In vitro phosphorylation of a purified preparation of bovine corpus striatal tyrosine hydroxylase." *Commun Psychopharmacol* 2 (6):461-5.

Franco, J., R. D. Prediger, P. Pandolfo, R. N. Takahashi, M. Farina, and A. L. Dafre. 2007. "Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb." *Life Sci* 80 (20):1906-14. doi: 10.1016/j.lfs.2007.02.021.

Gordon, S. L., L. Bobrovskaya, P. R. Dunkley, and P. W. Dickson. 2009. "Differential regulation of human tyrosine hydroxylase isoforms 1 and 2 in situ: Isoform 2 is not phosphorylated at Ser35." *Biochim Biophys Acta* 1793 (12):1860-7. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.10.001.

Griffin, M. G., and G. T. Taylor. 1995. "Norepinephrine modulation of social memory: evidence for a time-dependent functional recovery of behavior." *Behav Neurosci* 109 (3):466-73.

Hadjiconstantinou, M., J. P. Hubble, T. A. Wemlinger, and N. H. Neff. 1994. "Enhanced MPTP neurotoxicity after treatment with isofluorophate or cholinergic agonists." *J Pharmacol Exp Ther* 270 (2):639-44.

Haycock, J. W., N. G. Ahn, M. H. Cobb, and E. G. Krebs. 1992. "ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (6):2365-9.

Haycock, J. W., and D. A. Haycock. 1991. "Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes." *J Biol Chem* 266 (9):5650-7.

J, Perna, and Engelmann M. 2015. "Recognizing others rodent's social memories." In *Soc. Behav. Rodents Hum.*, edited by S. Krach, pp. 25–45. Springer International Publishing.

Johnson, M. E., M. F. Salvatore, S. A. Maiolo, and L. Bobrovskaya. 2018. "Tyrosine hydroxylase as a sentinel for central and peripheral tissue responses in Parkinson's progression: Evidence from clinical studies and neurotoxin models." *Prog Neurobiol* 165-167:1-25. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.01.002.

Khaldy, H., G. Escames, J. León, L. Bikjdaouene, and D. Acuña-Castroviejo. 2003. "Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion." *Neurobiol Aging* 24 (3):491-500.

Lanznaster, D., T. Dal-Cim, T. C. Piermartiri, and C. I. Tasca. 2016. "Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders." *Aging Dis* 7 (5):657-679. doi: 10.14336/AD.2016.0208.

Lanznaster, D., J. M. Mack, V. Coelho, M. Ganzella, R. F. Almeida, T. Dal-Cim, G. Hansel, E. R. Zimmer, D. O. Souza, R. D. Prediger, and C. I. Tasca. 2016. "Guanosine Prevents Anhedonic-Like Behavior and Impairment in Hippocampal Glutamate Transport Following Amyloid- β 1-40 Administration in Mice." *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-016-0082-1.

Lehmann, I. T., L. Bobrovskaya, S. L. Gordon, P. R. Dunkley, and P. W. Dickson. 2006. "Differential regulation of the human tyrosine hydroxylase isoforms via hierarchical phosphorylation." *J Biol Chem* 281 (26):17644-51. doi: 10.1074/jbc.M512194200.

Letty, S., R. Child, A. Dumuis, A. Pantaloni, J. Bockaert, and G. Rondouin. 1997. "5-HT₄ receptors improve social olfactory memory in the rat." *Neuropharmacology* 36 (4-5):681-7.

Liu, M., R. Hunter, X. V. Nguyen, H. C. Kim, and G. Bing. 2008. "Microsomal epoxide hydrolase deletion enhances tyrosine hydroxylase phosphorylation in mice after MPTP treatment." *J Neurosci Res* 86 (12):2792-801. doi: 10.1002/jnr.21725.

Machado, D. G., M. P. Cunha, V. B. Neis, G. O. Balen, A. R. Colla, J. Grando, P. S. Brocardo, L. E. Bettio, J. B. Dalmarco, D. Rial, R. D. Prediger, M. G. Pizzolatti, and A. L. Rodrigues. 2012. "Rosmarinus officinalis L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice." *J Ethnopharmacol* 143 (1):158-69. doi: 10.1016/j.jep.2012.06.017.

Marques, N. F., A. A. Castro, G. Mancini, F. L. Rocha, A. R. S. Santos, R. D. Prediger, A. F. De Bem, and C. I. Tasca. 2018. "Atorvastatin Prevents Early Oxidative Events and Modulates Inflammatory Mediators in the Striatum Following Intranasal 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) Administration in Rats." *Neurotox Res* 33 (3):549-559. doi: 10.1007/s12640-017-9840-8.

Marras, C., A. Lang, B. P. van de Warrenburg, C. M. Sue, S. J. Tabrizi, L. Bertram, S. Mercimek-Mahmutoglu, D. Ebrahimi-Fakhari, T. T. Warner, A. Durr, B. Assmann, K. Lohmann, V. Kostic, and C. Klein. 2016. "Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force." *Mov Disord* 31 (4):436-57. doi: 10.1002/mds.26527.

Massari, C. M., M. López-Cano, F. Núñez, V. Fernández-Dueñas, C. I. Tasca, and F. Ciruela. 2017. "Antiparkinsonian Efficacy of Guanosine in Rodent Models of Movement Disorder." *Front Pharmacol* 8:700. doi: 10.3389/fphar.2017.00700.

Matheus, F. C., A. S. Aguiar, A. A. Castro, J. G. Villarinho, J. Ferreira, C. P. Figueiredo, R. Walz, A. R. Santos, C. I. Tasca, and R. D. Prediger. 2012. "Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)." *Behav Brain Res* 235 (2):263-72. doi: 10.1016/j.bbr.2012.08.017.

Mayer, R. A., A. S. Walters, and R. E. Heikkila. 1986. "1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration to C57-black mice leads to parallel decrements in neostriatal dopamine content and tyrosine hydroxylase activity." *Eur J Pharmacol* 120 (3):375-7.

Miyoshi, E., S. Wietzikoski, M. Camplessei, R. Silveira, R. N. Takahashi, and C. Da Cunha. 2002. "Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions." *Brain Res Bull* 58 (1):41-7.

Moreira, E. L., D. Rial, A. S. Aguiar, C. P. Figueiredo, J. M. Siqueira, S. DalBó, H. Horst, J. de Oliveira, G. Mancini, T. S. dos Santos, J. G. Villarinho, F. V. Pinheiro, J. Marino-Neto, J. Ferreira, A. F. De Bem, A. Latini, M. G. Pizzolatti, R. M. Ribeiro-do-Valle, and R. D. Prediger. 2010. "Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease." *J Neural Transm (Vienna)* 117 (12):1337-51. doi: 10.1007/s00702-010-0464-x.

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

Naskar, A., V. Prabhakar, R. Singh, D. Dutta, and K. P. Mohanakumar. 2015. "Melatonin enhances L-DOPA therapeutic effects, helps to reduce its dose, and protects dopaminergic neurons in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice." *J Pineal Res* 58 (3):262-74. doi: 10.1111/jpi.12212.

Neff, N. H., T. A. Wemlinger, A. M. Duchemin, and M. Hadjiconstantinou. 2006. "Clozapine modulates aromatic L-amino acid decarboxylase activity in mouse striatum." *J Pharmacol Exp Ther* 317 (2):480-7. doi: 10.1124/jpet.105.097972.

Ong, L. K., E. A. Fuller, L. Sominsky, D. M. Hodgson, P. R. Dunkley, and P. W. Dickson. 2017. "Early life peripheral lipopolysaccharide challenge reprograms catecholaminergic neurons." *Sci Rep* 7:40475. doi: 10.1038/srep40475.

Ong, L. K., L. Guan, H. Damanhuri, A. K. Goodchild, L. Bobrovskaya, P. W. Dickson, and P. R. Dunkley. 2014. "Neurobiological consequences of acute footshock stress: effects on tyrosine hydroxylase phosphorylation and activation in the rat brain and adrenal medulla." *J Neurochem* 128 (4):547-60. doi: 10.1111/jnc.12482.

Ong, L. K., S. Page, G. D. Briggs, L. Guan, M. D. Dun, N. M. Verrills, P. R. Dunkley, and P. W. Dickson. 2017. "Peripheral Lipopolysaccharide Challenge Induces Long-Term Changes in Tyrosine Hydroxylase Regulation in the Adrenal Medulla." *J Cell Biochem* 118 (8):2096-2107. doi: 10.1002/jcb.25839.

Ong, L. K., L. Sominsky, P. W. Dickson, D. M. Hodgson, and P. R. Dunkley. 2012. "The sustained phase of tyrosine hydroxylase activation in vivo." *Neurochem Res* 37 (9):1938-43. doi: 10.1007/s11064-012-0812-3.

Peres, T. V., L. K. Ong, A. P. Costa, H. Eyng, D. K. Venske, D. Colle, F. M. Gonçalves, M. W. Lopes, M. Farina, M. Aschner, P. W. Dickson, P. R. Dunkley, and R. B. Leal. 2016. "Tyrosine hydroxylase regulation in adult rat striatum following short-term neonatal exposure to manganese." *Metallomics* 8 (6):597-604. doi: 10.1039/c5mt00265f.

Peterson, G. L. 1977. "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." *Anal Biochem* 83 (2):346-56.

Porsolt, R. D., M. Le Pichon, and M. Jalfre. 1977. "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments." *Nature* 266 (5604):730-2.

Prediger, R. D., A. S. Aguiar, E. L. Moreira, F. C. Matheus, A. A. Castro, R. Walz, A. F. De Bem, A. Latini, C. I. Tasca, M. Farina, and R. Raisman-Vozari. 2011. "The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease." *Curr Pharm Des* 17 (5):489-507.

Prediger, R. D., A. S. Aguiar, A. E. Rojas-Mayorquin, C. P. Figueiredo, F. C. Matheus, L. Ginestet, C. Chevarin, E. D. Bel, R. Mongeau, M.

- Hamon, L. Lanfumey, and R. Raisman-Vozari. 2010. "Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease." *Neurotox Res* 17 (2):114-29. doi: 10.1007/s12640-009-9087-0.
- Prediger, R. D., L. C. Batista, R. Medeiros, P. Pandolfo, J. C. Florio, and R. N. Takahashi. 2006. "The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease." *Exp Neurol* 202 (2):391-403. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.07.001.
- Prediger, R. D., L. C. Batista, E. Miyoshi, and R. N. Takahashi. 2004. "Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors." *Behav Brain Res* 153 (1):149-57. doi: 10.1016/j.bbr.2003.11.009.
- Prediger, R. D., C. Da Cunha, and R. N. Takahashi. 2005. "Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats." *Behav Pharmacol* 16 (4):209-18.
- Prediger, R. D., D. Rial, R. Medeiros, C. P. Figueiredo, R. L. Doty, and R. N. Takahashi. 2009. "Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease." *Ann N Y Acad Sci* 1170:629-36. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.03885.x.
- Przedborski, S. 2017. "The two-century journey of Parkinson disease research." *Nat Rev Neurosci* 18 (4):251-259. doi: 10.1038/nrn.2017.25.
- Rial, D., A. A. Castro, N. Machado, P. Garção, F. Q. Gonçalves, H. B. Silva, A. R. Tomé, A. Köfalvi, O. Corti, R. Raisman-Vozari, R. A. Cunha, and R. D. Prediger. 2014. "Behavioral phenotyping of Parkin-deficient mice: looking for early preclinical features of Parkinson's disease." *PLoS One* 9 (12):e114216. doi: 10.1371/journal.pone.0114216.
- Salvatore, M. F., A. Garcia-Espana, M. Goldstein, A. Y. Deutch, and J. W. Haycock. 2000. "Stoichiometry of tyrosine hydroxylase phosphorylation in the nigrostriatal and mesolimbic systems in vivo: effects of acute haloperidol and related compounds." *J Neurochem* 75 (1):225-32.

Salvatore, M. F., and B. S. Prueett. 2012. "Dichotomy of tyrosine hydroxylase and dopamine regulation between somatodendritic and terminal field areas of nigrostriatal and mesoaccumbens pathways." *PLoS One* 7 (1):e29867. doi: 10.1371/journal.pone.0029867.

Salvatore, M. F., J. C. Waymire, and J. W. Haycock. 2001. "Depolarization-stimulated catecholamine biosynthesis: involvement of protein kinases and tyrosine hydroxylase phosphorylation sites in situ." *J Neurochem* 79 (2):349-60.

Saraf, A., E. A. Oberg, and S. Strack. 2010. "Molecular determinants for PP2A substrate specificity: charged residues mediate dephosphorylation of tyrosine hydroxylase by the PP2A/B' regulatory subunit." *Biochemistry* 49 (5):986-95. doi: 10.1021/bi902160t.

Sawyer, T. F., A. K. Hengehold, and W. A. Perez. 1984. "Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats." *Behav Neurosci* 98 (5):908-13.

Schapira, A. H. V., K. R. Chaudhuri, and P. Jenner. 2017. "Non-motor features of Parkinson disease." *Nat Rev Neurosci* 18 (8):509. doi: 10.1038/nrn.2017.91.

Seamans, J. K., S. B. Floresco, and A. G. Phillips. 1998. "D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat." *J Neurosci* 18 (4):1613-21.

Su, C., N. Elfeki, P. Ballerini, I. D'Alimonte, C. Bau, R. Ciccarelli, F. Caciagli, J. Gabriele, and S. Jiang. 2009. "Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism." *J Neurosci Res* 87 (3):617-25. doi: 10.1002/jnr.21883.

Sutherland, C., J. Alterio, D. G. Campbell, B. Le Bourdellès, J. Mallet, J. Haavik, and P. Cohen. 1993. "Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2." *Eur J Biochem* 217 (2):715-22.

Thomaz, D. T., T. A. Dal-Cim, W. C. Martins, M. P. Cunha, D. Lanznaster, A. F. de Bem, and C. I. Tasca. 2016. "Guanosine prevents

nitroxidative stress and recovers mitochondrial membrane potential disruption in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation." *Purinergic Signal* 12 (4):707-718. doi: 10.1007/s11302-016-9534-3.

Vieira, C., T. C. De Lima, A.e P Carobrez, and C. Lino-de-Oliveira. 2008. "Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test." *Neurosci Lett* 445 (2):170-3. doi: 10.1016/j.neulet.2008.09.001.

Willner, P. 2005. "Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS." *Neuropsychobiology* 52 (2):90-110. doi: 0.1159/000087097.

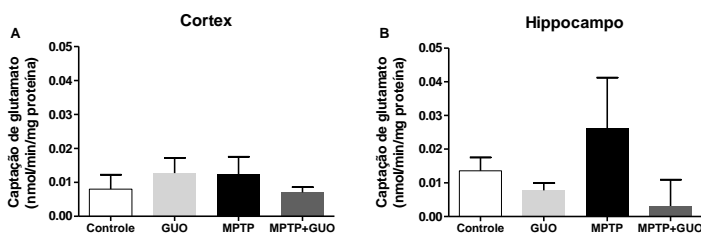
Xu, Z. Q., J. Y. Lew, K. Harada, K. Aman, M. Goldstein, A. Deutch, J. W. Haycock, and T. Hökfelt. 1998. "Immunohistochemical studies on phosphorylation of tyrosine hydroxylase in central catecholamine neurons using site- and phosphorylation state-specific antibodies." *Neuroscience* 82 (3):727-38.

2. Resultados adicionais

2.1 Captação de Glutamato

A captação de glutamato (GLU) foi realizada conforme previamente descrito 21 dias após a infusão de MPTP (Molz et al., 2005). As fatias de hipocampo e córtex cerebral foram pré-incubadas por 15 minutos a 35° C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, D-glicose 2 mM e Hepes 5 mM). A captação inicia-se com a adição de 100 µM de glutamato, permanecendo o mesmo por 7 minutos nas fatias. A incubação é terminada com a retirada do meio de captação, as fatias são lavadas duas vezes com 1 ml de HBSS gelado e 300 µl de uma solução de NaOH 0,1 N/SDS 0,01 % foi adicionado para solubilização das fatias. Após completa solubilização, os lisados foram utilizados para determinação do conteúdo intracelular de GLU através de cintilação líquida. A captação de GLU foi expressa como união dependente de sódio (transporte de maior afinidade) ou independente de sódio (dependente de cloreto, realizada através da substituição do NaCl por solução isomolar de Cloreto de colina). O conteúdo proteico foi avaliado pelo método de Lowry et al. (1951) usando albumina de soro bovino (Sigma) como padrão.

Figura 1 – Captação de glutamato em fatias corticais e hipocampais



Legenda: A captação de glutamato avaliada 21 dias após a infusão de MPTP (1 mg/narina i.n.) e o tratamento com GUO (7,5 mg/kg i.p.) (n = 5) em fatias corticais (A) e hipocampais (B). Two-way ANOVA revelou nenhuma diferença estatística entre os grupos.

Investigamos a captação de glutamato em fatias corticais e hipocampais 21 dias após a infusão intranasal de MPTP. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos, embora no hipocampo seja possível observar um aumento no grupo tratado com MPTP. O aumento da captação pode estar relacionado com o aumento da liberação de glutamato em situação de toxicidade. Alterações na homeostase glutamatérgica no córtex e hipocampus podem estar relacionadas com o prejuízo cognitivo. No presente trabalho não observamos alterações na versão do labirinto de Morris para avaliar a memória de trabalho em ratos 17 dias após a infusão i.n. de MPTP. A captação de glutamato não foi investigada no bulbo olfatório e no estriado dos animais devido a dificuldades experimentais, visto que o conteúdo das estruturas não forneceria fatias suficientes para todas as avaliações bioquímicas. A investigação da homeostase glutamatérgica nessas estruturas, bem como

em outros tempos após a administração de MPTP e tratamento com GUO estão listadas como perspectivas desse trabalho.

6 DISCUSSÃO

Em 2017, a famosa publicação “*Essay in the shaking palsy*” de James Parkinson completou 200 anos. O trabalho de Parkinson foi a primeira descrição oficial dos sintomas da DP. Desde então o conhecimento a respeito da doença evoluiu significativamente, desde o delineamento do fenótipo clínico da doença até a identificação das características neuropatológicas, de processos neuroquímicos e genéticos envolvidos do desenvolvimento da doença (Przedborski, 2017). Todos os achados desse período desafiaram os cientistas a entender como a DP inicia e progride, bem como qual o gatilho inicial para o desenvolvimento da doença. Atualmente é possível tratar os sintomas motores de forma eficaz, embora ainda existam problemas relacionados a perda da eficácia e efeitos colaterais. Adicionalmente, as estratégias terapêuticas atuais não impedem a progressão da doença.

Nas últimas décadas foram descritos vários sintomas não-motores e eventos moleculares iniciais, que precedem em anos o aparecimento dos sintomas motores. O estudo desses parâmetros pode esclarecer vários mecanismos relacionados a progressão da doença e identificar possíveis alternativas para antecipar o diagnóstico e o tratamento. O estagiamento da doença apresentado por Braak, conhecido como “hipótese de Braak” esclareceu vários parâmetros para o entendimento dos sintomas não-motores e como eles se apresentam no quadro geral da doença (Braak et al., 2004). Apesar disso, hoje os existentes tratamentos para a DP não são efetivos para os sintomas não-motores que ainda não possuem um tratamento específico. Nesse sentido,

é importante salientar que com o avanço da doença, os sintomas não-motores compõem a maior parte do quadro clínico da doença e diminuem significativamente a qualidade de vida dos pacientes.

O presente trabalho demonstrou que o potencial da GUO como agente antiparkinsoniano em parâmetros bioquímicos e comportamentais relacionados com os sintomas não-motores da DP. Demonstramos a efetividade do tratamento com GUO em proteger a função mitocondrial *in vitro* e *in vivo* em diferentes estruturas cerebrais contra a toxicidade induzida por toxinas utilizadas como modelo da DP. Com isso, reforçamos as evidências de que a manutenção das funções bioenergéticas da mitocôndria pode ser o alvo principal da GUO em situações de dano celular em protocolos experimentais de doenças neurológicas, conforme já sugerido por outros autores (Dal-Cim et al., 2013; Dobrachinski et al., 2017). Adicionalmente incluímos algumas informações importantes aos modelos utilizando as toxinas 6-OHDA e MPTP.

Efeitos *in vitro* da GUO

Inicialmente, utilizamos um protocolo *in vitro* para investigar os efeitos da GUO contra danos causados pela exposição de fatias corticais, estriatais e hipocâmpais de ratos adultos a 6-OHDA que estão apresentados no Capítulo I desta tese. Os modelos *in vitro* são amplamente utilizados para o entendimento de eventos moleculares relacionados as doenças neurológicas, bem como para a seleção de novos agentes com potencial neuroprotetor. O modelo *in vitro* com a 6-OHDA foi padronizado em nosso laboratório com o objetivo de montar um modelo rápido e simples para avaliação de agentes neuroprotetores efetivos em eventos iniciais da DP. Em estudo avaliando o efeito

neuroprotetor da estatina Atorvastatina, a incubação de 6-OHDA na concentração de 100 μM por 1 hora foi padronizada para o modelo (Massari et al., 2016). Neste trabalho, o primeiro passo foi identificar uma concentração de GUO efetiva contra a toxicidade induzida pela incubação com 6-OHDA. As concentrações de 30, 100 e 300 μM foram utilizadas no teste de viabilidade celular. Nesse sentido, a concentração de 100 μM de GUO foi selecionada para os outros experimentos, levando em consideração a atenuação do dano induzido pela 6-OHDA nas fatias estriatais e hipocâmpais. Também foi considerado trabalhos recentes onde foi demonstrada a efetividade da concentração de 100 μM em proteger fatias hipocâmpais expostas a privação de glicose e oxigênio (Thomaz et al., 2016; Dal-Cim et al., 2013; Dal-Cim et al., 2016).

A co-incubação com GUO protegeu as fatias estriatais e hipocâmpais do aumento de EROs induzido pela 6-OHDA. Além disso, observamos seletividade de toxicidade da 6-OHDA sobre as fatias de estriado em relação a parâmetros relacionados com a função da mitocôndria. Dessa forma, a GUO protegeu as fatias estriatais contra a toxicidade da 6-OHDA no aumento de EROs, na alteração do potencial de membrana mitocondrial e na depleção dos níveis de ATP intracelular.

O aumento da geração de EROs pode ser uma causa ou consequência do dano mitocondrial, visto que a 6-OHDA além de inibir o complexo I da cadeia transportadora de elétrons também gera espécies reativas oriundas da sua autoxidação e formação de quinonas altamente reativas (Kostrzewa, 1974). O aumento das EROs induzido por 6-OHDA pode ser relacionado tanto com a sua auto oxidação no citosol como com o dano ao metabolismo energético mitocondrial pela inibição do

complexo I na cadeia transportadora de elétrons. Nesse sentido, já foi demonstrado que a 6-OHDA pode gerar o radical hidroxil (OH^\bullet), que pode reagir com a deoxiguanosina, composto similar a GUO (Herraiz, 2015). Desse modo, os efeitos protetores da GUO poderiam envolver a atividade *scavenger* de radicais livres gerados pelo auto oxidação da 6-OHDA. Em contrapartida, foi demonstrado por um trabalho do nosso grupo que a GUO não apresenta atividade *scavenger* contra o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) em diversas concentrações (Thomaz et al., 2016). Adicionalmente, outros estudos já demonstraram a proteção da função mitocondrial como um alvo de ação para GUO sobre condições de dano como privação de glicose e oxigênio e trauma cranioencefálico (Thomaz et al., 2016; Dobrachinski et al., 2017). Também, já foi demonstrado que a GUO protege células de neuroblastoma de dano oxidativo gerado por dano a atividade mitocondrial (Dal-Cim et al., 2012). Dessa forma, nós sugerimos que a GUO protege a função mitocondrial através da capacidade de manutenção dos níveis de ATP intracelular nas fatias estriatais. Nas fatias corticais e hipocampais não foram observadas alterações nos níveis de ATP, em acordo com a ausência de alteração do potencial de membrana mitocondrial nessas regiões na presença de 6-OHDA.

Adicionalmente, nós avaliamos a permeabilidade da membrana celular através da incubação com iodeto de propídeo 1 h e 3 h após a incubação com 6-OHDA. Foi observado que após 1 h, nenhuma das regiões analisadas apresentou aumento da permeabilidade de membrana celular. Porém, 3 horas após a incubação com 6-OHDA, observamos o aumento da permeabilidade de membrana celular nas fatias estriatais

através do aumento da incorporação de iodeto de propídeo. Com isso, nós especulamos que esse mecanismo pode estar relacionado ao aumento da geração de EROs e a alteração do potencial de membrana mitocondrial observado em um momento anterior (1 h de 6-OHDA), que levaria ao dano lipídico na membrana e causaria o aumento da permeabilidade de membrana 3 h após a 6-OHDA. Nesse sentido, já foi demonstrado que a 6-OHDA induz peroxidação lipídica em fatias estriatais na concentração de 300 μM (Cunha et al., 2014) e em células PC12 a 100 μM (Magalingam et al., 2014).

Em resumo, *in vitro* podemos observar que a toxicidade causada pela 6-OHDA se torna seletiva a região do estriado quando avaliamos parâmetros relacionados com a função mitocondrial como a alteração do potencial de membrana mitocondrial e a depleção dos níveis de ATP intracelular. Possivelmente esse efeito está relacionado com a captação da 6-OHDA pelas células dopaminérgicas, visto que a região do estriado com maior expressão de transportadores dopaminérgicos (Block et al., 2015) acaba captando maiores concentrações da toxina e apresentando maior dano.

Efeitos *in vivo* da GUO

Nosso grupo demonstrou recentemente a eficácia da GUO em três protocolos utilizando reserpina, 6-OHDA e L-DOPA como modelos de distúrbio de movimento em roedores (Massari et al., 2017). Nesse trabalho, foi observado que o tratamento *in vivo* por via oral com GUO na dose de 7,5 mg/kg apresentou efeito protetor contra o desenvolvimento de catalepsia e movimentos de mascar no vazio (*tremulous jaw movements*) em camundongos tratados com reserpina. Adicionalmente, a

GUO potencializou o efeito da L-DOPA nas rotações contralaterais induzidas por 6-OHDA e demonstrou efeito antidiscinético em discinesias induzidas por L-DOPA. Embora o papel da GUO como um neuroprotetor em modelos de parkinsonismo em roedores já tenha sido demonstrado por esse e por outros trabalhos *in vivo* (Su et al., 2009; Chen et al., 2015), é importante salientar que nenhum estudo avaliou o efeito da GUO em modelo baseado em toxinas que mimetize os sintomas não-motores da DP. Nesse sentido, no presente trabalho avaliamos os efeitos do tratamento crônico com GUO 7,5 mg/kg (mesma dose utilizada no protocolo com reserpina) nas alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela administração de 6-OHDA (10 µg/hemisfério) no estriado dorsolateral (EDL) de ratos.

O EDL é uma das subdivisões do estriado de roedores que possui homologia com o putâmen (subdivisão em primatas), uma das regiões mais afetadas na DP. Além disso, o EDL recebe aferências do córtex responsáveis por modular funções somatossensoriais, sendo essas projeções consideradas alças não motoras (Devan, 2011). Assim, a administração de toxinas no estriado se caracteriza como um modelo para o estudo das funções motoras, cognitivas e emocionais relacionadas à DP, seja por ação direta ou por interferência com outras vias neuronais. Recentemente a infusão de 6-OHDA no EDL de ratos foi padronizado como um protocolo para estudar a anedonia, o prejuízo cognitivo e comportamento tipo-depressivo relacionados à DP (Matheus et al., 2016; Matheus et al., 2016). Como apresentado na introdução da presente tese, a depressão e os sintomas emocionais constituem a principal manifestação clínica não motora em pacientes com a DP e tem sido relacionada com a piora do quadro clínico.

Nós observamos a diminuição do tempo de limpeza no teste do “*splash*” oito dias após a infusão, adicionalmente investigamos o efeito anedônico no teste de preferência por sacarose (sete dias após 6-OHDA), onde não foi observado preferência por sacarose do grupo SHAM quando comparamos com o consumo de água na fase de teste. Porém, quando comparamos o consumo de sacarose entre os grupos na fase de teste observamos que o grupo 6-OHDA consome significativamente menos sacarose em relação ao grupo SHAM, enquanto que o tratamento com GUO aumentou o consumo de sacarose comparado com o grupo 6-OHDA. A infusão de 6-OHDA 10 µg/hemisfério no EDL induziu dano a memória curto prazo avaliado no teste de reconhecimento de objeto (16 dias após 6-OHDA) e labirinto em Y modificado (20 dias após 6-OHDA). Nós também avaliamos esses parâmetros cognitivos, porém não observamos nenhuma diferença entre os grupos. A capacidade de discriminação olfatória também foi avaliada, neste teste não foram observadas diferenças entre os grupos tratados, concluindo que a 6-OHDA não induz prejuízo olfatório 3 dias após a sua infusão.

O efeito tipo-antidepressivo da GUO foi observado no teste do nado forçado 21 dias após a infusão de 6-OHDA. O potencial tipo-antidepressivo da GUO foi demonstrado previamente em camundongos em diferentes modelos e tempos de tratamento, bem como alguns mecanismos possivelmente responsáveis por esse efeito. Bettio e colaboradores demonstraram o efeito tipo-antidepressivo do tratamento agudo com GUO via oral em dois modelos animais preditivos: no teste do nado forçado (GUO 0,5–5 mg/kg) e no teste de suspensão pela cauda (GUO 0,05–0,5 mg/kg). Nesse mesmo estudo foi demonstrado que esses efeitos são dependentes da ativação da via de sinalização da PI3K/mTOR

(Bettio et al., 2012). O pré tratamento com GUO (5 mg/kg) protegeu o hipocampo de desequilíbrio redox induzido por modelos de estresse, além de aumentar a capacidade antioxidante através da modulação de enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT (Bettio et al., 2014). Finalmente, no tratamento crônico com GUO, o efeito tipo-antidepressivo foi relacionado ao aumento da proliferação celular e do número de neuroblastos imaturos na zona subgranular (ZSG) no giro denteado do hipocampo (Bettio et al., 2016), efeito esse relacionado aos efeitos tróficos da GUO.

No presente trabalho nós demonstramos que o efeito tipo-antidepressivo da GUO pode estar relacionado com a função mitocondrial no hipocampo. Visto que o tratamento com GUO (7,5 mg/kg i.p.) protegeu a alteração do potencial de membrana mitocondrial induzido pela 6-OHDA em fatias de hipocampo. Assim, nós especulamos que a 6-OHDA desencadeie um aumento inicial na geração de espécies reativas que leva ao dano mitocondrial. É digno de nota que a geração de EROs foi apontada como evento inicial em outros modelos (Marques et al., 2018; Franco et al., 2007). Ainda, uma das primeiras alterações bioquímicas relatadas na DP é a redução dos níveis de glutathiona (GSH), molécula com atividade antioxidante no SNC, na SNpc resultando em prejuízo a função mitocondrial (Chinta, 2008; Martin, 2009). Importante para confirmar esses achados é analisar a geração de EROs e o potencial de membrana mitocondrial em momentos anteriores no modelo da 6-OHDA *in vivo*, bem como sua possível relação com o comportamento anedônico observado no teste do “*splash*”. Essa análise está listada como uma das nossas perspectivas para trabalhos posteriores.

A infusão intranasal de MPTP em roedores foi estabelecido a alguns anos como um protocolo experimental de avaliação temporal de alterações comportamentais relacionadas aos sintomas não-motores da DP (Prediger et al., 2006; Sampaio, 2017). A toxicidade do MPTP via intranasal está relacionado com a via nigro-olfatória dopaminérgica, população de neurônios que estaria diretamente envolvida no papel de neurotóxicos na DP, funcionando como uma via de acesso direto para o SNC. Sendo a hiposmia um dos primeiros sintomas não-motores relatadas na linha de tempo da progressão da doença e que ainda não possui um tratamento específico, nós avaliamos o potencial efeito do protetor do tratamento com GUO no modelo do MPTP. O Capítulo 3 apresentamos o protocolo com infusão intranasal de MPTP, onde demonstramos o efeito protetor da GUO em alterações comportamentais e bioquímicas relacionados ao prejuízo olfatório. Adicionalmente analisamos a expressão da enzima TH em diferentes regiões do cérebro de ratos envolvidas com alterações não-motores relacionados com a DP.

Trabalhos anteriores demonstraram que o MPTP induz prejuízo olfatório em ratos (Prediger et al., 2009; Castro et al., 2012) e camundongos (Matheus et al., 2012) na primeira semana após a administração intranasal. Nós demonstramos que o tratamento com GUO (7,5 mg/kg) protege o desenvolvimento de prejuízo olfatório 3 dias após a infusão de MPTP. O tratamento com GUO foi iniciado 6 horas após a infusão do MPTP, com o objetivo de atuar sobre um dano previamente estabelecido, visto que as primeiras alterações bioquímicas foram detectadas 6 h após a infusão intranasal de MPTP, e estão relacionadas principalmente com o dano oxidativo (Franco et al., 2007; Marques et al., 2018).

O teste de reconhecimento social é um modelo de avaliação de memória de trabalho de curto prazo relacionado com a habilidade olfatória dos animais (Sawyer, 1984). Corroborando com trabalhos anteriores, nós observamos que o MPTP induziu prejuízo à memória de reconhecimento social 7 dias após a infusão intranasal (Moreira et al., 2010; Castro et al., 2013). No presente trabalho, observamos que o tratamento com GUO preveniu o desenvolvimento do prejuízo de memória de reconhecimento social. Várias estruturas cerebrais, bem como diferentes mecanismos e neurotransmissores podem estar envolvidos na modulação da memória de reconhecimento social (Baulac, 1986; Seamans, 1998; Griffin e Taylor, 1995; Cavalcante et al., 2017). O envolvimento da interação dos receptores de adenosina e dopamina foi demonstrado na modulação da memória de reconhecimento social por Prediger e colaboradores (2005). Prediger (2005) demonstrou que o bloqueio dos receptores A_{2A} para adenosina e a ativação dos receptores de dopamina do tipo D_2 revertem os prejuízo olfatório induzido por reserpina em ratos. Nesse sentido, alguns trabalhos do nosso grupo descreveram evidências de que os receptores de adenosina seriam alvos moleculares da GUO na proteção de fatias de hipocampo e em células da linhagem SH-SY5Y contra privação de glicose e oxigênio (Dal-Cim et al., 2013; Dal-Cim et al., 2012). Adicionalmente, Dal-Cim (2013) demonstrou o envolvimento dos receptores A_1R e $A_{2A}R$ no efeito protetor da GUO em fatias hipocâmpais submetidas a privação de glicose e oxigênio. Dessa forma, nós especulamos que os efeitos da GUO nesse comportamento específico podem estar relacionados a modulação da interação dos receptores de dopamina e adenosina, porém outros estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Seguindo a linha temporal de alterações causadas pela infusão de MPTP, com o objetivo de avaliar os parâmetros emocionais relacionados a sintomas não-motores da DP, avaliamos comportamento de autocuidado e autolimpeza no teste do “*splash*” (10 dias após o MPTP) e o comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado (12 dias após o MPTP). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos tratados. Em contraste, estudos prévios demonstraram comportamento tipo-depressivo através do aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado 14 (Castro et al., 2013) e 16 dias (Moreira et al., 2010) após o MPTP i.n. Também, (Prediger et al., 2006). Prediger (2006) demonstrou prejuízo na memória de trabalho 7 dias após o MPTP, no presente trabalho, a memória de trabalho foi avaliada 14-17 dias após o MPTP e não observamos nenhuma alteração nesse período. Também, Prediger (2006) demonstrou prejuízo na memória de trabalho 7 dias após MPTP, no presente trabalho, a memória de trabalho foi avaliada 14-17 dias após o MPTP e não observamos nenhuma alteração nesse período. Dessa forma, sugerimos que uma dissociação temporal na manifestação desses comportamentos, bem como a reversão dos mesmos com o passar do tempo pode ter causado a não reprodução desses resultados. Outro fator importante a ser discutido é a dose utilizada, no estudo que padronizou o modelo uma dose de 0,1 mg/narina foi utilizada (Prediger et al., 2006), enquanto que os estudos posteriores passaram a utilizar uma dose de 1 mg/narina, como no presente trabalho (Castro et al., 2013; Moreira et al., 2010). Nesses mesmos estudos foi demonstrado que o MPTP causa prejuízo a função motora no teste da caixa de atividade 32 dias após infusão. Finalizando a avaliação comportamental, a coordenação motora dos animais foi analisada do teste do “*Rotarod*” 20 dias após a infusão de

MPTP. Como esperado, não observamos nenhuma alteração nos grupos tratados, confirmando que este protocolo é capaz de reproduzir os sintomas não-motores das fases iniciais da DP sem causar alterações motoras nesse período.

A análise bioquímica das fatias de bulbo olfatório demonstrou alteração do potencial de membrana mitocondrial e o aumento da permeabilidade de membrana celular 21 dias após a infusão de MPTP, sendo que em ambos os parâmetros o tratamento com GUO apresentou efeito protetor. Como comentado anteriormente, a manutenção da função mitocondrial parece ser um importante alvo para a ação da GUO. O tratamento com GUO não preveniu o aumento da permeabilidade de membrana induzida pelo MPTP nas fatias de hipocampo. De fato, anteriormente foi demonstrado que a administração de intranasal de MPTP induz alterações na homeostase redox, aumentando significativamente a peroxidação lipídica no bulbo olfatório e no córtex pré-frontal, além de apresentar uma tendência ao aumento no estriado e hipocampo (Franco et al., 2007). Assim, levando em consideração a distribuição da toxina pela via intranasal, nós sugerimos que 21 dias após a infusão, o desequilíbrio redox atinge o hipocampo e leva a peroxidação lipídica na membrana celular aumentando a incorporação de idodeto de propídeo. Nessa avaliação, não observamos efeito protetor da GUO, também não foi observada dano mitocondrial nessa região, o que pode estar relacionado com a ausência de proteção da GUO se considerarmos que a mitocôndria como alvo para seu efeito neuroprotetor.

Outro alvo amplamente demonstrado com alvo para o mecanismo de ação da GUO é a modulação da excitotoxicidade

glutamatérgica. As alterações na homeostase do glutamato podem causar a ativação de cascatas neurotóxicas, e as mudanças na captação de glutamato podem levar ao excesso de glutamato na fenda sináptica e consequentemente a ocorrência de excitotoxicidade. Na DP a hiperativação do núcleo subtalâmico causada pelas alterações da circuitaria motora é apontada como causa da excitotoxicidade glutamatérgica na SNpc (Blandini et al., 2000). Por outro lado, foi demonstrado que o MPTP intranasal induz a diminuição da captação de glutamato no hipocampo de camundongos fêmeas 21 dias após a infusão (Matheus et al., 2012). Nesse sentido, investigamos a captação de glutamato nas fatias de córtex e hipocampo 21 dias após a infusão de MPTP. Nossos resultados não apresentaram nenhuma diferença estatística entre os grupos, demonstrando que a infusão de MPTP não foi capaz de induzir alterações na captação de glutamato nessas regiões no tempo avaliado.

Numerosos estudos em roedores têm demonstrado que o MPTP, administrado i.p. , via subcutânea, intracerebroventricular ou intranasal pode reduzir significativamente o conteúdo de TH na SNpc e no estriado (Alcaraz-Zubeldia et al., 2009; Ambrosio et al., 1987; Hadjiconstantinou et al., 1994; Neff et al., 2006; Khaldy et al., 2003; Mayer et al., 1986). Porém poucos estudos demonstraram a avaliação da regulação da enzima através da fosforilação das serinas 19, 31, 40 nas estruturas cerebrais não-motores. Além disso, o estudo da regulação da TH após a administração de MPTP limita-se a via nigroestriatal na maioria dos estudos. (Boukhar et al., 2016) demonstrou redução da fosforilação na Ser31 (28,2 %) e na Ser40 (43,7 %) acompanhados de depleção dos níveis de dopamina (35,8 %) 1h após a administração de MPTP (administração única, 15 mg/kg

i.p.) no estriado de camundongos. Enquanto isso, (Liu et al., 2008) demonstrou aumento da fosforilação na Ser31 e nenhuma alteração na Ser40, 7 dias após de MPTP (4 administrações, 20 mg/kg i.p.) na SNpc. Em contraste, Naskar e colaboradores (2015) demonstraram aumento da fosforilação na Ser40, 7 dias após a administração de MPTP (única administração de 30 mg/kg i.p.) no estriado de camundongos.

As vias dopaminérgicas projetam-se para regiões como o bulbo olfatório, córtex e estriado, essas regiões apresentam acúmulo de α -sinucleína na progressão da doença e estão relacionadas com sintomas não-motores. No presente trabalho, nós demonstramos que 21 dias após a administração de MPTP e tratamento com GUO a expressão da enzima TH bem como a sua regulação nos sítios Ser19, Ser31 e Ser40 não apresentaram alteração no bulbo olfatório, no córtex e no estriado. A infusão intranasal de MPTP reduz a expressão de TH no bulbo olfatório, efeito que estaria relacionado com o prejuízo a capacidade olfatória. Tanto o dano olfatório como a redução da expressão de TH retornam aos níveis basais 21 dias após a administração (Prediger et al., 2006).

No hipocampo, não foi detectada a expressão da TH. A fosforilação na Ser19 foi detectada em todas as estruturas que apresentaram expressão da tTH, enquanto que a pSer40 foi detectada somente no estriado, e a pSer31 não foi detectada no córtex. É possível que este diferente padrão nas estruturas cerebrais, esteja relacionado com a modulação diferencial da TH em cada região. No entanto, no período em que fizemos a avaliação, 21 dias pós-infusão de MPTP, não foi possível acompanhar as modificações eventualmente ocorridas nessas regiões. Uma análise temporal das pTH nas diferentes regiões poderia ser útil para

demonstrar estas variações regionais. É importante notar que essa é a primeira vez que a regulação da TH através dos sítios fosforilados é investigada nessas regiões após a infusão intranasal de MPTP.

Assim, finalizamos a tese enfatizando o potencial do nucleosídeo guanosina como agente antiparkinsoniano em modelos experimentais que mimetizam os eventos celulares iniciais e os sintomas não-motores da DP.

7 CONCLUSÕES

- A co-incubação de GUO protege fatias estriatais do aumento da geração de ROS, da alteração do potencial de membrana mitocondrial e da depleção dos níveis intracelulares de ATP induzidas por 6-OHDA *in vitro*;
- *In vivo*, a GUO exerce efeito tipo-antidepressivo no aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado após a infusão intraestriatal de 6-OHDA em ratos;
- A GUO protege a alteração do potencial de membrana mitocondrial no hipocampo após a infusão intraestriatal de 6-OHDA;
- A GUO protege o desenvolvimento de prejuízo olfatório e de memória de reconhecimento social em animais que receberam MPTP intranasal;
- A GUO protege o bulbo olfatório da alteração do potencial de membrana mitocondrial e do aumento da permeabilidade da membrana celular 21 dias após a infusão intranasal de MPTP;
- A expressão e a regulação através da fosforilação da TH não são afetadas 21 dias após a infusão de MPTP.

8 PERSPECTIVAS

- Caracterizar as alterações bioquímicas relacionadas com alterações comportamentais não-motoras observados após a administração intranasal de MPTP e intraestriatal de 6-OHDA;
- Investigar possíveis alterações na regulação da enzima TH em diferentes tempos após a administração intranasal de MPTP e intraestriatal de 6-OHDA;
- Estudar a importância e o papel da função mitocondrial no efeito neuroprotetor da GUO em modelos da DP;
- Caracterizar os mecanismos relacionados ao efeito tipo-antidepressivo da GUO em modelos da DP;
- Investigar o papel da homeostase glutamatérgica na progressão temporal das alterações causadas pela administração de 6-OHDA e MPTP.
- Avaliar a regulação da enzima TH em diferentes tempos de incubação com 6-OHDA *in vitro*.

REFERÊNCIAS

AARSLAND, D., PÅHLHAGEN, S., BALLARD, C.G., EHRT, U., SVENNINGSSON, P. 2011. Depression in Parkinson disease--epidemiology, mechanisms and management. **Nature Reviews Neurology** 8 (1):35-47.

ABBACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G., VERKHRATSKY, A., ZIMMERMANN, H. 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neuroscience** 32 (1):19-29.

ABE, H., ISHIDA, Y., IWASAKI, T. 2004. Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. **Neuroscience Letters** 356 (3):191-4.

ALCARAZ-ZUBELDIA, M., BOLL-WOEHRLEN, M.C., MONTES-LÓPEZ, S., PÉREZ-SEVERIANO, F., MARTÍNEZ-LAZCANO, J. C., DÍAZ-RUIZ, A., RÍOS, C. 2009. Copper sulfate prevents tyrosine hydroxylase reduced activity and motor deficits in a Parkinson's disease model in mice. **Revista Investigación Clínica** 61 (5):405-11.

ALVAREZ-ERVITI, L., RODRIGUEZ-OROZ, M.C., COOPER, J.M., CABALLERO, C., FERRER, I., OBESO J.A., SCHAPIRA, A.H. 2010. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. **Archives of Neurology** 67 (12):1464-72.

AMBROSI, G., CERRI, S., BLANDINI, F. 2014. A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission** (Vienna) 121 (8):849-59.

AMBROSIO, S., GERLI, P., PEREGO, C., ALGERI, S. 1987. Different toxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the nigrostriatal and mesolimbic pathways. **European Journal of Pharmacology** 133 (2):239-41.

ANGOT, E., STEINER, J.A., HANSEN, C., LI, J.Y., BRUNDIN, P. 2010. Are synucleinopathies prion-like disorders? **Lancet Neurology** 9 (11):1128-38.

- BAULAC, M., VERNEY, C., BERGER, B. 1986. Dopaminergic innervation of the parahippocampal and hippocampal regions in the rat. **Review Neurology (Paris)** 142 (12):895-905.
- BAUSO, D.J., TARTARI, J.P., STEFANI, C.V., ROJAS, J.I., GIUNTA, D.H., CRISTIANO, E. 2012. Incidence and prevalence of Parkinson's disease in Buenos Aires City, Argentina. **European Journal of Neurology** 19 (8):1108-13.
- BELLAVER, B., SOUZA, D.G., BOBERMIN, L.D., GONÇALVES, C.A., SOUZA, D.O., QUINCOZES-SANTOS, A. 2015. Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. **Purinergic Signalling** 11 (4):571-80.
- BELVISI, D., CONTE, A., BOLOGNA, M., BLOISE, M.C., SUPPA, A., FORMICA, A., COSTANZO, M., CARDONE, P., FABBRINI, G., BERARDELLI, A. 2017. Re-emergent tremor in Parkinson's disease. **Parkinsonism Related Disorder** 36:41-46.
- BENABID, A.L., POLLAK, P., GROSS, C., HOFFMANN, D., BENAZZOZ, A., GAO, D.M., LAURENT, A., GENTIL, M., PERRET, J. 1994. Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. **Stereotactic Functional Neurosurgery** 62 (1-4):76-84.
- BENAMER, H.T., DE SILVA, R., SIDDIQUI, K.A., GROSSET, D.G. 2008. Parkinson's disease in Arabs: a systematic review. **Movement Disorders** 23 (9):1205-10.
- BENAZZI, F. 2006. Various forms of depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience** 8 (2):151-61.
- BERG, D., POSTUMA, R.B., ADLER, C.H., BLOEM, B.R., CHAN, P., DUBOIS, B., GASSER, T., GOETZ C.G., HALLIDAY, G., JOSEPH, L., LANG, A.E., LIEPELT-SCARFONE, I., LITVAN, I., MAREK, K., OBESO, J., OERTEL, W., OLANOW, C.W., POEWE, W., STERN, M., DEUSCHL, G. 2015. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. **Movement Disorders** 30 (12):1600-11.

BETTIO, L.E., CUNHA, M.P., BUDNI, J., PAZINI, F.L., OLIVEIRA, A., COLLA, R., RODRIGUES, A.L. 2012. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behavioral Brain Research** 234 (2):137-48.

BETTIO, L.E., FREITAS, A.E., NEIS, V.B., SANTOS, D.B., RIBEIRO, C.M., ROSA, P.B., FARINA, M., RODRIGUES, A.L. 2014. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 127:7-14.

BETTIO, L.E., GIL-MOHAPEL, J., RODRIGUES, A.L. 2016. Guanosine and its role in neuropathologies. **Purinergic Signalling** 12 (3):411-26.

BETTIO, L.E., NEIS, V.B., PAZINI, F.L., BROCARDO, P.S., PATTEN, A.R., GIL-MOHAPEL, J., CHRISTIE B.R., RODRIGUES, A.L. 2016. The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation. **European Journal of Neuroscience** 43 (8):1006-15.

BEZARD, E., GROSS, C.E., FOURNIER, M.C., DOVERO, S., BLOCH, B., JABER, M. 1999. Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. **Experimental Neurology** 155 (2):268-73.

BLANDINI, F., ARMENTERO, M.T., MARTIGNONI, E. 2008. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism and Related Disorders** 14 Suppl 2:S124-9.

BLANDINI, F., LEVANDIS, G., BAZZINI, E., NAPPI, G., ARMENTERO, M.T. 2007. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. **European Journal of Neuroscience** 25 (2):397-405.

BLANDINI, F., NAPPI, G., TASSORELLI, C., MARTIGNONI, E. 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology** 62 (1):63-88.

BLOCK, E.R., NUTTLE, J., BALCITA-PEDICINO, J.J., CALTAGARONE, J., WATKINS, S.C., SESACK, S.R., SORKIN, A. 2015. Brain Region-Specific Trafficking of the Dopamine Transporter. **The Journal of Neuroscience** 35 (37):12845-58.

BOBROVSKAYA, L., DUNKLEY, P.R., DICKSON, P.W. 2004. Phosphorylation of Ser19 increases both Ser40 phosphorylation and enzyme activity of tyrosine hydroxylase in intact cells. **Journal of Neurochemistry** 90 (4):857-64.

BOLAM, J.P., PISSADAKI, E.K. 2012. Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. **Movement Disorders** 27 (12):1478-83.

BOSE, A., BEAL, M.F. 2016. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry** 139 Suppl 1:216-231.

BOUKHZAR, L., HAMIEH, A., CARTIER, D., TANGUY, Y., ALSHARIF, I., CASTEX, M., ARABO, A., EL HAJJI, S., BONNET, J.J., ERRAMI, M.A., FALLUEL-MOREL, CHAGRAOUI, A., LIHRMANN, I., ANOUAR, Y. 2016. Selenoprotein T Exerts an Essential Oxidoreductase Activity That Protects Dopaminergic Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease. **Antioxid and Redox Signalling** 24 (11):557-74.

BOVÉ, J., PERIER, C. 2012. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience** 211:51-76.

BRAAK, H., GHEBREMEDHIN, E., RÜB, U., BRATZKE, H., DEL TREDICI, K. 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research** 318 (1):121-34.

BRAAK, H., RÜB, U., GAI, W.P., DEL TREDICI, K. 2003. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. **Journal of Neural Transmission** (Vienna) 110 (5):517-36.

BRUNDIN, P., MELKI, R., KOPITO, R. 2010. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 11 (4):301-7.

BURNS, R.S., LEWITT, P.A., EBERT, M.H., PAKKENBERG, H., KOPIN, I.J. 1985. The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency. Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **The New England Journal of Medicine** 312 (22):1418-21.

BURNSTOCK, G. 1972. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews** 24 (3):509-81.

BURNSTOCK, G. 2007. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Science** 64 (12):1471-83.

BURNSTOCK, G. 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews Drug Discovery** 7 (7):575-90.

CARLSSON, A. 1959. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. **Pharmacological Reviews** 11 (2, Part 2):490-3.

CARLSSON, A., LINDQVIST, M., MAGNUSSON, T. 1957. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature** 180 (4596):1200.

CASTRO, A.A., GHISONI, K., LATINI, A., QUEVEDO, J., TASCA, C.I., PREDIGER, R.D. 2012. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research** 229 (1):208-15.

CASTRO, A.A., WIEMES, B.P., MATHEUS, F.C., LAPA, F.R., VIOLA, G.G., SANTOS, A.R., TASCA, C.I., PREDIGER, R.D. 2013. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. **Brain Research** 1513:103-16.

CAVALCANTE, L.E.S., ZINN, C.G., SCHMIDT, S.D., SAENGER, B.F., FERREIRA, F.F., FURINI, C., MYSKIW, J.C., IZQUIERDO, I. 2017. Modulation of the storage of social recognition memory by neurotransmitter systems in the insular cortex. **Behavioral Brain Research** 334:129-134.

CHAN, P., DELANNEY, L.E., IRWIN, I., LANGSTON, J.W., DI MONTE, D. 1991. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. **Journal of Neurochemistry** 57 (1):348-51.

CHAUDHURI, K.R., HEALY, D.G., SCHAPIRA, A.H. 2006. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **The Lancet Neurology** 5 (3):235-45.

CHAUDHURI, K.R., ODIN, P. 2010. The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Progress in Brain Research** 184:325-41.

CHAUDHURI, K.R., SCHAPIRA, A.H. 2009. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology** 8 (5):464-74.

CHEN, X., XIE, C., SUN, L., DING, J., CAI, H. 2015. Longitudinal Metabolomics Profiling of Parkinson's Disease-Related α -Synuclein A53T Transgenic Mice. **PLoS One** 10 (8):e0136612.

CHIBA, K., TREVOR, A., CASTAGNOLI, N. 1984. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 120 (2):574-8.

CHINTA, S.J., ANDERSEN, J.K. 2008. Redox imbalance in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta** 1780 (11):1362-7.

CHOI, D.W. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **Journal of Neuroscience** 7 (2):369-79.

CHRISTINA, M., VAN DER FELTZ-CORNELIS, M.D. et al. 2010. Presence of Comorbid Somatic Disorders Among Patients Referred to

Mental Health Care in the Netherlands Psychiatric Services. **American Psychiatric Association.**

CICCARELLI, R., BALLERINI, P., SABATINO, G., RATHBONE, M.P., D'ONOFRIO, M., CACIAGLI, F., DI IORIO, P. 2001. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **International Journal of Developmental Neuroscience** 19 (4):395-414.

CICCARELLI, R., DI IORIO P., GIULIANI, P., D'ALIMONTE, I., BALLERINI, P., CACIAGLI, F., RATHBONE, D.M. 1999. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. **Glia** 25 (1):93-8.

COHEN, G., HEIKKILA, R.E. 1974. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. **Journal of Biological Chemistry** 249 (8):2447-52.

CUNHA, M.P., MARTÍN-DE-SAAVEDRA, M.D., ROMERO, A., EGEA, J., LUDKA F.K., TASCA, C.I. FARINA, M. RODRIGUES, A.L., LÓPEZ, M.G. 2014. Both creatine and its product phosphocreatine reduce oxidative stress and afford neuroprotection in an in vitro Parkinson's model. **ASN Neuro** 6 (6).

TAYLOR, CW,. 1990. The role of G proteins in transmembrane signalling. **The Biochemical journal.** Vol. 272.

DAL-CIM, T., LUDKA, F.K., MARTINS, W.C., REGINATO, C., PARADA, E., EGEA, J., LÓPEZ, M.G., TASCA, C.I. 2013. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **Journal of Neurochemistry** 126 (4):437-50.

DAL-CIM, T., MARTINS, W.C., SANTOS, A.R., TASCA, C.I. 2011. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neuroscience** 183:212-20.

DAL-CIM, T., MARTINS, W.C., THOMAZ, D.T., COELHO, V., POLUCENO, G.G., LANZMASTER, D., VANDRESEN-FILHO, S., TASCA, C.I. 2016. Neuroprotection Promoted by Guanosine Depends on Glutamine Synthetase and Glutamate Transporters Activity in Hippocampal Slices Subjected to Oxygen/Glucose Deprivation. **Neurotoxicity Research** 29 (4):460-8.

DAL-CIM, T., MOLZ, S., EGEA, J., PARADA, E., ROMERO, A., BUDNI, J., MARTÍN DE SAAVEDRA, M.D., DEL BARRIO L., TASCA, C. I., LÓPEZ, M.G. 2012. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. **Neurochemistry International** 61 (3):397-404.

DALLA CORTE, C.L., BASTOS, L.L., DOBRACHINSKI, F., ROCHA, J.B., SOARES, F.A. 2012. The combination of organoselenium compounds and guanosine prevents glutamate-induced oxidative stress in different regions of rat brains. **Brain Research** 1430:101-11.

DANTZER, R., BLUTHE, R.M., KOOB, G.F., MOAL, L.E., 1987. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology** (Berl) 91 (3):363-8.

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

DAVEY, G.P., TIPTON, K.F., MURPHY, M.P. 1992. Uptake and accumulation of 1-methyl-4-phenylpyridinium by rat liver mitochondria measured using an ion-selective electrode. **Biochemical Journal** 288 (Pt 2):439-43.

DE LAU, L.M., BRETELER, M. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology** 5 (6):525-35.

DEHAY, B., BOVÉ, J., RODRÍGUEZ-MUELA, N., PERIER, C., RECASENS, A., BOYA, P., VILA, M. 2010. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. **The Journal of Neuroscience** 30 (37):12535-44.

DELLU, F., FAUCHEY, V., LE MOAL, M., SIMON, H. 1997. Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes. **Neurobiology of Learning and Memory** 67 (2):112-20.

DEUMENS, R., BLOKLAND, A., PRICKAERTS, J. 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology** 175 (2):303-17.

DEVAN, B.D., HONG, N.S., MCDONALD, R.J. 2011. Parallel associative processing in the dorsal striatum: segregation of stimulus-response and cognitive control subregions. **Neurobiology of Learning and Memory** 96 (2):95-120.

DEXTER, D.T., JENNER, P. 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radiccal Biology and Medicine** 62:132-44.

DI LIBERTO, V., GAROZZO, A., GRILLO, R., MUDO, G.M., CACIAGLI, F., CONDORELLI, N., BELLUARDO, DF. 2012. Identification of gpr23/lpa4 as a candidate g protein-coupled receptor for guanosine. **Journal of Biological Chemistry**. 11;278(28):25600-6.

DICKSON, P.W., BRIGGS, G.D. 2013. Tyrosine hydroxylase: regulation by feedback inhibition and phosphorylation. **Advances in Pharmacology** 68:13-21.

DOBRACHINSKI, F., DA ROSA GERBATIN, R., SARTORI, G., FERREIRA MARQUES, N., ZEMOLIN, A.P., ALMEIDA SILVA, L.F., FRANCO, J.L., FREIRE ROYES, L.F., RECHIA FIGHERA, M., ANTUNES SOARES, F.A. 2017. Regulation of Mitochondrial Function and Glutamatergic System Are the Target of Guanosine Effect in Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma** 34 (7):1318-1328.

DOMELLÖF, M.E., LUNDIN, K.F., EDSTRÖM, M., FORSGREN, L. 2017. Olfactory dysfunction and dementia in newly diagnosed patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism Related Disorders** 38:41-47.

DORSEY, E.R., CONSTANTINESCU R., THOMPSON J.P., BIGLAN K.M., HOLLOWAY R.G., KIEBURTZ, K., MARSHALL F., RAVINA

J., SCHIFITTO, B. M., SIDEROWF, G.A., TANNER, C.M. 2007. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology** 68 (5):384-6.

DOTY, R.L. 2008. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? **Annals of Neurology** 63 (1):7-15.

DOTY, R.L. 2012. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology** 8 (6):329-39.

DREVETS, W.C. 2001. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Current Opinion in Neurobiology** 11 (2):240-9.

DRIVER, J.A., LOGROSCINO, G., GAZIANO, J.M., KURTH, T.2009. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. **Neurology** 72 (5):432-8.

DRUI, G., S. CARNICELLA, CARCENAC, C., FAVIER, M., BERTRAND, A., BOULET, S., SAVASTA, M. 2014. Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. **Molecular Psychiatry** 19 (3):358-67.

DRURY, A.N., SZENT-GYÖRGYI, A. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **The Journal of Physiology** 68 (3):213-37.

DUMAN, R.S. 2014. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. **Depression and Anxiety** 31 (4):291-6.

DUNKLEY, P.R., BOBROVSKAYA, L., GRAHAM, M.E., VON NAGY-FELSOBUKI, E.I., DICKSON, P.W. 2004. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. **Journal of Neurochemistry** 91 (5):1025-43.

DUNKLEY, P.R., CÔTÉ, A., HARRISON, S.M., HERD, L., HALL, A., POWIS, D.A. 1996. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. Clonidine stimulates basal but inhibits nicotinic

receptor evoked phosphorylation. **Biochemical Pharmacology** 51 (3):239-45.

DUNKLEY, P.R., DICKSON, P.W. 2019. Tyrosine Hydroxylase Phosphorylation In Vivo. **Journal of Neurochemistry**.

DUTY, S., JENNER, P. 2011. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology** 164 (4):1357-91.

EDELMAN, A.M., RAESE, J.D., LAZAR, M.A., BARCHAS, J.D. 1978. In vitro phosphorylation of a purified preparation of bovine corpus striatal tyrosine hydroxylase. **Communications Psychopharmacology** 2 (6):461-5.

EGEA, J., ROSA, A.O., SOBRADO, M., GANDÍA, L., LÓPEZ, M.G., GARCÍA, A.G. 2007. Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice. **Neuroscience** 145 (3):866-72.

EGGERT, K.M., REESE, J.P., OERTEL, W.H., DODEL, R. 2008. Cost effectiveness of pharmacotherapies in early Parkinson's disease. **CNS Drugs** 22 (10):841-60.

EMMANOULIDOU, E., STEFANIS, L., VEKRELLIS, K. 2010. Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. **Neurobiology of Aging** 31 (6):953-68.

FAHN, S. 2015. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. **Movement Disorders** 30 (1):4-18.

FAULL, R.L., LAVERTY, R. 1969. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. **Experimental Neurology** 23 (3):332-40.

FEARNLEY, J.M., LEES, A.J. 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain** 114 (Pt 5):2283-301.

FFYTCH, D.H., CREESE, B., POLITIS, M., CHAUDHURI, K.R., WEINTRAUB, D., BALLARD, C., AARSLAND, D. 2017. The

psychosis spectrum in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology** 13 (2):81-95.

FITZPATRICK, P.F. 1999. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. **Annual Review of Biochemistry** 68:355-81.

FLEMING, S.M., TETREAULT, N.A, MULLIGAN, C.K., HUTSON, C.B., MASLIAH, E., CHESSELET, M.F. 2008. Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. **European Journal of Neuroscience** 28 (2):247-56.

FOLLETT, K.A., WEAVER, F.M, STERN, M., HUR, K., HARRIS, C.L., LUO, P., MARKS, W.J., ROTHLIND, J., SAGHER, O., MOY, C., PAHWA, R., BURCHIEL, K., HOGARTH, P., LAI, E.C., DUDA, J.E., HOLLOWAY, K., SAMIL, A., HORN, S., BRONSTEIN, J.M., STONER, G., STARR, P.A., SIMPSON, P., BALTUCH, G., DE SALLES, A., HUANG, G.D., REDA, D.J., CSP 468 STUDY GROUP. 2010. Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. **The New England Journal of Medicine** 362 (22):2077-91.

FOX, S.H., KATZENSCHLAGER, R., LIM, S.Y., RAVINA, B., SEPPI, K., COELHO, M., POEWE, W., RASCOL, O., GOETZ, CG., SAMPAIO, C. 2011. The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. **Movement Disorders** 26 Suppl 3:S2-41.

FRANCO, J., PREDIGER, R.D., PANDOLFO, P., TAKAHASHI, R.N., FARINA, M., DAFRE, A.L. 2007. Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb. **Life Science** 80 (20):1906-14.

FRISINA, P.G., HAROUTUNIAN, V., LIBOW, L.S. 2009. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. **Parkinsonism Related Disorders** 15 (2):144-8.

FUKAYA, C., YAMAMOTO, T.. 2015. Deep brain stimulation for Parkinson's disease: recent trends and future direction. **Neurologia Medico Chirurgica** (Tokyo) 55 (5):422-31.

GAO, H.M., KOTZBAUER, P.T, URYU, K., LEIGHT, S., TROJANOWSKI, J.K., LEE, M. 2008. Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. **Journal of Neuroscience** 28 (30):7687-98.

GEORGE, S., REY, N.L., REICHENBACH, N., STEINER, J.A., BRUNDIN, P. 2013. α -Synuclein: the long distance runner. **Brain Pathology** 23 (3):350-7.

GIOVANNI, A., SONSALLA, P.K., HEIKKILA, R.E. 1994. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 270 (3):1008-14.

GIULIANI, P., BALLERINI, P., CICCARELLI, R., BUCCELLA, S., ROMANO, S., D'ALIMONTE, I., POLI, A., BERAUDI, A., PEÑA, E., JIANG, S., RATHBONE, M.P., CACIAGLI, F., DI IORIO, P. 2012. Tissue distribution and metabolism of guanosine in rats following intraperitoneal injection. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents** 26 (1):51-65.

GIULIANI, P., ROMANO, S., BALLERINI, P., CICCARELLI, R., PETRAGNANI, N., CICCHITTI, S., ZUCCARINI, M., JIANG, S., RATHBONE, M.P., CACIAGLI, F., DI IORIO, P. 2012. Protective activity of guanosine in an in vitro model of Parkinson's disease. **Panminerva Medica** 54 (1 Suppl 4):43-51.

GLINKA, Y.Y., YOUDIM, M. B. 1995. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. **Europena Journal of Pharmacology** 292 (3-4):329-32.

GOEDERT, M., SPILLANTINI, M.G., DEL TREDICI, K., BRAAK, H. 2013. 100 years of Lewy pathology. **Nature Reviews Neurology** 9 (1):13-24.

GOETZ, C.G. 2002. Jean-Martin Charcot and the aging brain. **Archives in Neurology** 59 (11):1821-4.

GORDON, S.L., BOBROVSKAYA, L., DUNKLEY, P.R., DICKSON, P.W. 2009. Differential regulation of human tyrosine hydroxylase isoforms 1 and 2 in situ: Isoform 2 is not phosphorylated at Ser35. **Biochimica et Biophysica Acta** 1793 (12):1860-7.

GORELL, J.M., PETERSON, E.L., RYBICKI, B.A., JOHNSON, C.C. 2004. Multiple risk factors for Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Science** 217 (2):169-74.

GRIFFIN, M.G., TAYLOR, G.T. 1995. Norepinephrine modulation of social memory: evidence for a time-dependent functional recovery of behavior. **Behavioral Neuroscience** 109 (3):466-73.

HADJICONSTANTINO, M., HUBBLE, J.P., WEMLINGER, T.A., NEFF, N.H. 1994. Enhanced MPTP neurotoxicity after treatment with isoflurophate or cholinergic agonists. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 270 (2):639-44.

HAEHNER, A., BOESVELDT, S., BERENDSE, H.W., MACKAY-SIM A., FLEISCHMANN, J., SILBURN, P.A., JOHNSTON, A.N., MELLICK, G.D., HERTING, B., REICHMANN, H., HUMMEL, D.T. 2009. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease--a multicenter study. **Parkinsonism Related Disorders** 15 (7):490-4.

HANSEL, G., TONON, A.C., GUELLA, F.L., PETTENUZZO, L.F., DUARTE, T., DUARTE, M.M. OSES, J.P., ACHAVAL, M., SOUZA, D.O. 2015. Guanosine Protects Against Cortical Focal Ischemia. Involvement of Inflammatory Response. **Molecular Neurobiology** 52 (3):1791-803.

HASEGAWA, E., TAKESHIGE, K., OISHI, T., MURAI, Y., MINAKAMI, S. 1990. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. **Biochemical and Biophysical Research Communication** 170 (3):1049-55.

HAYCOCK, J.W., AHN, N.G., COBB, M.H., KREBS, E.G. 1992. ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ.

Proceedings of the National Academy of Science of the USA 89 (6):2365-9.

HAYCOCK, J.W., HAYCOCK, D.A. 1991. Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. **Journal of Biological Chemistry** 266 (9):5650-7.

HEIKKILA, R.E., HESS, A., DUVOISIN, R.C. 1984. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. **Science** 224 (4656):1451-3.

HERRAIZ, T., GALISTEO, J. 2015. Hydroxyl radical reactions and the radical scavenging activity of β -carboline alkaloids. **Food Chemistry** 172:640-9.

HOPPEL, C.L., GRINBLATT, D., KWOK, H.C., ARORA, P.K., SINGH, M.P., SAYRE, L.M., GREENBLATT, D. 1987. Inhibition of mitochondrial respiration by analogs of 4-phenylpyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium cation (MPP⁺), the neurotoxic metabolite of MPTP. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 148 (2):684-93.

HÖGLINGER, G.U., ALVAREZ-FISCHER, D., ARIAS-CARRIÓN, O., DJUFRI, M., WINDOLPH, A., KEBER, U., BORTA, A., RIES, V., SCHWARTING, R.K., SCHELLER, D., OERTEL, W.H. 2015. A new dopaminergic nigro-olfactory projection. **Acta Neuropathology** 130 (3):333-48.

IBGE. 2000. **Censo demográfico**. Rio de Janeiro.

PERNA, J., ENGELMANN, M. 2015. Recognizing others rodent's social memories. **Social Behavior in Rodents and Humans.**, edited by S. Krach, pp. 25–45.

JACKSON, E.K., MI, M. 2014. The guanosine-adenosine interaction exists in vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 350 (3):719-26.

JANKOVIC, J., POEWE, W. 2012. Therapies in Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurobiology** 25 (4):433-47.

JAVITCH, J.A., D'AMATO, R.J., STRITTMATTER, S.M., SNYDER, S.H. 1985. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 82 (7):2173-7.

JIANG, S., BALLERINI, P., BUCCELLA, S., GIULIANI, P., JIANG, C., HUANG, X., RATHBONE, M.P. 2008. Remyelination after chronic spinal cord injury is associated with proliferation of endogenous adult progenitor cells after systemic administration of guanosine. **Purinergic signalling** 4 (1):61-71.

JIANG, S., FISCHIONE, G., GIULIANI, P., ROMANO, S., CACIAGLI, F., DI IORIO, P. 2008. Metabolism and distribution of guanosine given intraperitoneally: implications for spinal cord injury. **Nucleosides nucleotides nucleic acids** 27 (6):673-80.

JOHNSON, M.E., SALVATORE, M.F., MAIOLO, S.A., BOBROVSKAYA, L. 2018. Tyrosine hydroxylase as a sentinel for central and peripheral tissue responses in Parkinson's progression: evidence from clinical studies and neurotoxin models. **Progress in neurobiology** 165-167:1-25.

JONES, K.W., HAMMOND, J.R. 1995. Characterization of nucleoside transport activity in rabbit cortical synaptosomes. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** 73 (12):1733-41.

KANDA, F., OISHI, K., SEKIGUCHI, K., KUGA, A., KOBESSHO, H., SHIRAFUJI, T., HIGUCHI, M., ISHIHARA, H. 2008. Characteristics of depression in Parkinson's disease: evaluating with Zung's Self-Rating Depression Scale. **Parkinsonism Related Disorders** 14 (1):19-23.

KARUNANAYAKA, P.R., LEE, E.Y., LEWIS, M.M., SEN, S., ESLINGER, P.J., YANG, Q.X., HUANG, X. 2016. Default mode network differences between rigidity- and tremor-predominant Parkinson's disease. **Cortex** 81:239-50.

KHALDY, H., ESCAMES, G., LEÓN, J., BIKJDAOUENE, L., ACUÑA-CASTROVIEJO, D. 2003. Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. **Neurobiology of Aging** 24 (3):491-500.

KOROS, E., ROSENBROCK, H., BIRK, G., WEISS, C., SAMS-DODD, F. 2007. The selective mGlu5 receptor antagonist MTEP, similar to NMDA receptor antagonists, induces social isolation in rats. **Neuropsychopharmacology** 32 (3):562-76.

KOSTRZEWA, R.M., JACOBOWITZ, D.M. 1974. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. **Pharmacological Reviews** 26 (3):199-288.

KUMER, S.C., VRANA, K.E. 1996. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. **Journal of Neurochemistry** 67 (2):443-62.

LANGSTON, J.W., BALLARD, P.A. 1983. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **The New England Journal of Medicine** 309 (5):310.

LANGSTON, J.W., IRWIN, I. 1986. MPTP: current concepts and controversies. **Clinical Neuropharmacology** 9 (6):485-507.

LANZMASTER, D., DAL-CIM, T., PIERMARTIRI, T.C., TASCA, C.I. 2016. Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. **Aging and Disease** 7 (5):657-679.

LANZMASTER, D., MACK, J.M., COELHO, V., GANZELLA, M., ALMEIDA, R.F., DAL-CIM, T., HANSEL, G., ZIMMER, E.R., SOUZA, D.O., PREDIGER, R.D., TASCA, C.I. 2016. Guanosine Prevents Anhedonic-Like Behavior and Impairment in Hippocampal Glutamate Transport Following Amyloid- β 1-40 Administration in Mice. **Molecular Neurobiology**.

LARA, D. R., SCHMIDT, A.P., FRIZZO, M.E., BURGOS, J.D., RAMÍREZ, G., SOUZA, D.O. 2001. Effect of orally administered

guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. **Brain Research** 912 (2):176-80.

LEE, C.S., SAUER H., BJORKLUND, A. 1996. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Neuroscience** 72 (3):641-53.

LEES, A.J., HARDY, J., REVESZ, T. 2009. "Parkinson's disease." **Lancet** 373 (9680):2055-66.

LEHMANN, I.T., BOBROVSKAYA, L., GORDON, S.L., DUNKLEY, P.R., DICKSON, P.W. 2006. Differential regulation of the human tyrosine hydroxylase isoforms via hierarchical phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry** 281 (26):17644-51.

LEMA TOMÉ, C., TYSON, M.T., REY, N.L., GRATHWOHL, S., BRITSCHGI, M., BRUNDIN, P. 2013. Inflammation and α -synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease-is there a link? **Molecular Neurobiology** 47 (2):561-74.

LETTY, S., CHILD, R., DUMUIS, A., PANTALONI, A., BOCKAERT, J., RONDOUIN, G. 1997. 5-HT₄ receptors improve social olfactory memory in the rat. **Neuropharmacology** 36 (4-5):681-7.

LEWITT, P.A., FAHN, S. 2016. Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward. **Neurology** 86 (14 Suppl 1):S3-12.

LI, N., LEE, B., LIU, R.J., BANASR, M., DWYER, J.M., IWATA, M., LI, X.Y., AGHAJANIAN, G., DUMAN, R.S. 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science** 329 (5994):959-64.

LIMOUSIN, P., POLLAK, P., BENAZZOUZ, A., HOFFMANN, D., LE BAS, J.F., BROUSSOLLE, E., PERRET, J.E., BENABID, A.L. 1995. Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. **Lancet** 345 (8942):91-5.

LIN, X., PARISIADOU, L., SGOBIO, C., LIU, G., YU, J., SUN, L., SHIM, H., GU, X.L., LUO, J., LONG, C., DING, J., MATEO, Y.,

SULLIVAN, P.H., WU, L.G., GOLDSTEIN, D.S., LOVINGER, D., CAI, H. 2012. Conditional expression of Parkinson's disease-related mutant α -synuclein in the midbrain dopaminergic neurons causes progressive neurodegeneration and degradation of transcription factor nuclear receptor related 1. **Journal of Neuroscience** 32 (27):9248-64.

LIU, M., HUNTER, R., NGUYEN, X.V., KIM, H.C., BING, G. 2008. Microsomal epoxide hydrolase deletion enhances tyrosine hydroxylase phosphorylation in mice after MPTP treatment. **Journal of Neuroscience Research** 86 (12):2792-801.

LIU, Y., ROGHANI, A., EDWARDS, R.H. 1992. Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 89 (19):9074-8.

LIX, L.M., HOBSON, D.E., AZIMAE, M., LESLIE, W.E., BURCHILL, C., HOBSON, S. 2010. Socioeconomic variations in the prevalence and incidence of Parkinson's disease: a population-based analysis. **Journal of Epidemiology and Community Health** 64 (4):335-40.

LOTHARIUS, J., BRUNDIN, P. 2002. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nature Reviews Neuroscience** 3 (12):932-42.

LUTHMAN, J., FREDRIKSSON, A., SUNDSTRÖM, E., JONSSON, G., ARCHER, T. 1989. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. **Behavior Brain Research** 33 (3):267-77.

MACHADO, D.G., CUNHA, M.P., NEIS, V.B., BALEN, G.O., COLLA, A.R., GRANDO, J., BROCARD, P.S., BETTIO, L.E., DALMARCO, J.B., RIAL, D., PREDIGER, R.D., PIZZOLATTI, M.G., RODRIGUES, A.L. 2012. Rosmarinus officinalis L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology** 143 (1):158-69.

MAGALINGAM, K.B., RADHAKRISHNAN, A., HALEAGRAHARA, N. 2014. Protective effects of flavonol isoquercitrin, against 6-hydroxy dopamine (6-OHDA)-induced toxicity in PC12 cells. **BMC Research Notes** 7:49.

MAHLKNECHT, P., SEPPI, K., POEWE, W. 2015. The Concept of Prodromal Parkinson's Disease. **Journal of Parkinsons Disease** 5 (4):681-97.

MALEK, N., SWALLOW, D., GROSSET, K.A., ANICHTCHIK, O., SPILLANTINI, M., GROSSET, D.G. 2014. Alpha-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease - a systematic review. **Acta Neurologica Scandinavica** 130 (2):59-72.

MARKEY, S.P., JOHANNESSEN, J.N., CHIUEH, C.C., BURNS, R.S., HERKENHAM, M.A. 1984. Intranuclear generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. **Nature** 311 (5985):464-7.

MARQUES, N.F., CASTRO, A.A., MANCINI, G., ROCHA, F.L., SANTOS, A.R.S., PREDIGER, R.D., DE BEM, A.F., TASCA, C.I. 2018. Atorvastatin Prevents Early Oxidative Events and Modulates Inflammatory Mediators in the Striatum Following Intranasal 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) Administration in Rats. **Neurotoxicity Research** 33 (3):549-559.

MARQUES, N.F., MASSARI, C.M., TASCA, C.I. 2019. Guanosine Protects Striatal Slices Against 6-OHDA-Induced Oxidative Damage, Mitochondrial Dysfunction, and ATP Depletion. **Neurotoxicity Research** 35 (2):475-483.

MARRAS, C., LANG, A., VAN DE WARRENBURG, B.P., SUE, C.M., TABRIZI, S.J., BERTRAM, L., MERCIMEK-MAHMUTOGLU, S., EBRAHIMI-FAKHARI, D., WARNER, T.T., DURR, A., ASSMANN, B., LOHMANN, K., KOSTIC, V., KLEIN, C. 2016. Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. **Movement Disorders** 31 (4):436-57.

MARSH, L. 2013. Depression and Parkinson's disease: current knowledge. **Current Neurology and Neuroscience Reports** 13 (12):409.

MARTIN, H.L., TEISMANN, P. 2009. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. **The FASEB Journal** 23 (10):3263-72.

MARTINEZ-VICENTE, M., TALLOCY, Z., KAUSHIK, S., MASSEY, A.C., MAZZULLI, J., MOSHAROV, E.V., HODARA, R., FREDENBURG, R., WU, D.C., FOLLENZI, A., DAUER, W., PRZEDBORSKI, S., ISCHIROPOULOS, I., LANSBURY, P.T., SULZER, D., CUERVO, A.M. 2008. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. **Journal of Clinical Investigation** 118 (2):777-88.

MASSARI, C.M., CASTRO, A.A., DAL-CIM, T., LANZMASTER, D., TASCA, C.I. 2016. In vitro 6-hydroxydopamine-induced toxicity in striatal, cerebrocortical and hippocampal slices is attenuated by atorvastatin and MK-801. **Toxicology In Vitro** 37:162-168.

MASSARI, C.M., LÓPEZ-CANO, M., NÚÑEZ, F., FERNÁNDEZ-DUEÑAS, V., TASCA, C.I., CIRUELA, F. 2017. Antiparkinsonian Efficacy of Guanosine in Rodent Models of Movement Disorder. **Frontiers in Pharmacology** 8:700.

MATHEUS, F.C., AGUIAR, A.S., CASTRO, A.A., VILLARINHO, J.G., FERREIRA, J., FIGUEIREDO, C.P., WALZ, R., SANTOS, A.R., TASCA, C.I., PREDIGER, R.D. 2012. Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Behavior Brain Research** 235 (2):263-72.

MATHEUS, F.C., RIAL, D., REAL, J.I., LEMOS, C., BEN, J., GUAITA, G.O., PITA, I.R., SEQUEIRA, A.C., PEREIRA F. C., WALZ, R., TAKAHASHI, R.N., BERTOGLIO, L.J., DA CUNHA, C., CUNHA, R.A., PREDIGER, R.D. 2016. Decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory deficits in 6-OHDA-lesioned rats. **Behavioural Brain Research** 301:43-54. doi: 10.1016/j.bbr.2015.12.011.

MATHEUS, F.C., RIAL, D, REAL, J.I., LEMOS, C., TAKAHASHI, R.N., BERTOGGIO, L.J., CUNHA, R.A., PREDIGER, R.D. 2016. Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats. **Molecular Neurobiology** 53 (6):3891-3899.

MAYER, R.A., WALTERS, A.S., HEIKKILA, R.E. 1986. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration to C57-black mice leads to parallel decrements in neostriatal dopamine content and tyrosine hydroxylase activity. **European Journal of Pharmacology** 120 (3):375-7.

MCDOWELL, K., CHESSELET, M.F. 2012. Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease** 46 (3):597-606.

MCNAUGHT, K.S., PERL, D.P., BROWNELL, A.L., OLANOW, C.W. 2004. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. **Annals of Neurology** 56 (1):149-62.

MENZA, M., DOBKIN, R.D., MARIN, H., BIENFAIT, K. 2010. Sleep disturbances in Parkinson's disease. **Movement Disorders** 25 Suppl 1:S117-22.

MIYOSHI, E., WIETZIKOSKI, S., CAMPLESSEI, M., SILVEIRA, R., TAKAHASHI, R.N., DA CUNHA, R. 2002. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Research Bulletin** 58 (1):41-7.

MOLZ, S., DAL-CIM, T., TASCA, C.I. 2009. Guanosine-5'-monophosphate induces cell death in rat hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake inhibition. **Neurochemistry International** 55 (7):703-9.

MOLZ, S., DECKER, H., OLIVEIRA, I.J., SOUZA, D.O., TASCA, C.I. 2005. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. **Neurochemistry Research** 30 (1):83-9.

MOREIRA, E.L., RIAL, D., AGUIAR, A.S., FIGUEIREDO, C.P., SIQUEIRA, J.M., DALBÓ, S., HORST, H., DE OLIVEIRA, J., MANCINI, G., DOS SANTOS, T.S., VILLARINHO, J.G., PINHEIRO, F.V., MARINO-NETO, J., FERREIRA, J., DE BEM, A.F., LATINI, A., PIZZOLATTI, A.M., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M., PREDIGER, R.D. 2010. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission (Vienna)** 117 (12):1337-51.

MORI, A., OHASHI, S., NAKAI, M., MORIIZUMI, T., MITSUMOTO, Y. 2005. Neural mechanisms underlying motor dysfunction as detected by the tail suspension test in MPTP-treated C57BL/6 mice. **Neuroscience Research** 51 (3):265-74.

MORRIS, R.G., GARRUD, P., RAWLINS, J.N., O'KEEFE, J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature** 297 (5868):681-3.

MOSLEY, R.L., BENNER, E.J., KADIU, I., THOMAS, M., BOSKA, M.D., HASAN, K., LAURIE, C., GENDELMAN, H.E. 2006. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clinical Neuroscience Research** 6 (5):261-281

MOY, L.Y., TSAI, L.H.. 2004. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates serine 31 of tyrosine hydroxylase and regulates its stability. **Journal of Biological Chemistry** 279 (52):54487-93.

MUANGPAISAN, W., HORI, H., BRAYNE, C. 2009. Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's disease in Asia. **American Journal of Epidemiology** 19 (6):281-93.

NAGASAWA, K., KAWASAKI, F., TANAKA, A., NAGAI, K., FUJIMOTO, S. 2007. Characterization of guanine and guanosine transport in primary cultured rat cortical astrocytes and neurons. **Glia** 55 (14):1397-404.

NAKAMURA, K. 2013. α -Synuclein and mitochondria: partners in crime? **Neurotherapeutics** 10 (3):391-9.

NAKASHIMA, A., KANEKO Y. S., KODANI, Y., MORI, K., NAGASAKI, H., NAGATSU, T., OTA, A. 2013. Intracellular stability of tyrosine hydroxylase: phosphorylation and proteasomal digestion of the enzyme. **Advances in Pharmacology** 68:3-11.

NAKASHIMA, A., MORI, K., KANEKO, Y.S., HAYASHI, N., NAGATSU, T., OTA, A. 2011. Phosphorylation of the N-terminal portion of tyrosine hydroxylase triggers proteasomal digestion of the enzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 407 (2):343-7.

NAKASHIMA, A., OHNUMA, S., KODANI, Y., KANEKO, Y.S., NAGASAKI, H., NAGATSU, T., OTA, A. 2016. Inhibition of deubiquitinating activity of USP14 decreases tyrosine hydroxylase phosphorylated at Ser19 in PC12D cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 472 (4):598-602.

NAMBU, A., TOKUNO, H., HAMADA, I., KITA, H., IMANISHI, M., AKAZAWA, T., IKEUCHI, Y., HASEGAWA, N. 2000. Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. **Journal of Neurophysiology** 84 (1):289-300.

NASKAR, A., PRABHAKAR, V., SINGH, R., DUTTA, D., MOHANAKUMAR, K.P. 2015. Melatonin enhances L-DOPA therapeutic effects, helps to reduce its dose, and protects dopaminergic neurons in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice. **Journal of Pineal Research** 58 (3):262-74.

NEARY, J.T., RATHBONE, M.P., CATTABENI, F., ABBRACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G. 1996. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. **Trends in Neuroscience** 19 (1):13-8.

NEFF, N.H., WEMLINGER, T.A., DUCHEMIN, A.M., HADJICONSTANTINO, M. 2006. Clozapine modulates aromatic L-amino acid decarboxylase activity in mouse striatum. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 317 (2):480-7.

NELSON, DAVID L., COX, MICHAEL. 2014. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6° ed. ed.

NOYCE, A.J., BESTWICK, J.P., SILVEIRA-MORIYAMA, L., HAWKES, C.H., GIOVANNONI, G., LEES, A.J., SCHRAG, A. 2012. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. **Annals of Neurology** 72 (6):893-901.

O'SHEA, M., MCGREGOR, I.S., MALLET, P.E. 2006. Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. **Journal of Psychopharmacology** 20 (5):611-21.

OERTEL, W., SCHULZ, J.B. 2016. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. **Journal of Neurochemistry**. 10.1111

OKUBADEJO, N.U., BOWER, J.H., ROCCA, W.A., MARAGANORE, D.M. 2006. Parkinson's disease in Africa: A systematic review of epidemiologic and genetic studies. **Movement Disorders** 21 (12):2150-6.

OLSON, T. 1998. A.D.A.M. **Atlas De Anatomia**.

ONG, L.K., FULLER, E.A., SOMINSKY, L., HODGSON, D.M., DUNKLEY, P.R., DICKSON, P.W. 2017. Early life peripheral lipopolysaccharide challenge reprograms catecholaminergic neurons. **Science Reports** 7:40475.

ONG, L.K., GUAN, L., DAMANHURI, H., GOODCHILD, A.K., BOBROVSKAYA, L., DICKSON, P.W., DUNKLEY, P.R. 2014. Neurobiological consequences of acute footshock stress: effects on tyrosine hydroxylase phosphorylation and activation in the rat brain and adrenal medulla. **Journal of Neurochemistry** 128 (4):547-60.

ONG, L.K., PAGE, S., BRIGGS, G.D., GUAN, L., DUN, M.D., VERRILLS, N.M., DUNKLEY, P.R., DICKSON, P.W. 2017. Peripheral Lipopolysaccharide Challenge Induces Long-Term Changes in Tyrosine

Hydroxylase Regulation in the Adrenal Medulla. **Journal of Cell Biochemistry** 118 (8):2096-2107.

ONG, L.K., SOMINSKY, L., DICKSON, P.W., HODGSON, D.M., DUNKLEY, P.R. 2012. The sustained phase of tyrosine hydroxylase activation in vivo. **Neurochemical Research** 37 (9):1938-43.

PALMER, T.M., STILES, G.L. 1995. Adenosine receptors. **Neuropharmacology** 34 (7):683-94.

PATIL, S.D., UNADKAT, J.D. 1997. Sodium-dependent nucleoside transport in the human intestinal brush-border membrane. **American Journal of Physiology** 272 (6 Pt 1):G1314-20.

PENG, L., HUANG, R., YU, C.U., FUNG, K.Y., RATHBONE, M.P., HERTZ, L. 2005. Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. **Glia** 52 (1):25-35.

PERES, T.V., ONG, L.K., COSTA, A.P., EYNG, H., VENSKE, D.K., COLLE, D., GONÇALVES, F.M., LOPES, M.W., FARINA, M., ASCHNER, M., DICKSON, P.W., DUNKLEY, P.R., LEAL, R.B. 2016. Tyrosine hydroxylase regulation in adult rat striatum following short-term neonatal exposure to manganese. **Metallomics** 8 (6):597-604.

PERFEITO, R., CUNHA-OLIVEIRA, T., REGO, A.C. 2012. Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease--resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. **Free Radical Biological and Medicine** 53 (9):1791-806.

PETERSON, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry** 83 (2):346-56.

PETERSON, L.A., CALDERA, P. S., TREVOR, A., CHIBA, K., CASTAGNOLI, N. 1985. "Studies on the 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium species 2,3-MPDP⁺, the monoamine oxidase catalyzed oxidation product of the nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)." **Journal of Medical Chemistry** 28 (10):1432-6.

PETTIFER, K.M., JIANG, S., BAU, C., BALLERINI, P., D'ALIMONTE, I., WERSTIUK, E.S., RATHBONE, M.P. 2007. MPP(+)-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine. **Purinergic Signalling** 3 (4):399-409.

PINTER, B., DIEM-ZANGERL, A., WENNING, G.K., SCHERFLER, C., OBERAIGNER, W., SEPPI, K., POEWE, W. 2015. Mortality in Parkinson's disease: a 38-year follow-up study. **Movement Disorders** 30 (2):266-9.

PISSADAKI, E.K., BOLAM, J.P. 2013. The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease. **Frontiers in Computational Neuroscience** 7:13.

POEWE, W., MAHLKNECHT, P. 2009. The clinical progression of Parkinson's disease. **Parkinsonism Related Disorder** 15 Suppl 4:S28-32.

POEWE, W., SEPPI, K., TANNER, C.M., HALLIDAY, G.M., BRUNDIN, P., VOLKMANN, J., SCHRAG, A.E., LANG, A.E. 2017. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers** 3:17013.

PORSOLT, R.D., PICHON, M., JALFRE, M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature** 266 (5604):730-2.

POSTUMA, R.B., GAGNON, J.F., MONTPLAISIR, J. 2010. Clinical prediction of Parkinson's disease: planning for the age of neuroprotection. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry** 81 (9):1008-13.

PREDIGER, R.D., AGUIAR, A.S., MATHEUS, F.C., WALZ, R., ANTOURY, L., RAISMAN-VOZARI, R., DOTY, R.L. 2012. Intranasal administration of neurotoxicants in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research** 21 (1):90-116.

PREDIGER, R.D., AGUIAR, A.S., MOREIRA, E.L., MATHEUS, F.C., CASTRO, A.A., WALZ, R., DE BEM, A.F., LATINI, A., TASCA, C.I., FARINA, M., RAISMAN-VOZARI, R. 2011. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP):

a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. **Current Pharmaceutical Design** 17 (5):489-507.

PREDIGER, R.D., AGUIAR, A.A., ROJAS-MAYORQUIN, A.E., FIGUEIREDO, C.P., MATHEUS, F.C., GINESTET, L., CHEVARIN, C., BEL, E.D., MONGEAU, R., HAMON, M., LANFUMEY, L., RAISMAN-VOZARI, R. 2010. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research** 17 (2):114-29.

PREDIGER, R.D., BATISTA, L.C., MEDEIROS, R., PANDOLFO, P., FLORIO, J.C., TAKAHASHI, R.N. 2006. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology** 202 (2):391-403.

PREDIGER, R.D., BATISTA, L.C., MIYOSHI, E., TAKAHASHI, R.N. 2004. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behavioural Brain Research** 153 (1):149-57.

PREDIGER, R.D., DA CUNHA, R.C., TAKAHASHI, R.N. 2005. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behavioral Pharmacology** 16 (4):209-18.

PREDIGER, R.D., MATHEUS, F.C., SCHWARZBOLD, M.L., LIMA, M.M., VITAL, M.A. 2012. Anxiety in Parkinson's disease: a critical review of experimental and clinical studies.. **Neuropharmacology** 62 (1):115-24.

PREDIGER, R.D., RIAL, D., MEDEIROS, R., FIGUEIREDO, C.P., DOTY, R.L., TAKAHASHI, R.N. 2009. Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. **Annals of New York Academy of Sciences** 1170:629-36.

PRINGSHEIM, T., JETTE, N., FROLKIS, A., STEEVES, T.D. 2014. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders** 29 (13):1583-90.

PRZEDBORSKI, S. 2017. The two-century journey of Parkinson disease research. **Nature Reviews Neuroscience** 18 (4):251-259.

PUIG, M.V., ANTZOULATOS, E.G., MILLER, E.K. 2014. Prefrontal dopamine in associative learning and memory. **Neuroscience** 282:217-29.

QUINCOZES-SANTOS, A., BOBERMIN, L.D., SOUZA, D.G., BELLAVER, B., GONÇALVES, C.A., SOUZA, D.O. 2014. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. **Journal of Neurochemistry** 130 (1):61-74.

RAMSEY, A.J., FITZPATRICK, P.F. 2000. Effects of phosphorylation on binding of catecholamines to tyrosine hydroxylase: specificity and thermodynamics. **Biochemistry** 39 (4):773-8.

RATHBONE, M.P., MIDDLEMISS, P.J., GYSBERS, J.W., ANDREW, C., HERMAN, M.A., REED, J.K., CICCARELLI, R., DI IORIO, P., CACIAGLI, F. 1999. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology** 59 (6):663-90.

RATHBONE, M., PILUTTI, L., CACIAGLI, F., JIANG, S. 2008. Neurotrophic effects of extracellular guanosine. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids** 27 (6):666-72.

REIJNDERS, J.S., EHRT, U., WEBER, W.E., AARSLAND, D., LEENTJENS, A.F. 2008. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. **Movement Disorders** 23 (2):183-9; quiz 313.

RIACHI, N.J., LAMANNA, J.C., HARIK, S.I. 1989. Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine into the rat brain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 249 (3):744-8.

RIAL, D., CASTRO, A.A., MACHADO, N., GARÇÃO, P., GONÇALVES, F., SILVA, H.B., TOMÉ, A.R., KÖFALVI, A., CORTI, O., RAISMAN-VOZARI, R., CUNHA, R.A., PREDIGER, RD. 2014.

Behavioral phenotyping of Parkin-deficient mice: looking for early preclinical features of Parkinson's disease. **PLoS One** 9 (12):e114216.

RIBEIRO, F.F., XAPELLI, S., MIRANDA-LOURENÇO, C., TANQUEIRO, S.R., FONSECA-GOMES, J., DIÓGENES, J., RIBEIRO J.A., SEBASTIÃO, A.M. 2016. Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. **Neuropharmacology** 104:226-42.

RIEGER, J.W., SCHOENFELD, M.A., HEINZE, H.J., BODIS-WOLLNER, I. 2008. Different spatial organizations of saccade related BOLD-activation in parietal and striate cortex. **Brain Research** 1233:89-97.

RODBELL, M., KRANS, H.M., POHL, S.L., BIRNBAUMER, L. 1971. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding of 125I-glucagon. **Journal of Biological Chemistry** 246 (6):1872-6.

RODRIGUEZ, M.C., OBESO, J.A., OLANOW, C.W. 1998. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. **Annal of Neurology** 44 (3 Suppl 1):S175-88.

ROESLER, R., VIANNA, M.R., LARA, D.R., IZQUIERDO, I., SCHMIDT, A.P., SOUZA, D.O. 2000. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. **Neuroreport** 11 (11):2537-40.

ROSSETTI, Z.L., SOTGIU, A., SHARP, D.E., HADJICONSTANTINOU, M., NEFF, N.H. 1988. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and free radicals in vitro. **Biochemical Pharmacology** 37 (23):4573-4.

SALVATORE, M.F., DISBROW, E., EMBORG, M.E. 2014. Peripheral and cognitive signs: delineating the significance of impaired catecholamine metabolism in Parkinson's disease progression. **Journal of Neurochemistry** 131 (2):129-33.

SALVATORE, M.F., GARCIA-ESPANA, A., GOLDSTEIN, M., DEUTCH, A.Y., HAYCOCK, J.W. 2000. Stoichiometry of tyrosine hydroxylase phosphorylation in the nigrostriatal and mesolimbic systems

in vivo: effects of acute haloperidol and related compounds. **Journal of Neurochemistry** 75 (1):225-32.

SALVATORE, M.F., PRUETT, B.S. 2012. Dichotomy of tyrosine hydroxylase and dopamine regulation between somatodendritic and terminal field areas of nigrostriatal and mesoaccumbens pathways. **PLoS One** 7 (1):e29867.

SALVATORE, M.F., WAYMIRE, J. C., HAYCOCK, J.W. 2001. Depolarization-stimulated catecholamine biosynthesis: involvement of protein kinases and tyrosine hydroxylase phosphorylation sites in situ. **Journal of Neurochemistry** 79 (2):349-60.

SAMPAIO, T.B., ROVERSI, K., SCHAMNE, M.G., CUNHA, A.S., FRANÇA, A.P., SPECK, A.E., DAHER, J.P., WALZ, R., PREDIGER, R.D. 2017. The Relevance of Intranasal Route in Parkinson's Disease: from Physiopathological Alterations to Administration of Neurotoxins. **Clinical Pharmacology and Translational Medicine** Volume 1(2): 30 - 37.

SANER, A., THOENEN. H. 1971. Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. **Molecular Pharmacology** 7 (2):147-54.

SANTIAGO, R.M., BARBIEIRO, J., LIMA, M.M., DOMBROWSKI, P.A., ANDREATINI, R., VITAL, M.A. 2010. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry** 34 (6):1104-14.

SANTIAGO, R.M. et al. 2016. Depression in Parkinson's disease is associated with a serotonergic system change secondary to neuroinflammation. **International Journal of Neurology and Neurotherapy** v. 3:n. 6.

SARAF, A., OBERG, E.A., STRACK, S. 2010. Molecular determinants for PP2A substrate specificity: charged residues mediate dephosphorylation of tyrosine hydroxylase by the PP2A/B' regulatory subunit. **Biochemistry** 49 (5):986-95.

SARRE, S., YUAN, H., JONKERS, N., VAN HEMELRIJCK, A., EBINGER, G., MICHOTTE, Y. 2004. In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Journal of Neurochemistry** 90 (1):29-39.

SAUER, H., OERTEL, W.H. 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. **Neuroscience** 59 (2):401-15.

SAWYER, T.F., HENGHOLD, A.K., PEREZ, W.A. 1984. Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats. **Behavioral Neuroscience** 98 (5):908-13.

SCHAMNE, M.G., MACK, J.M., MORETTI, M., MATHEUS, F.C., WALZ, R., LANFUMEY, L., PREDIGER, RD. 2018. The Gender-Biased Effects of Intranasal MPTP Administration on Anhedonic- and Depressive-Like Behaviors in C57BL/6 Mice: the Role of Neurotrophic Factors. **Neurotoxicity Research** 34 (4):808-819.

SCHAPIRA, A.H. 2007. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Cell Death and Differentiation** 14 (7):1261-6.

SCHAPIRA, A.H., TOLOSA, E. 2010. Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment. **Nature Reviews Neurology** 6 (6):309-17.

SCHAPIRA, A.H., CHAUDHURI, K.R., JENNER, P. 2017. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience** 18 (8):509.

SCHMIDT, A.P., BÖHMER, A.E., SCHALLENBERGER, C., ANTUNES, C., TAVARES, R.G., WOFCHUK, S.T., ELISABETSKY, E., SOUZA, D.O. 2010. Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of guanosine in mice. **British Journal of Pharmacology** 159 (6):1247-63.

SCHMIDT, A.P., LARA, D.R., SOUZA, D.O. 2007. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacology and Therapeutics** 116 (3):401-16.

SCHRAG, A. 2004. Psychiatric aspects of Parkinson's disease--an update. **Journal of Neurology** 251 (7):795-804.

SEAMANS, J.K., FLORESCO, S.B., PHILLIPS, A.G. 1998. D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. **Journal of Neuroscience** 18 (4):1613-21.

SHARMA, S., MOON, C.S., KHOGALI, A., HAIDOUS, A., CHABENNE, A., OJO, C., JELEBINKOV, M., KURDI, Y., EBADI, M. 2013. Biomarkers in Parkinson's disease (recent update). **Neurochemistry International** 63 (3):201-29.

SHELINE, Y.I., GADO, M.H., KRAEMER, H.C. 2003. Untreated depression and hippocampal volume loss. **American Journal of Psychiatry** 160 (8):1516-8.

SHENG, J.G., SHIRABE, S., NISHIYAMA, N., SCHWARTZ, J.P. 1993. Alterations in striatal glial fibrillary acidic protein expression in response to 6-hydroxydopamine-induced denervation. **Experimental Brain Research** 95 (3):450-6.

SIEGFRIED, J., SHULMAN, J. 1987. Deep brain stimulation. **Pacing Clin Electrophysiol** 10 (1 Pt 2):271-2.

SILVEIRA-MORIYAMA, L., HOLTON, J.L., KINGSBURY, A., AYLING, H., PETRIE, A., STERLACCI, W., POEWE, W., MAIER, H., LEES, A.J., REVESZ, A.T. 2009. Regional differences in the severity of Lewy body pathology across the olfactory cortex. **Neuroscience Letters** 453 (2):77-80.

SIMOLA, N., MORELLI, M., CARTA, A.R. 2007. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research** 11 (3-4):151-67.

SLATTERY, D.A., MARKOU, A., CRYAN, J.F. 2007. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology (Berl)** 190 (4):555-68.

SOARES, E., PREDIGER, R.D., NUNES, S., CASTRO, A.A., VIANA, S.D., LEMOS, C., DE SOUZA, C.M., AGOSTINHO, P., CUNHA, R.A., CARVALHO, E., FONTES RIBEIRO, C.A., REIS, F., PEREIRA, F.C. 2013. Spatial memory impairments in a prediabetic rat model. **Neuroscience** 250:565-77.

SOARES, F.A., SCHMIDT, A.P., FARINA, M., FRIZZO, M.E., TAVARES, R.G., PORTELA, R., LARA, D.R., SOUZA, D.O. 2004. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. **Brain Research** 1005 (1-2):182-6.

STAAL, R.G., SONSALLA, P.K. 2000. Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 293 (2):336-42.

STRICKLAND, D., BERTONI, J.M. 2004. Parkinson's prevalence estimated by a state registry. **Movement Disorders** 19 (3):318-23.

SU, C., ELFEKI, N., BALLERINI, P., D'ALIMONTE, P., BAU, C., CICCARELLI, R., CACIAGLI, F., GABRIELE, J., JIANG, S. 2009. Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism. **Journal of Neuroscience Research** 87 (3):617-25.

SUBRAMANIAM, S.R., CHESSELET, M.F. 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology** 106-107:17-32.

SUNG, V.W., NICHOLAS, P.A. 2013. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: expanding the view of Parkinson's disease beyond a pure motor, pure dopaminergic problem. **Neurologic Clinics** 31 (3 Suppl):S1-16.

SURMEIER, D.J., SCHUMACKER, P.T., GUZMAN, J.D., ILIJIC, E., YANG, B., ZAMPESE, E. 2017. Calcium and Parkinson's disease.

Biochemical and Biophysical Research Communications 483 (4):1013-1019.

SUTHERLAND, C., ALTERIO, D., CAMPBELL, C.G., LE BOURDELLÈS, B., MALLET, J., HAAVIK, J., COHEN, P. 1993. Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2. **European Journal of Biochemistry** 217 (2):715-22.

TADAIESKY, M.T., DOMBROWSKI, P.A., DA CUNHA, C., TAKAHASHI, R.N. 2010. Effects of SR141716A on Cognitive and Depression-Related Behavior in an Animal Model of Premotor Parkinson's Disease. **Parkinsons Disease** 2010:238491.

TADAIESKY, M.T., DOMBROWSKI, P.A., FIGUEIREDO, C.P., CARGNIN-FERREIRA, E., DA CUNHA, C., TAKAHASHI, R.N. 2008. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience** 156 (4):830-40.

TASCA, C.I., LANZMASTER, D., OLIVEIRA, K.A., FERNÁNDEZ-DUEÑAS, V., CIRUELA, F. 2018. Neuromodulatory Effects of Guanine-Based Purines in Health and Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience** 12:376.

THOMAZ, D.T., DAL-CIM, T.A., MARTINS, W.C., CUNHA, M.P., LANZMASTER, D., DE BEM, A.F., TASCA, C.I. 2016. Guanosine prevents nitroxidative stress and recovers mitochondrial membrane potential disruption in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. **Purinergic Signalling** 12 (4):707-718.

TOLOSA, E., COMPTA, Y., GAIG, C. 2007. The premotor phase of Parkinson's disease. **Parkinsonism Related Disorders** 13 Suppl:S2-7.

UBEDA-BAÑÓN, I., SAIZ-SANCHEZ, D., DE LA ROSA-PRIETO, C., MARTINEZ-MARCOS, A. 2012. α -Synuclein in the olfactory system of a mouse model of Parkinson's disease: correlation with olfactory projections. **Brain Structure and Function** 217 (2):447-58.

UEMURA, Y., MILLER, J.M., MATSON, W.R., BEAL, M.F. 1991. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. **Stroke** 22 (12):1548-53.

UNGERSTEDT, U. 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **European Journal of Pharmacology** 5 (1):107-10.

UNGERSTEDT, U. 1971. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiologica Scandinavica Supplementum** 367:95-122.

VAN DEN EEDEN, S.K., TANNER, C.M., BERNSTEIN, A.L., FROSS, R.D., LEIMPETER, A., BLOCH, D.A., NELSON, L.M. 2003. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. **American Journal of Epidemiology** 157 (11):1015-22.

VIEIRA, C., DE LIMA, T.C., CAROBREZ, A., LINO-DE-OLIVEIRA, A. 2008. Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. **Neuroscience Letters** 445 (2):170-3.

VINADÉ, E.R., SCHMIDT, A.P., FRIZZO, M.E., PORTELA, L.V., SOARES, F.A., SCHWALM, F.D., ELISABETSKY, E., IZQUIERDO, I., SOUZA, D.O. 2005. Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. **Journal of Neuroscience Research** 79 (1-2):248-53. doi: 10.1002/jnr.20327.

VOLKMANN, J., DANIELS, C., WITT, K. 2010. Neuropsychiatric effects of subthalamic neurostimulation in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology** 6 (9):487-98.

VON CAMPENHAUSEN, S., BORNSCHEIN, N., WICK, R., BÖTZEL, K., SAMPAIO, C., POEWE, W., OERTEL, W., SIEBERT, U., BERGER, K., DODEL, R. 2005. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. **European Neuropsychopharmacology** 15 (4):473-90.

VOON, V., KRACK, P., LANG, A.E., LOZANO, A.M., DUJARDIN, K., SCHÜPBACH, M., D'AMBROSIA, J., THOBOIS, S., TAMMA, F., HERZOG, J., SPEELMAN, J.D., SAMANTA, J., KUBU, C., ROSSIGNOL, H., POON, Y.Y., SAINT-CYR, A., ARDOUIN, C., MORO, E. 2008. A multicentre study on suicide outcomes following

subthalamic stimulation for Parkinson's disease. **Brain** 131 (Pt 10):2720-8.

WANG, J., YOU, H., LIU, J.F., NI, D.F., ZHANG, Z.X., GUAN, J. 2011. Association of olfactory bulb volume and olfactory sulcus depth with olfactory function in patients with Parkinson disease. **AJNR American Journal Neuroradiology** 32 (4):677-81.

WEINTRAUB, D., BURN, D. J.. 2011. Parkinson's disease: the quintessential neuropsychiatric disorder. **Movement Disorders** 26 (6):1022-31.

WILLNER, P. 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology** 52 (2):90-110.

WINTER, C., VON RUMOHR, A., MUNDT, A., PETRUS, D., KLEIN, J., LEE, T., MORGENSTERN, R., KUPSCH, A., JUCKEL, G. 2007. Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. **Behavioural Brain Research** 184 (2):133-41.

XU, Z.Q., LEW, J.Y., HARADA, K., AMAN, K., GOLDSTEIN, M., DEUTCH, A., HAYCOCK, J.W., HÖKFELT, T. 1998. Immunohistochemical studies on phosphorylation of tyrosine hydroxylase in central catecholamine neurons using site- and phosphorylation state-specific antibodies. **Neuroscience** 82 (3):727-38.