

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

**ESTUDO DA MODULAÇÃO DO TRANSPORTE
SINAPTOSSOMAL DE L-[³H]GLUTAMATO POR
DERIVADOS DA GUANINA E SEU PAPEL COMO
NEUROTRANSMISSORES.**

Tiago Góss dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Carla Inês Tasca

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Florianópolis, Fevereiro de 2005.

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

**ESTUDO DA MODULAÇÃO DO TRANSPORTE
SINAPTOSSOMAL DE L-[³H]GLUTAMATO POR
DERIVADOS DA GUANINA E SEU PAPEL COMO
NEUROTRANSMISSORES.**

Tiago Góss dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Carla Inês Tasca

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção de grau de
Mestre**

Florianópolis, Fevereiro de 2005.

Agradecimentos

Os meus agradecimentos iniciais vão para as pessoas mais importantes de minha vida, meus pais (Carlos e Eunice) e aos meus irmãos (Carlos Alberto e Bruna).

Agradeço a toda a minha família, avós, avôs, tios, tias e todos os primos! Mas, gostaria de deixar meu agradecimento especial aos tios Tadeu e Rosângela e aos primos, Pablo, Roberta e Piero pela força e o suporte durante toda a minha jornada em Florianópolis, muito obrigado mesmo!

Não poderia deixar de agradecer à querida prima Fernanda Braga, que não é somente minha amiga e colega, mas o meu maior exemplo profissional.

A minha orientadora, Carla Tasca, pela orientação e ensinamentos durante toda minha iniciação científica e mestrado, mas, principalmente, pela amizade!

Aos professores Rodrigo Bainy Leal e Nelson Gabilan, por todo o envolvimento que tiveram na minha formação e também pela amizade.

Aos amigos professores: Afonso, Ana Lúcia, Andréa, Adair, Boris, Hernán, Kay, Márcio, Marcelo, Risoleta, Roger e Yara.

Ao professor João Batista Calixto do Departamento de Farmacologia da UFSC pelo uso do cintilador.

À galera do Laboratório de Neuroquímica (elenco em ordem alfabética): Betina, Carina, Carla Souza, Camila, Cristiane, Cris Carqueja, Cris, Dani Granato, Dani Wahlheim, Ellen, Fabiano, Karina, Karine, Maria Emília, Ronny, Ronan, Samira, Sandro, Sheila, Simone, Thaís e Tharine. E um agradecimento especial para as “primas” Helena e Rossana, pela companhia durante os três meses no Rio de Janeiro. Aos meus colegas da pós, professores e ao secretário Nivaldo da Pós-Graduação em Neurociências.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Neurobiologia e Hematologia: Marco, Ricardo, Giordano, Cláudia e Bruno.

Aos amigos que fiz no Departamento de Anatomia da UFRJ: Luciana, Fábio, Giselle, Bruno, Suzana, Patrícia, Michele, Marisol, Diego, Marcos, Rafael, Jane, Rose, Sheila, Natan, Angélica, Thiago, Sandra e ao professor Vivaldo Moura Neto.

Aos amigos Fabrício, Eduardo, Felipe, Roberto, Juan, Sandro, Levi e Márcio pela parceria durante toda essa jornada, que essa amizade dure sempre!

Ao Biotério da UFSC e aos animais utilizados neste estudo.

À CAPES/PROCAD, pelo financiamento da bolsa de estudos e auxílios.

Ao CNPq pelos auxílios financeiros.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Neurotransmissão	01
1.2. Liberação de neurotransmissores por exocitose.....	01
1.3. Transporte de Neurotransmissores	03
1.4. Neurotransmissor Glutamato.....	04
1.4.1. Receptores Pré-Sinápticos	05
1.4.1.1. Receptores Pré-Sinápticos NMDA.....	07
1.4.1.2. Receptores Pré-Sinápticos não-NMDA.....	07
1.4.1.3. Receptores Pré-Sinápticos Metabotrópicos.....	08
1.5. Transporte de Glutamato	09
1.5.1. Transporte de Membrana Plasmática	09
1.5.2. Transporte Vesicular	12
1.6. Glutamato e Excitotoxicidade	13
1.7. Derivados da Guanina	14
1.8. Derivados da Guanina e Transmissão Glutamatérgica.....	15
2. OBJETIVO GERAL.....	18
2.1. Objetivos Específicos	18

3. METODOLOGIA	19
3.1. Materiais.....	19
3.2. Equipamentos	19
3.3. Animais	19
3.4. Preparação de frações sinaptossomais purificadas	19
3.5. Preparação de vesículas sinápticas.....	20
3.6. Dosagem de proteína.....	21
3.7. Ensaio da atividade da Lactato desidrogenase (LDH)	21
3.8. Captação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato	21
3.9. Liberação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato	22
3.10. Captação vesicular de [³ H]GMP, [³ H]GDP e [³ H]GppNHp	22
3.11. Análise Estatística	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Avaliação da viabilidade sinaptossomal.....	24
4.2. Avaliação do efeito dos Derivados da Guanina sobre a captação sinaptossomal de L- [³ H]glutamato.....	24
4.3. Avaliação do efeito dos Derivados da Guanina sobre a liberação sinaptossomal de L- [³ H]glutamato	26
4.4. Avaliação da dependência de íons cálcio no aumento da liberação sinaptossomal de L- [³ H]glutamato induzido por DG.....	32
4.5. Avaliação do efeito da Bafilomicina A ₁ sobre liberação sinaptossomal de L- [³ H]glutamato induzida por DG	35
4.6. Avaliação do efeito dos DG sobre a liberação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato na presença de inibidores do transporte de glutamato	37

4.7. Avaliação do efeito dos DG sobre a liberação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato na presença de agonistas de receptores ionotrópicos glutamatérgicos.....	42
4.8. Avaliação do efeito dos DG sobre liberação a sinaptossomal de L-[³ H]glutamato na presença de antagonistas de receptores ionotrópicos glutamatérgicos.....	42
4.9. Captação de nucleotídeos da guanina por vesículas sinápticas.....	45
4.10. Avaliação da captação de [³ H]GMP.....	45
4.11. Avaliação da captação de [³ H]GDP.....	47
4.12. Avaliação da captação de [³ H]GppNHp.....	47
4.13. Avaliação do efeito de glutamato ou GMP na captação de [³ H]GppNHp.....	53
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	63
7. PERSPECTIVAS.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica	06
Figura 2. Efeito de GUO, GMP e GTP sobre a captação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato	25
Figura 3. Efeito de GUO sobre a liberação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato.....	27
Figura 4. Efeito de GMP sobre a liberação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato.....	29
Figura 5. Efeito de GTP sobre a liberação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato.....	30
Figura 6. Efeito de GppNHp sobre a liberação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato.....	31
Figura 7. Avaliação da dependência de íons cálcio na liberação de L-[³ H]glutamato sinaptossomal em presença de GUO (A), GMP (B) e GTP (C).....	33
Figura 8. Avaliação da liberação de L-[³ H]glutamato em presença da Bafilomicina A1.....	36
Figura 9. Efeito dos DG sobre a liberação de L-[³ H]glutamato na presença de L-aspartato	38
Figura 10. Efeito de concentrações crescentes de DL-TBOA e <i>trans</i> -2,4-PDC sobre a captação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato	40
Figura 11. Efeito de DL-TBOA e <i>trans</i> -2,4-PDC sobre a liberação sinaptossomal de L-[³ H]glutamato	41
Figura 12. Liberação de L-[³ H]glutamato na presença de agonistas de receptores glutamatérgicos e DG.....	43
Figura 13. Liberação de L-[³ H]glutamato na presença de antagonistas de receptores glutamatérgicos e DG.....	44
Figura 14. Avaliação do transporte de [³ H]GMP em vesículas sinápticas.....	46
Figura 15. Avaliação do transporte de [³ H]GDP em vesículas sinápticas	48
Figura. 16. Transporte de [³ H]GppNHp em vesículas sinápticas.....	49
Figura 17. Dependência de tempo de incubação sobre a captação vesicular de [³ H]GppNHp....	51
Figura 18. Dependência de concentração sobre a captação de [³ H]GppNHp em vesículas sinápticas	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-metil-isoxazole
- AMP: adenosina-5'-monofosfato
- ADP: adenosina-5'-difosfato
- ATP: adenosina-5'-trifosfato
- ATPase: adenosina-5'-trifosfato hidrolase
- DG: Derivados da Guanina
- DHK: dihidrokainato
- EAAC / EAAT: transportador de aminoácido excitatório
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGTA: ácido etilenoglicol tetra-acético
- GABA: ácido γ -amino-butírico
- GAMS: γ -D-glutamilamino-metilsulfonato
- GDP: guanosina-5'-difosfato
- GLAST: transportador glial de glutamato e aspartato
- GLT-1: transportador glial de glutamato tipo 1
- GMP: guanosina-5'-monofosfato
- GppNHp: 5'-guanilil-imido-difosfato
- GTP: guanosina-5'-trifosfato
- GUO: guanosina
- HBSS: solução salina tamponada por Hapes
- HEPES: ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico
- LDH: lactato desidrogenase
- MK-801: dizolcipina

NMDA: N-metil-D-aspartato

SNC: sistema nervoso central

TBHA: *treo*- β -hidroxi-aspartato

TBOA: DL-*treo*- β -benziloxiaspartato

t-PDC: ácido *trans*-pirrolidina-2,4-dicarboxílico

Tris: tris-hidroxi-metil-amino-metano

VGluT: transportador vesicular de glutamato.

RESUMO

A liberação de glutamato na fenda sináptica é regulada por vários mecanismos, incluindo a exocitose, o transporte através da membrana plasmática por transportadores dependentes de sódio e a atividade de receptores pré-sinápticos. O nucleosídeo e os nucleotídeos da guanina estão envolvidos na inibição da união de glutamato a seus receptores e inibição de respostas celulares induzidas por glutamato através de ações extracelulares. Efeitos tróficos, proliferativos e modulatórios em células neurais também já foram atribuídos aos derivados da guanina. Neste estudo, avaliamos os efeitos dos derivados da guanina na captação e liberação de L-[³H]glutamato por preparações de sinaptossomas (terminais pré-sinápticos) do cérebro de ratos Wistar adultos. Os derivados da guanina foram utilizados nas concentrações de 100 nM a 1 mM. A captação de glutamato não foi alterada na presença dos derivados da guanina. A liberação basal de glutamato e a estimulada por despolarização (na presença de KCl 40 mM) foi aumentada pelos derivados da guanina (guanosina, GMP e GTP). Na ausência de íons cálcio observou-se uma estimulação na liberação basal de glutamato somente na presença de 1 mM de GUO ou GTP, portanto, um efeito menos proeminente do que o observado na presença de cálcio. A liberação de glutamato estimulada por derivados da guanina também mobiliza o “pool” citosólico deste neurotransmissor, pois quando a liberação vesicular foi inibida por Bafilomicina A1, o aumento na liberação basal induzido pelos derivados da guanina não foi revertido. O incremento na liberação de glutamato promovido pelos derivados da guanina foi similar ao observado com L-aspartato, aminoácido que promove a atividade reversa dos transportadores de glutamato. Entretanto, utilizando-se inibidores seletivos dos transportadores de glutamato, DL-TBOA e t-PDC, os derivados da guanina ainda promoveram aumento na liberação de glutamato, o que sugere um mecanismo adicional à modulação da atividade dos transportadores, como a ação em receptores pré-sinápticos. A utilização do agonista do receptor NMDA não alterou a

liberação induzida por GTP. No entanto, cainato induziu um aumento na liberação basal de glutamato, efeito também observado pelo antagonista deste receptor, o GAMS. GTP promoveu um efeito parcialmente aditivo ao observado por cainato e GAMS. Portanto, demonstramos que os derivados da guanina além de modular a ação do glutamato via interação com seus receptores, podem também modular o sistema de transporte de glutamato, fundamental para a regulação da transmissão glutamatérgica.

O transporte vesicular dos derivados da guanina também foi caracterizado neste estudo. A demonstração de armazenamento em vesículas sinápticas é um dos critérios necessários para definir a ação de um composto como um neurotransmissor. Utilizando um análogo não-hidrolizável de GTP, [³H]GppNHp, demonstramos que sua captação em preparações de vesículas sinápticas é saturável e dependente de tempo e temperatura. Entretanto, o conteúdo radioativo proveniente de [³H]GMP e [³H]GDP nas vesículas sinápticas não depende de temperatura e atividade da ATPase vesicular, indicando que estes nucleotídeos somente se unem à membrana vesicular e, portanto não são captados pelas vesículas sinápticas. GTP é captado e portanto, armazenado em vesículas sinápticas, o que evidencia seu possível papel como neurotransmissor. A modulação da liberação sinaptossomal pelos derivados da guanina e a evidência de armazenamento de GTP por vesículas sinápticas são demonstrações que contribuem para um maior entendimento da transmissão purinérgica da guanina no cérebro.

ABSTRACT

Glutamate release in synaptic cleft is regulated by several mechanisms, including exocytosis, transport across the plasma membrane by a family of high-affinity Na⁺-dependent transporters, or presynaptic activity of neurotransmitter receptors. Guanine derivatives are involved in the inhibition of glutamate binding to its receptors and inhibition of glutamate-induced cellular responses by acting extracellularly. This study evaluated the effects of guanine derivatives on glutamate transport (uptake and release) in presynaptic terminals preparations (synaptosomes). Guanine derivatives (guanosine, GMP or GTP) did not alter glutamate uptake into synaptosomes. Basal (physiological K⁺ concentrations) and K⁺-stimulated synaptosomal glutamate release was increased by guanine derivatives from 0.01 to 1 mM. In the absence of calcium, basal glutamate release was increased only in the highest concentration (1 mM) of guanosine and GTP. Guanine derivatives-stimulated glutamate release seems to mobilize the cytosolic pool, since basal glutamate release induced by guanine derivatives was not abolished in the presence of Bafilomycin A1, which inhibits the vesicular release. The increment on glutamate release promoted by guanine derivatives was similar to the observed in the presence of L-aspartate (1 mM), which promotes transporter reversal. However, in the presence of selective glutamate uptake inhibitors, DL-TBOA and t-PDC, guanine derivatives also induced glutamate release, pointing to an additional mechanism of action than modulation of transporters activity. Presynaptic NMDA receptor activation did not alter guanine derivatives effect, but administration of the antagonist, MK-801, increased glutamate release. Kainate did contribute to glutamate release augmentation. Such effect was mimicked by its antagonist GAMS. Hence, guanine derivatives also modulate synaptosomal glutamate transport, a pivotal process in regulation of glutamatergic transmission.

The vesicular uptake of guanine derivatives was also characterized in this study. Uptake of GTP into synaptic vesicles isolated from whole rat brain was assessed by using a poorly-hydrolyzable GTP analog, [^3H]GppNHp. Uptake of GTP into synaptic vesicles is saturable, time- and temperature-dependent and relies on a proton-electrochemical gradient. However, [^3H]GMP and [^3H]GDP radioactive content in synaptic vesicles is not dependent on temperature and vesicular ATPase activity, which indicates these nucleotides only bind to and are not taken up into synaptic vesicles. GTP is taken up by the same electrochemical gradient-dependent transport responsible for neurotransmitters storage, which indicates a neurotransmitter status to this guanine nucleotide. The modulation of synaptic glutamate release by guanine derivatives and the evidence of storage of GTP into synaptic vesicles may contribute to comprehension on the guanine purinergic transmission in brain.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neurotransmissão

O funcionamento do sistema nervoso depende do estabelecimento de precisas conexões entre neurônios e células-alvo específicas chamadas sinapses, a idéia deste tipo de comunicação surgiu de Santiago Ramon y Cajal a mais de um século atrás. O mecanismo pelo qual estas conexões funcionam é chamado de transmissão sináptica ou neurotransmissão (Ramon y Cajal, 1881; Cohen-Cory, 2002).

A neurotransmissão consiste na liberação de moléculas por neurônios pré-sinápticos e sua conseqüente interação com receptores de membrana específicos que podem localizar-se em neurônios pré- e pós-sinápticos ou em células gliais. Esta interação promove a ativação de respostas celulares como a abertura de canais iônicos e/ou ativação de enzimas responsáveis pela síntese de segundos-mensageiros, os quais irão ativar diversas proteínas intracelulares que modulam a atividade de canais iônicos, bombas, receptores e fatores de transcrição, responsáveis pela sinalização celular (Greengard, 2001).

A metabolização do neurotransmissor, ou sua retirada da fenda sináptica por transportadores (proteínas carreadoras) neuronais e/ou gliais específicos promovem o término da resposta. Uma vez recaptado, o neurotransmissor é armazenado em vesículas sinápticas presentes nos terminais pré-sinápticos para ser novamente liberado (Krantz et al., 1999).

1.2 Liberação de Neurotransmissores por Exocitose

Uma das etapas que regulam a transmissão sináptica é o ciclo das vesículas sinápticas, sendo o evento principal a exocitose por fusão de membranas. A fusão de membranas ocorre

por um mecanismo similar em diferentes organismos, de leveduras a mamíferos, e em organelas como as do envelope nuclear e vesículas sinápticas. No entanto, a sinapse apresenta especificidade e complexidade únicas. A transmissão sináptica requer um localizado e rápido sinal, geralmente o aumento da concentração de íons cálcio, que pode ser repetido em alta frequência e também inibido ou potencializado com o tempo (Jahn et al., 2003). Resumidamente, o ciclo compreende várias etapas que se iniciam quando as vesículas preenchidas com neurotransmissor ficam pré-ancoradas na zona ativa (região especializada da membrana pré-sináptica). O processo de ancoramento na membrana é realizado pela montagem de um complexo protéico chamado SNARE (ou hipótese SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), que consiste da interação entre a proteína vesicular sinaptobrevina/VAMP (v-SNARE) e duas proteínas de membrana, SNAP-25 (synaptosome associated protein, 25 KD) e syntaxina (que, juntas formam o t-SNARE). As vesículas complexadas à membrana por SNARE são chamadas de prontamente liberáveis. A fusão das vesículas à membrana sináptica ocorre após um aumento intracelular de íons cálcio provocado pela abertura de canais dependentes de voltagem, o que leva à liberação do conteúdo vesicular de neurotransmissor na fenda sináptica, a proteína sinaptotagmina é considerada como a provável proteína sensível a cálcio. O complexo SNARE pode ser desfeito pela atividade de uma ATPase denominada NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) que mantém um equilíbrio dinâmico entre as vesículas prontamente liberáveis e as pré-ancoradas à membrana (Goda, 1997; Lonart & Südhof, 2000). Após a exocitose as vesículas são rapidamente internalizadas por endocitose e recicladas, podendo ou não ser fusionadas em um endossoma para serem regeneradas, novamente preenchidas por neurotransmissor e repetir o ciclo (Jahn et al., 2003). Este sistema multi-protéico também pode sofrer modulação por outras cascatas enzimáticas que o tornam plástico de acordo com o estímulo. As mudanças sofridas podem levar à modificação da

quantidade de neurotransmissor liberado e a conseqüente mudança de sensibilidade da região pós-sináptica. A fosforilação das proteínas envolvidas na exocitose forma a base da plasticidade pré-sináptica facilitando a neurotransmissão. Já foi demonstrado que as proteínas do complexo SNARE podem ser fosforiladas por diferentes proteínas quinase como a Proteína Quinase dependente de Ca^{2+} /Calmodulina tipo II (CaMKII), Caseína Quinase, Proteína Quinase dependente de Ca^{2+} /Fosfolípídeo (PKC) e Proteína Quinase dependente de AMP cíclico (PKA) (Lin & Scheller, 2000).

1.3. Transporte de Neurotransmissores:

Para que exista uma perfeita sinalização entre neurônios, através de seus sinais químicos, é necessário que o neurotransmissor tenha um período de atividade curto na fenda sináptica. O término da resposta pode ser realizado através da metabolização por enzimas específicas, como ocorre para a acetilcolina, ATP e neuropeptídeos; ou também por retirada dos neurotransmissores da fenda sináptica por transportadores específicos, no caso de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), aminoácidos inibitórios (GABA e glicina) e monoaminas (Kandel et al., 1991). Considerando que neste estudo, o neurotransmissor de interesse é o glutamato, será dada uma maior ênfase ao papel dos transportadores.

Na transmissão sináptica existem duas classes distintas de transportadores de neurotransmissores. A recaptção na membrana plasmática é considerada como a etapa que finaliza a ação do neurotransmissor na fenda sináptica. O transporte do citoplasma para o interior de vesículas secretórias armazena o neurotransmissor para uma liberação posterior. Em virtude disso, estas duas atividades têm um papel essencial durante a transmissão sináptica. Drogas antidepressivas e psicoestimulantes como a fluoxetina e cocaína, respectivamente, potencialmente inibem o transporte na membrana plasmática de monoaminas, demonstrando o significado biológico da recaptção no comportamento animal.

No caso do transporte vesicular, drogas como o anti-hipertensivo reserpina, inibe o armazenamento de monoaminas e induz uma síndrome semelhante à depressão, indicando a importância deste transporte para a liberação de neurotransmissores e também para o comportamento. Os mecanismos deste tipo de transporte ativo, sua regulação e sinalização ainda são pouco entendidos (Gammelsaeter et al., 2004).

Similar a muitos outros sistemas de transporte ativo secundário mantido por gradientes eletroquímicos, a translocação do neurotransmissor é acoplada ao movimento de íons. Ambos transportadores necessitam da hidrólise de ATP por ATPases. A Na^+/K^+ -ATPase gera gradientes de sódio que diretamente guiam a captação do neurotransmissor na membrana plasmática, o movimento de sódio a favor de seu gradiente co-transporta o neurotransmissor. Em contraste, o transporte vesicular depende de um gradiente próton-eletroquímico gerado por uma H^+ -ATPase e o transporte ocorre pela troca de prótons no lúmen vesicular pelo neurotransmissor no citoplasma (Krantz et al., 1999).

1.4 O Neurotransmissor Glutamato:

Os aminoácidos glutamato e aspartato são os neurotransmissores excitatórios mais importantes do Sistema Nervoso Central (SNC) e Periférico de mamíferos, respectivamente. O glutamato desempenha um importante papel na manutenção da atividade nervosa central e em fenômenos plásticos vinculados à aprendizagem e à memória (Meldrum, 2000). Outro aspecto de interesse é a participação do neurotransmissor glutamato na gênese de diversos quadros neurológicos como a epilepsia, encefalopatias isquêmicas, demência de Alzheimer e enfermidade de Huntington (Olney, 1990; Segovia et al., 2001).

A existência de uma grande variedade de receptores faz com que o neurotransmissor glutamato tenha uma ampla diversidade funcional. Os receptores glutamatérgicos são

divididos em dois grupos: ionotrópicos e metabotrópicos (Gasic & Holmann, 1994). Os receptores ionotrópicos são uma família de canais iônicos e denominados de acordo com seu agonista sintético mais seletivo: NMDA (N-metil-D-aspartato), o qual ativa um canal de cálcio, AMPA (alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato) e cainato, que permeiam a entrada de sódio e potássio. Os receptores metabotrópicos, também ativados por agonistas seletivos como o 1S,3R-ACPD (1S,3R-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato) e L-AP4 (L-2-amino-4-fosfono-butirato), acoplam-se a proteínas-G (proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina) e modulam efetores intracelulares, como a fosfolipase C e adenilato ciclase. A figura 1 representa de maneira esquemática uma sinapse glutamatérgica. Considerando o nosso interesse em estudar a modulação do transporte de glutamato em sinaptossomas, maior ênfase sobre a atividade destes receptores presentes nos terminais pré-sinápticos será dada a seguir.

1.4.1. Receptores Pré-Sinápticos:

A liberação de neurotransmissores do terminal sináptico pode ser modulada por uma variedade de mecanismos. Esta modulação modifica a resposta do neurônio pós-sináptico e contribui para a força da conexão sináptica. Considerando que o terminal sináptico é o principal sítio de mudanças dependente de atividade na função sináptica, a expressão de receptores nos terminais torna-se um eficiente mecanismo de regulação da liberação de neurotransmissores e pode ser chamada também de neurotransmissão retrógrada (MacDermott et al., 1999). Quando um receptor pré-sináptico modula a liberação do próprio neurotransmissor, este pode ser chamado também de auto-receptor. Quando o receptor modula a liberação de outra classe de neurotransmissores, ele pode ser chamado de heteroreceptor (Lerma, 2003).

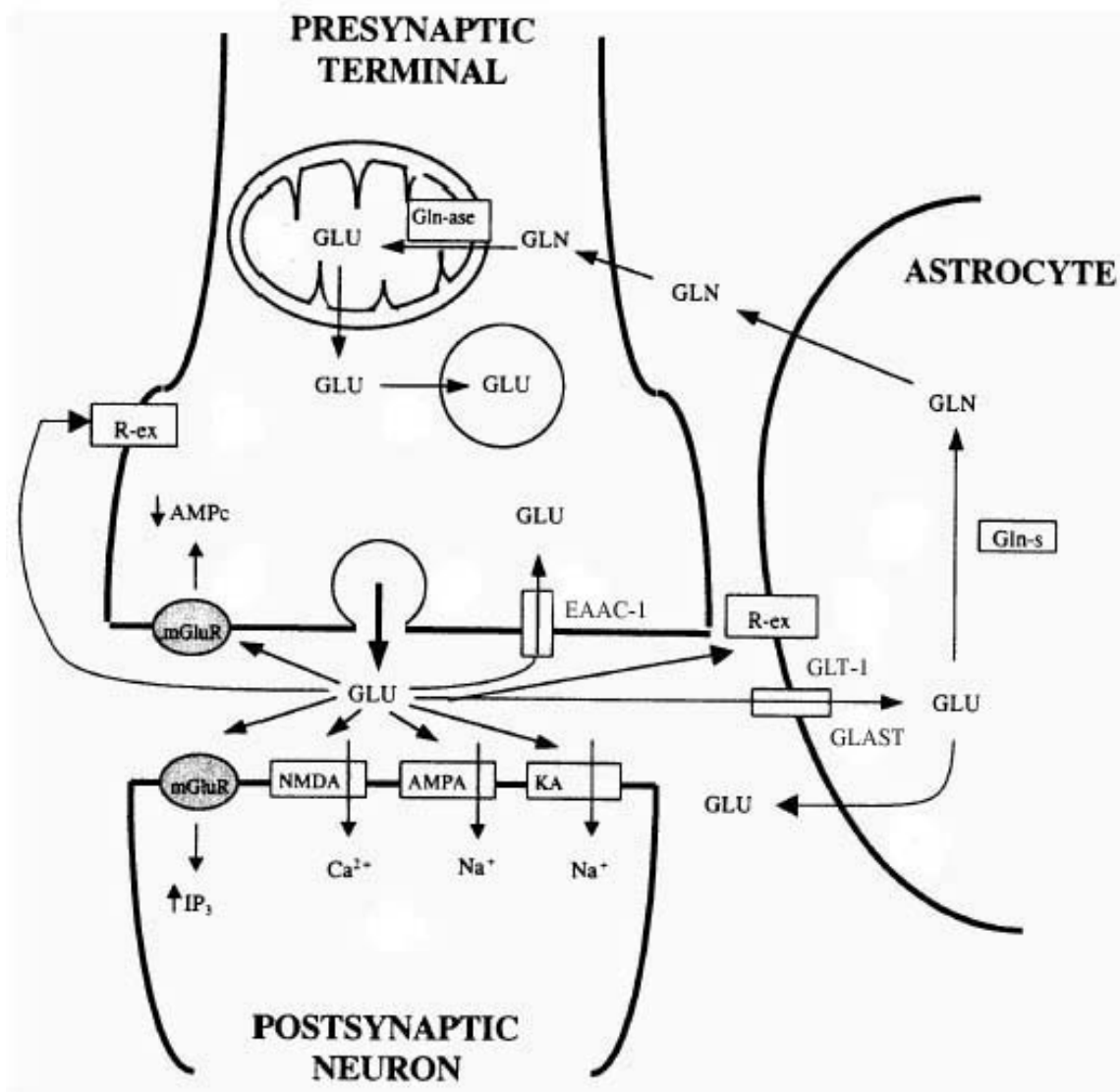


Figura 1. Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica. Adaptado a partir de Segovia et al. (2001).

1.4.1.1. Receptor Pré-sináptico NMDA:

Diversas evidências mostram os receptores pré-sinápticos NMDA como reguladores da liberação de neurotransmissores (Duguid & Smart, 2004). Receptores NMDA já foram especificamente detectados em terminais pré-sinápticos de fibras aferentes primárias (Liu et al., 1994). Em regiões do SNC, como hipocampo, cerebelo e córtex entorrinal, estudos funcionais e imunocitoquímicos documentaram a expressão de receptores NMDA pré-sinápticos com papel modulatório sobre a liberação de neurotransmissores.

A modulação pré-sináptica de NMDA influencia a liberação de dopamina em sinaptossomas estriatais (Krebs et al., 1991; Wang, 1991), noradrenalina em sinaptossomas hipocampais (Pittaluga & Raiteri, 1990; Malva et al., 1994), GABA em neurônios em cultura (Belhage et al., 1993) e em fatias de cerebelo (Duguid & Smart, 2004). Já foi demonstrado que NMDA também estimula a liberação de glutamato e aspartato em fatias hipocampais, por mecanismos insensíveis a tetrodoxina, descartando o envolvimento de canais de sódio (Connick & Stone, 1988) e também estimula a liberação em sinaptossomas hipocampais (Breukel et al., 1998). Entretanto, Bardoni e colaboradores (2004) demonstraram que a ativação pré-sináptica de NMDA na corda espinhal de roedores resulta na inibição da liberação de glutamato de terminais de neurônios sensoriais primários.

1.4.1.2. Receptor Pré-sinápticos Não-NMDA:

No que diz respeito à ação de receptores pré-sinápticos não-NMDA sobre a liberação de glutamato, os estudos prévios não estão em completo acordo. Existem trabalhos que demonstram o papel de receptores não-NMDA em aumentar a excitação neuronal. Por exemplo, em neurônios hipocampais, já foi demonstrado que a administração de cainato

diminui potenciais inibitórios GABAérgicos e também leva a um aumento no número de disparos espontâneos (Kullmann, 2001). O mecanismo pelo qual os receptores cainato diminuem a liberação de GABA não envolve a despolarização dos terminais nervosos, uma vez que a despolarização direta dos terminais tem efeito oposto (Cunha et al., 2000).

Entretanto, outros estudos demonstram efeito contrário. Cossart e colaboradores (2001) verificaram por registros eletrofisiológicos que concentrações submicromolares de cainato podem potencializar a transmissão GABAérgica em sinapses entre interneurônios. O mecanismo pelo qual o cainato aumenta a transmissão sináptica inibitória precisa ser ainda elucidado (Kullmann 2001).

Em relação à modulação da liberação de glutamato por receptores não-NMDA, também existem divergências na literatura. Estudos demonstraram que a ativação pré-sináptica de receptores do subtipo cainato, deprime a função excitatória em sinaptossomas hipocampais (Chittajallu et al. 1996). Esta modulação foi atribuída à atividade secundária de proteínas-G, uma vez que o efeito de cainato é prevenido pela administração da toxina Pertussis (Frerking et al., 2001). Em relação aos receptores AMPA, já foi demonstrado em sinaptossomas a indução na liberação de glutamato (Pittaluga et al., 1997). Entretanto, também existem evidências de que a ativação pré-sináptica de AMPA causa aumento na liberação evocada por potássio (Barnes et al, 1994; Chittajallu et al, 1996).

1.4.1.3. Receptor Pré-sinápticos Metabotrópicos:

A ativação de receptores metabotrópicos no terminal sináptico pode modular a função de canais de potássio e de cálcio dependentes de voltagem, controlando a quantidade de cálcio que entra no terminal durante o potencial de ação e ainda pela produção de segundos

mensageiros e fosforilação de proteínas, modulando a maquinaria de liberação de neurotransmissores (MacDermott et al., 1999).

1.5. Transporte de Glutamato:

Não existem evidências de efetiva metabolização extracelular de glutamato, ou seja, a sinalização estimulada por glutamato é finalizada quando este neurotransmissor é retirado da fenda sináptica por recaptação para o terminal pré-sináptico ou para as células gliais (Robinson, 1999). Quando captado por astrócitos, o glutamato pode ser metabolizado por diversas vias, na qual a formação de glutamina e a entrada no ciclo dos ácidos tricarboxílicos são quantitativamente mais importantes. A formação de glutamina é catalisada, de maneira dependente de ATP, pela glutamina sintetase, enzima presente em astrócitos, com pouca expressão em oligodendrócitos e ausente em neurônios. A glutamina pode ser liberada pelo astrócito e captada pelo neurônio, o qual a converterá novamente a glutamato pela enzima glutaminase, localizada na mitocôndria, o glutamato formado pode ser então novamente armazenado em vesículas para ser novamente liberado (Anderson & Swanson, 2000).

1.5.1. Transporte de Membrana Plasmática:

Os transportadores astrocitários são considerados como os principais responsáveis pela retirada do glutamato da fenda sináptica. Dois transportadores astrocitários já foram clonados e denominados de GLAST (glutamate-aspartate transporter) e GLT-1 (glutamate transporter). Em humanos eles são designados como EAAT1 e EAAT2 (excitatory aminoacid transporter). GLT-1 e GLAST são amplamente distribuídos no cérebro.

Os transportadores neuronais também podem contribuir na manutenção das baixas concentrações extracelulares de glutamato. O transportador neuronal de glutamato mais amplamente distribuído no cérebro é o EAAC1 (homólogo humano, EAAT3). Ele é encontrado em regiões não-sinápticas. Outros subtipos clonados incluem EAAT4, localizado em células de Purkinje e EAAT5, localizado em neurônios retinianos (Anderson et al., 2001). A estrutura do transportador de glutamato foi recentemente descrita na bactéria *Pyrococcus horikoshi*, que apresenta 37 % de homologia na sequência de aminoácidos em relação aos EAAT (Yernool et al., 2004).

Os EAAT localizados na membrana plasmática funcionam através do acoplamento a um gradiente eletroquímico formado pela Na^+/K^+ -ATPase, permitindo o transporte de aminoácidos ácidos contra seu gradiente de concentração. Os EAAT dependentes de sódio também dependem do potássio intracelular. Após a dissociação dos íons sódio e de glutamato, íons potássio presentes no citoplasma ligam-se ao transportador e o ativam. Em cada ciclo, pelo menos uma molécula de sódio é movida do espaço extracelular para o citoplasma e uma molécula de potássio é movida na direção oposta, sendo o transporte de glutamato acoplado à entrada de sódio (Robinson & Dowd, 1997).

Já foi demonstrado que vários compostos podem inibir a atividade dos EAAT, entre eles, dihidrokainato (DHK), *treo*- β -hidróxi-aspartato (TBHA), DL-*treo*- β -benziloxiaspartato (TBOA) e o ácido *trans*-pirrolidina-2,4-dicarboxílico (t-PDC). Estes inibidores são usados como ferramentas para a elucidação das propriedades intrínsecas e fisiológicas dos transportadores, porém, estes compostos também podem ativar receptores ionotrópicos de glutamato. THA e t-PDC foram descritos como inibidores competitivos do sítio de ligação de glutamato em isoformas do transportador EAAT1 a 4. THA também demonstrou ser um ligante de receptores NMDA (Jane et al, 1994). DHK é um inibidor relativamente seletivo para EAAT-2 e DL-TBOA inibe a atividade de EAAT-1 e EAAT-2, não se unindo a

receptores de glutamato. Alguns destes inibidores podem ser transportados por EAAT (ou seja, são considerados como um substrato para os transportadores). Uma importante distinção funcional entre os inibidores transportáveis ou não, é que os transportáveis podem induzir a liberação de glutamato pela atividade reversa do transportador, ou seja, a troca do inibidor com o substrato intracelular. THA e t-PDC são transportados por EAAT1-3, enquanto que DHK e DL-TBOA não são substratos para qualquer tipo de EAAT. Uma segunda distinção entre os dois tipos é que os inibidores não transportáveis podem bloquear o transporte reverso por se unirem à superfície extracelular do transportador (Anderson et al, 2001; Chatton et al., 2001; Shimamoto et al, 1998).

Os transportadores de glutamato podem, em determinadas situações, contribuir para aumentar a concentração de glutamato na fenda sináptica em um fenômeno conhecido como “transporte reverso”, no qual o glutamato é liberado do citoplasma para o meio extracelular pela atividade inversa do transportador, de maneira independente de íons cálcio. Este processo é freqüentemente observado em condições patológicas que levam a disfunções celulares como a redução nos níveis de ATP e mudanças nas concentrações transmembrana de sódio, potássio e cloreto. Eventos como trauma, episódios isquêmicos e hipóxia, comprometem tais funções e contribuem significativamente para a morte neuronal (Raiteri et al., 2002; Phillis et al., 2000).

Diferentes vias de sinalização estão envolvidas na modulação do transporte de glutamato. A própria interação entre glutamato e seus transportadores astrogliais induz o aumento da atividade dos transportadores (Munir et al., 2000). A atividade dos transportadores também pode ser aumentada por fosforilação (Casado et al., 1993). A presença de neurônios e a secreção neuronal de glutamato aumentam a atividade de GLT-1 e GLAST em astrócitos mantidos em cultura (Poitry-Yamate et al., 2002). Os transportadores de glutamato também possuem um mecanismo de regulação redox, baseado na redução ou

oxidação de grupos sulfidril do transportador. A oxidação destes grupos está associada à diminuição da capacidade de captação de glutamato (Trotti et al., 1998).

1.5.2. Transporte Vesicular:

A captação vesicular de glutamato e de outros neurotransmissores depende da formação de um gradiente próton-eletróquímico ($\Delta\mu_{H^+}$) através da membrana vesicular, gerado por uma H^+ -ATPase, uma enzima multimérica com domínios citosólico e de membrana, muito semelhante a $F_1F_0 H^+$ -ATPase de mitocôndria (Stevens & Forgacs, 1997). A formação do $\Delta\mu_{H^+}$ pelo bombeamento de prótons consiste de um componente químico (ΔpH), que acidifica o lúmen vesicular e um componente elétrico ($\Delta\psi$), tornando o lúmen com carga positiva. Vesículas sinápticas geralmente apresentam um ΔpH de aproximadamente 1,5 a 2 unidades e um $\Delta\psi$ de $\sim 50mV$ (Johnson 1988), porém variações na condutância a íons cloreto podem alterar estes valores (Wolosker et al, 1996).

A caracterização molecular do transportador vesicular de glutamato foi recentemente descrita (Takamori et al., 2000), mostrando que ele está relacionado ao transportador de fosfato inorgânico conhecido como BNPI (“brain-specific Na^+ -dependent inorganic phosphate transporter”). Este transportador pertence a uma família de proteínas que utilizam o gradiente de sódio através da membrana plasmática para fazer o co-transporte de fosfato inorgânico. Este transportador também está presente em vesículas sinápticas, sendo assim, foi denominado de transportador vesicular de glutamato 1 (VGluT1) (Bellocchio et al., 2000). Estudos posteriores identificaram um segundo transportador (VGluT2) altamente homólogo ao VGluT1, com 82 % de semelhança na seqüência de aminoácidos, sendo identificado inicialmente em células pancreáticas e batizado como “differentiation-associated Na^+ -dependent inorganic phosphate transporter” (DNPI) (Herzog et al, 2001). Ao contrário dos

EATs, os transportadores vesiculares são seletivamente localizados em terminais nervosos glutamatérgicos, uma vez que acumulam glutamato em vesículas sinápticas de neurônios excitatórios (Kaneko & Fujiyama, 2002). Recentemente, um terceiro subtipo (VGluT3) foi descoberto em roedores, é estruturalmente muito semelhante aos subtipos 1 e 2 (mais de 70% de identidade) e também com características funcionais similares, porém apresenta uma distribuição bastante diferente e intrigante, sendo encontrado em populações de neurônios não-glutamatérgicos, como neurônios colinérgicos no caudato putamen e serotoninérgicos nos núcleos da rafe (Herzog et al., 2004).

1.6. Glutamato e Excitotoxicidade:

Estudos realizados simultaneamente definiram o papel fisiológico do glutamato no SNC e também como mediador de eventos patológicos. O termo excitotoxicidade foi criado para definir a morte neuronal causada pela administração exógena de altas concentrações de glutamato ou compostos com ação agonística nos receptores glutamatérgicos (Olney, 1990).

A excitotoxicidade glutamatérgica endógena está envolvida em danos neurológicos agudos como hipóxia, isquemia, traumatismo craniano e epilepsia (Meldrum, 2000) e em doenças neurodegenerativas crônicas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Amiotrófica Lateral (Segovia et al., 2001). A morte celular causada pela excitotoxicidade pode levar a subseqüentes liberações de glutamato que, em grande quantidade e através de processos não controlados levam a formação de uma “onda excitotóxica” atingindo as células neurais circundantes. O mecanismo principal relacionado a morte celular induzida por glutamato envolve o desequilíbrio iônico promovido pela entrada excessiva e prolongada de cálcio, inicialmente por receptores ionotrópicos (resposta rápida e aguda) e posteriormente via modulação de canais de cálcio por receptores metabotrópicos (resposta tardia). O

aumento de cálcio intracelular leva a ativação de uma série de cascatas enzimáticas que incluem, proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintases e endonucleases que contribuem na morte celular (Meldrum, 2000).

1.7. Derivados da Guanina:

O papel intracelular dos nucleotídeos da guanina como moduladores da atividade das proteínas-G são amplamente estudados (Morris & Malbon, 1999). As proteínas-G heterotriméricas interagem com receptores de membrana e atuam como transdutores dos sinais extracelulares, resultando em respostas efetoras específicas. GDP e GTP desempenham um importante papel no estado basal e na ativação das proteínas-G, respectivamente (Bockaert, 1991). Também as proteínas-G monoméricas de baixo peso molecular têm sua atividade modulada por GTP e GDP (Exton, 1998). Até então, não foi demonstrada interação de GMP ou guanosina (GUO) com as proteínas-G.

Além de sua conhecida função na transdução de sinal, os derivados da guanina (DG), desempenham um importante papel nas funções cerebrais através de uma ação extracelular. Podem desencadear eventos independentes da ativação de proteína-G, como efeitos tróficos em astrócitos, estimulando a proliferação e diferenciação (Rathbone, 1999). Em neurônios, os DG podem promover proliferação, expansão e crescimento de neuritos (Francisco, 2004). Também já foi demonstrado que estes compostos podem estar exercendo seus efeitos através do aumento na produção de fatores de crescimento em culturas de astrócitos (Ciccarelli et al., 2001). A principal fonte de liberação de DG são os astrócitos, que em condições fisiológicas, liberam tanto derivados da adenina (adenosina e ATP), quanto derivados da guanina (guanosina e GTP). Em situações de hipóxia/isquemia, a liberação de DG pode ser elevada em até três vezes e mantida por períodos de 30 minutos (Ciccarelli et al., 1999). Além disso,

a presença de DG no líquido cefalorraquidiano de humanos, ou seja, no espaço extracelular, já foi demonstrada (Regner et al., 1997). Estudos já demonstraram que os DG podem atuar como moléculas neuroprotetoras. A guanosina também é capaz de induzir a remielinização em lesões da corda espinhal em ratos, através da ativação de linhagens oligodendrocitárias (Jiang et al., 2003).

Estudos recentes também demonstram que os DG podem modular a morte celular por apoptose. A guanosina inibe a apoptose induzida por estaurosporina em culturas de astrócitos (Di Iorio et al., 2004), e também protege células de neuroblastoma humano contra a apoptose induzida pela administração do peptídeo β -amilóide (Pettifer et al., 2004). Outros trabalhos sugerem, entretanto, que a guanosina pode induzir apoptose por promover a liberação de adenosina (Di Iorio et al., 2002). Em nosso laboratório, foi observado que GMP induz apoptose em fatias de hipocampo de ratos (Molz, 2003)

Apesar das diversas evidências de que os DG exercem seus efeitos biológicos de maneira dependente de ativação de sítios específicos, ainda não estão bem caracterizados os receptores para os DG. Porém, já foi observado que GTP pode se unir a sítios específicos que não apresentam atividade GTPásica (Tasca et al., 1999) e, em um trabalho recente, a caracterização deste sítio de união de GTP na membrana foi descrito (Rotta et al., 2004). Sítios de união específicos para guanosina em preparações de membrana, também já foram demonstrados (Traversa et al., 2002), no entanto, receptores específicos para os derivados da guanina ainda não foram clonados.

1.8 Derivados da Guanina e a Transmissão Glutamatérgica:

Diversas evidências têm demonstrado que o nucleosídeo e os nucleotídeos derivados da guanina (DG), através de uma ação extracelular, desempenham um importante papel na modulação da transmissão glutamatérgica.

Foi demonstrado que os DG inibem a união de glutamato e análogos ionotrópicos (cainato, NMDA e AMPA) a seus receptores (Souza & Ramírez, 1991; Paz et al., 1994; Dev et al., 1996; Paas et al., 1996; Porciúncula et al., 2002;). Além disto, os DG inibem respostas induzidas pela ativação de receptores metabotrópicos, como a fosforilação de proteínas (Tasca et al., 1995) e o acúmulo de AMP cíclico (Tasca et al., 1998). Desta maneira, demonstrou-se que respostas celulares induzidas por glutamato podem ser moduladas pelos DG, através de sua ação extracelular.

Estudos de neurotoxicidade induzida por glutamato *in vivo* demonstraram que a guanosina protege contra a lesão neuronal e contra convulsões induzidas pela injeção de ácido quinolínico (Schimidt et al., 2000; Lara et al., 2001; Oliveira et al., 2004) e α -dendrotoxina (Vinade et al., 2003). A administração de GMP também tem efeito anticonvulsivo (Malcon et al., 1997), porém este efeito depende da conversão de GMP a guanosina (Soares et al., 2004). De fato, a conversão de nucleotídeos da guanina ao nucleosídeo guanosina por ectonucleotidases (Zimmermann, 1996) parece estar relacionada a muitos efeitos mediados pelos DG, como demonstrado por Frizzo e colaboradores (2003), onde o efeito de GMP e GTP em estimular a captação de glutamato por astrócitos é abolido por inibidores de ectonucleotidases, sem que a estimulação promovida por guanosina seja afetada. Estudos utilizando modelos de excitotoxicidade *in vitro*, têm demonstrado que GMP previne a toxicidade produzida por glutamato na isquemia química (Molz et al., 2001; Oliveira et al., 2002), e na privação de glicose (Molz et al., 2005).

Em relação ao transporte de glutamato, já foi demonstrado que os DG podem modular a captação de glutamato em diferentes subtipos de transportadores de glutamato. A guanosina pode, de maneira específica, aumentar a captação de glutamato em culturas de astrócitos (Frizzo et al., 2001). Em situações de excitotoxicidade, como a privação de oxigênio e glicose, a guanosina aumenta a captação de glutamato e previne danos celulares em fatias de córtex cerebral (Frizzo et al., 2002). Quando administrada *in vivo*, guanosina reverte a inibição da captação de glutamato promovida por ácido quinolínico em fatias de córtex cerebral (Vinade et al., 2005). Os DG também inibem a captação de glutamato por preparações de vesículas sinápticas de maneira dependente de tempo e concentração (Tasca et al., 2004).

Considerando a importância do neurotransmissor glutamato nos processos de plasticidade e toxicidade neuronal, e o relevante papel dos DG na modulação da neurotransmissão glutamatérgica, é importante estudarmos a interação dos DG com os sistemas que regulam a liberação de glutamato. Além disso, pretendemos contribuir para o entendimento do significado fisiológico dos DG no processo de neurotransmissão com a caracterização do transporte vesicular destes, um dos critérios para um composto ser considerado como neurotransmissor.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi investigar a modulação dos derivados da guanina (DG) sobre o transporte de glutamato em sinaptossomas e os mecanismos envolvidos na modulação do transporte de glutamato. Também avaliamos se os DG podem ser captados por vesículas sinápticas, o que poderia evidenciar um papel dos DG como neurotransmissores.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito dos derivados da guanina sobre a captação sinaptossomal de L-[³H]glutamato por seus carreadores de membrana pré-sináptica, em preparações de sinaptossomas;
2. Avaliar o efeito dos derivados da guanina sobre a liberação sinaptossomal de L-[³H]glutamato em condições basais ou quando estimulada por um agente despolarizante;
3. Avaliar a dependência de íons cálcio sobre a liberação de glutamato induzida pelos DG;
4. Avaliar se o possível efeito dos DG sobre a liberação de glutamato envolve o “pool” vesicular e/ou citosólico;
5. Avaliar o efeito dos inibidores de transporte sobre a liberação sinaptossomal de glutamato na presença dos DG;
6. Avaliar o efeito de agonistas e antagonistas de receptores pré-sinápticos de glutamato na liberação de glutamato na presença dos DG;
7. Avaliar se os DG, de maneira semelhante a outros neurotransmissores, podem ser captados por vesículas sinápticas.

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais: ácido morfolino propanosulfônico (MOPS), albumina sérica bovina (BSA), cloreto de colina, Folin Ciocalteau, L-glutamato, ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), GDP, GMP, GppNHP, GTP, Guanosina, NMDA e Triton X-100 da Sigma®. L-[³H]Glutamato, [³H]GMP, [³H]GDP, [³H]GppNHp e Percoll da Amersham®. Ditioneitol (DTT) da Pharmacia Biotech®. Tris-hidroximetil-aminometano e HEPES da USB®. MK-801 e GAMS da RBI-Research Biochemicals International®. DL-TBOA e t-PDC da Tocris®. Líquido de cintilação OptiPhase HiSafe 3 da Perkin Elmer®. Todos os outros reagentes utilizados foram de qualidade analítica e obtidos de fornecedores comerciais padrão

3.2. Equipamentos: Agitador de tubos, Phoenix®; banho-maria, Biomatic®; centrífuga refrigerada, Himac CR20B2, Hitachi®; centrífuga, 5804R, Eppendorff®; cintilador Tri-Carb, 1600 TR, Packard®; Potenciômetro DM 20, Digimed®; espectrofotômetro Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech®.

3.3. Animais: Foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em um ciclo de 12 horas claro/escuro, a 25 °C, com ração e água *ad libitum*. Os “Princípios Éticos do COBEA” foram seguidos para todos os experimentos.

3.4. Preparação de frações sinaptossomais purificadas: A preparação de sinaptossomas de ratos adultos foi realizada conforme Dunkley e colaboradores (1988). Os animais foram mortos por decapitação, o cérebro foi rapidamente removido e as porções posteriores (cerebelo, bulbo e ponte) foram removidas. A porção anterior (“forebrain”) foi

homogeneizada em Potter de vidro (10% peso/volume) a 4 °C, em um tampão composto por Sacarose 0,32 M; EDTA 1mM; Ditiotreitól 0,25 mM, pH 7,4. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 1000 g (3.000 rpm). O sobrenadante foi coletado com pipeta Pasteur e 2 ml foram aplicados aos tubos preparados com o gradiente descontínuo de Percoll (23, 15, 7 e 3%). Os gradientes com a amostra foram centrifugados por 10 min a 30.000 g (17.000 rpm). As frações 3 e 4 de cada tubo foram coletadas, unidas e recentrifugadas por 15 min a 30.000 g (17.000 rpm). O precipitado foi novamente ressuspensão e centrifugado por 15 min a 30.000 g (17.000 rpm). O sobrenadante foi descartado e o precipitado final foi ressuspensão em tampão HBSS (solução salina tamponada com HEPES), o qual consistia de: Hepes 28 mM; KCl 2,5 mM; NaCl 133,5 mM; CaCl₂ 1 mM; K₂HPO₄ 20 mM; MgSO₄ 1,2 mM; Glicose 1,2 mM, e utilizado para os ensaios de captação e liberação.

3.5. Preparação de vesículas sinápticas: As vesículas sinápticas foram isoladas a partir de cérebro total de ratos, conforme previamente descrito (Fykse & Fonnum, 1988). Dois cérebros de ratos Wistar machos adultos foram homogeneizados (10% peso/volume) em uma solução de 0,32 M sacarose, 10 mM Mops-Tris (pH 7,4), e 1 mM EGTA e centrifugados por 10 min a 800 g. O precipitado foi ressuspensão, homogeneizado, recentrifugado e os sobrenadantes foram unidos e centrifugados por 30 min a 20.000 g (13.000 rpm) para obter as frações sinaptossomais (P₂). O P₂ foi lisado osmoticamente por ressuspensão em um volume pequeno (aproximadamente 0.8 ml/g de tecido fresco) de 10 mM Mops-Tris (pH 7,4) contendo 0,1 mM EGTA e centrifugado a 17.000 g (12.000 rpm) for 30 min. O sobrenadante contendo as vesículas foi submetido a uma centrifugação com gradiente de densidade de sacarose (0,4 M e 0,6 M sacarose) a 65.000 g por 2 h. A fração contendo as vesículas sinápticas foi isolada a partir da banda de 0,4 M sacarose e armazenada à -70 °C, por no máximo dois meses.

3.6. Dosagem de proteína: A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), usando-se albumina bovina sérica como padrão.

3.7. Ensaio da atividade da Lactato desidrogenase (LDH): a LDH é uma enzima citosólica e a avaliação de sua atividade no meio extracelular é um indicativo de permeabilização ou rompimento de membranas celulares e, portanto, da integridade dos sinaptossomas. Aliquotas de sinaptossomas foram centrifugadas à 14.000 rpm por 2 min e o meio sobrenadante foi incubado na presença dos substratos, NADH e piruvato, em um espectrofotômetro termostaticado (30 °C). A leitura (340 nm) da cinética de consumo de NADH é proporcional à atividade da LDH. Este consumo foi expresso pela diferença das absorbâncias nos tempos inicial (30 seg) e final (3 min) da reação. A LDH total foi determinada pela adição de 10 % de Triton X-100 e rompimento dos sinaptossomas. Esta atividade foi considerada como 100% (Whitaker, 1969).

3.8. Captação sinaptossomal de L-[³H]glutamato: A captação de glutamato foi realizada conforme previamente descrito (Fonnum et al., 1980). Os sinaptossomas foram ressuspensos em HBSS, a 4 °C. A reação foi iniciada pela adição de 35 µl (100 – 150 µg) da preparação de sinaptossomas ao meio contendo L-[³H]glutamato 100 nM em HBSS com NaCl 200 mM, a 35 °C, na presença ou ausência de DG. A incubação foi finalizada após 1 min, através de filtração do meio de ensaio em filtros de fibra de vidro (Millipore 0,45 µm). Após a secagem na estufa a 37° C, os filtros foram armazenados individualmente em tubos Eppendorf com 1ml de líquido de cintilação. A captação de glutamato foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados substituindo íons sódio por cloreto de colina. A radioatividade presente nos filtros foi avaliada por cintilação líquida.

3.9. Liberação sinaptossomal de L-[³H]glutamato: O ensaio de liberação foi adaptado a partir de Tavares et al. (2002). Foi realizada a captação por 15 minutos a 35° C na presença de L-[³H]glutamato 500 nM. A captação foi finalizada por centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em tampão sem glutamato e novamente centrifugado. O procedimento anterior foi repetido por mais três vezes, o precipitado final foi ressuspense em HBSS a 4 °C. Os sinaptossomas foram incubados a 35 °C por 1 minuto, em condições basais ou despolarizantes (KCl 40 mM) na presença dos DG. Quando avaliada, a bafilomicina (100 nM) foi pré-incubada por 20 min. A liberação foi imediatamente finalizada por centrifugação a 14.000 rpm por 1 min. A radiação presente nos sobrenadantes e precipitados foi avaliada por cintilação líquida. A quantidade de L-[³H]glutamato liberada (no sobrenadante) foi calculada como uma porcentagem da quantidade total de radioatividade.

3.10. Captação vesicular de [³H]GMP, [³H]GDP e [³H]GppNHp: A captação de DG foi realizada conforme previamente descrito (Wolosker et al., 1996). O meio de captação era composto por 10 mM Mops-Tris (pH 7.4), 4 mM KCl, 140 mM gliconato de potássio, 0,12 M sacarose, 2 mM MgCl₂, 2 mM ATP em um volume final de 200 µl. Nos ensaios de captação de DG, eles foram incubados na presença de 2 mM GMP e 3 µCi/ml [³H]GMP, ou 2 mM GDP e 5 µCi/ml [³H]GDP, ou 2 mM GppNHp e 3 µCi/ml [³H]GppNHp. A captação foi iniciada com a adição das vesículas sinápticas (40-50 µg de proteína/tubo) a 35° C. Quando avaliada, a bafilomicina (1 µM) foi pré-incubada por 10 min. A reação foi finalizada por filtração do meio de ensaio através de filtros Millipore 0,45 µm (mantidos em uma solução de 200 mM NaHPO₄ para evitar união não específica de nucleotídeos), rapidamente lavados (3 vezes) com 4 ml de 10mM Mops-Tris (pH 7.0) a temperatura ambiente. A captação de DG

foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de vesículas sinápticas. A radioatividade presente nos filtros foi avaliada por cintilação líquida

3.11. Análise estatística: Os resultados obtidos foram analisados através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do Teste de Duncan, quando necessário. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados estão expressos como média \pm erro padrão. O programa GraphPad Prism 3.0 foi utilizado para as análises cinéticas das curvas de inibição da captação de L-[^3H]glutamato e transporte de L-[^3H]GppNHp.

4. RESULTADOS

Parte 1

O conjunto de dados apresentados a seguir referem-se aos objetivos específicos de 1 a 6 que avaliam o papel dos Derivados da Guanina na modulação do transporte de L-[³H]Glutamato em sinaptossomas obtidos do cérebro anterior de ratos.

4.1. Avaliação da Viabilidade Sinaptossomal:

Para determinar a integridade dos sinaptossomas utilizados neste estudo, foi realizado o ensaio da atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH). A atividade da LDH nas alíquotas dos sinaptossomas foi de $9,35 \pm 2,32$ % em relação aos sinaptossomas rompidos com Triton X-100 (100 %), o que determina a integridade dos sinaptossomas utilizados neste estudo.

4.2. Avaliação do efeito dos DG sobre a captação de L-[³H]Glutamato em sinaptossomas de cérebro anterior de ratos adultos:

Considerando a importância da retirada do glutamato da fenda sináptica e o papel atribuído aos derivados da guanina na modulação da transmissão glutamatérgica, verificamos se os DG poderiam alterar a captação de glutamato por seus carreadores de membrana dependentes de sódio e de alta afinidade para glutamato.

Foram realizadas curvas de concentração de guanosina (GUO), GMP (guanosina-5'-monofosfato) e GTP (guanosina-5'-trifosfato). Os DG ensaiados nas concentrações de 100 nM a 1 mM não promoveram alteração significativa na captação sinaptossomal de L-[³H]glutamato em relação ao controle (Fig. 2).

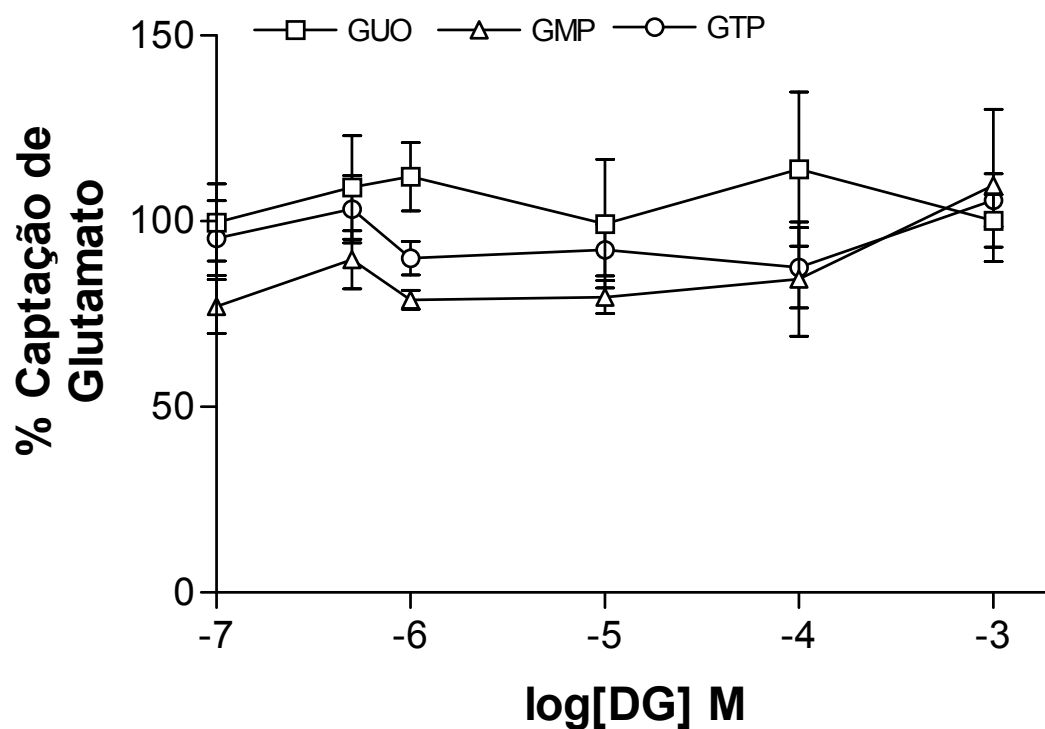


Figura 2. Efeito de GUO, GMP e GTP sobre a captação sinaptossomal de L- $[^3\text{H}]$ glutamato. A captação de L- $[^3\text{H}]$ glutamato foi calculada em pmol/min/mg de proteína e está representada em porcentagens em relação ao controle, o qual corresponde a 100 % da captação de L- $[^3\text{H}]$ glutamato ($10,33 \pm 2,08$ pmol/min/mg de proteína). As concentrações dos DG utilizadas foram de 100 nM, 500 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM e 1 mM. A captação efetiva é calculada descontando-se os valores obtidos na ausência de íons sódio (captação inespecífica). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, $n = 4$.

4.3. Avaliação do efeito dos DG sobre a liberação de L-[³H]Glutamato em sinaptossomas de cérebro anterior de ratos adultos:

Em determinadas condições, o glutamato pode ser liberado diretamente do citoplasma para o espaço extracelular, através da atividade reversa de seu transportador de membrana em um processo independente de íons cálcio. Esta liberação é chamada de citosólica ou basal. Avaliamos o efeito de concentração crescentes dos DG na liberação sinaptossomal de L-[³H]glutamato. GUO induz um aumento na liberação basal de L-[³H]glutamato partir de 1 μ M, promovendo um aumento na liberação em 87 % na concentração de 1 mM (Fig. 3).

Os terminais nervosos foram submetidos a um estímulo utilizando uma alta concentração de potássio (KCl 40 mM, com redução proporcional de NaCl) levando à despolarização. GUO promoveu uma elevação na liberação de L-[³H]glutamato induzida por despolarização. Foi observado um aumento de 42 % e 52 % na liberação de L-[³H]glutamato, na presença de 100 μ M e 1 mM de GUO, respectivamente.

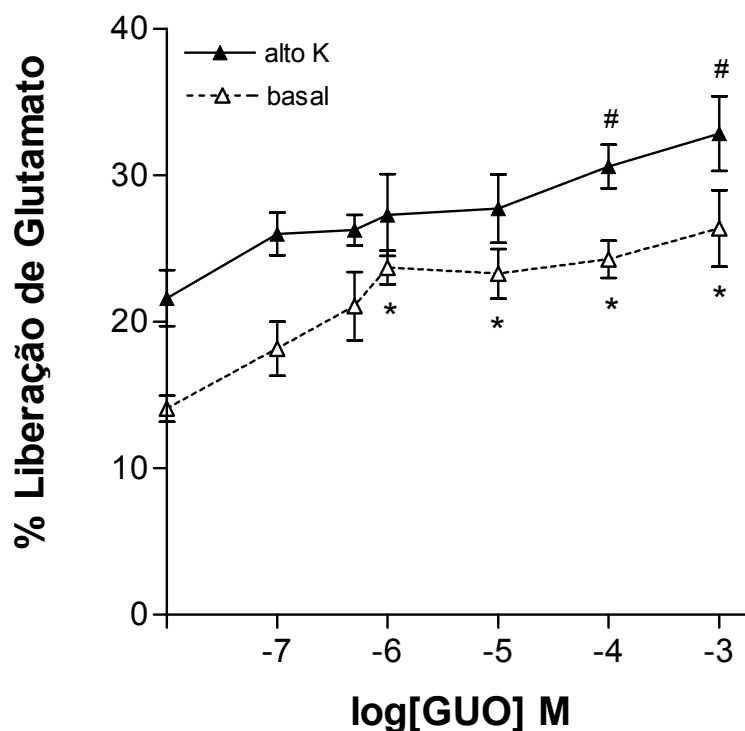


Figura 3. Efeito de GUO sobre a liberação sinaptossomal de L-[³H]glutamato. Os resultados estão expressos como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[³H]glutamato captado. A liberação basal (sinaptossoma incubado em concentrações fisiológicas de KCl) no grupo controle foi de 14,08 %; em condições despolarizantes (40 mM KCl, alto K.) a liberação foi de 21,62 %. As concentrações finais de GUO foram de 100 nM, 500 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM e 1 mM. * indica médias significativamente diferentes do grupo controle basal; # indica médias significativamente diferentes do grupo controle despolarizado, n = 4.

A Figura 4 mostra o efeito de concentrações crescentes de GMP sobre a liberação sinaptossomal de L-[³H]glutamato. De forma similar ao que foi observado para GUO, GMP também induz um aumento na liberação basal de L-[³H]glutamato a partir de 10 μ M, sendo que na concentração de 1 mM houve um aumento de 69 %. Na liberação induzida por despolarização, ocorreu um aumento na liberação de L-[³H]glutamato de 45 % e 69 %, na presença de GMP 100 μ M e 1 mM, respectivamente.

A liberação sinaptossomal de L-[³H]glutamato frente a concentrações crescentes de GTP também foi avaliada (Fig. 5). Na liberação basal de L-[³H]glutamato, houve um incremento de 95 % na concentração de 10 μ M e 114 % em 100 μ M, obtendo um aumento de 146 % na presença de GTP 1 mM. A liberação de L-[³H]glutamato induzida por despolarização é estimulada em 52 % em relação ao controle a partir de 10 μ M de GTP e atinge 85 % de aumento na presença de 1 mM de GTP.

Para descartar a hipótese de que os nucleotídeos somente teriam efeito sobre a liberação de glutamato após a sua hidrólise, utilizamos um análogo sintético do GTP, o GppNHp, o qual apresenta entre os resíduos de fosfato beta e gama, um grupo imido, o que torna este composto menos sensível à ação das ectonucleotidases, também denominado de análogo “não-hidrolizável”. Da mesma forma como foi observados com os outros DG, GppNHp, promove um aumento na liberação de L-[³H]glutamato, sendo que a 1 mM eleva em 46 % a basal e 25 % a despolarizada (Fig. 6).

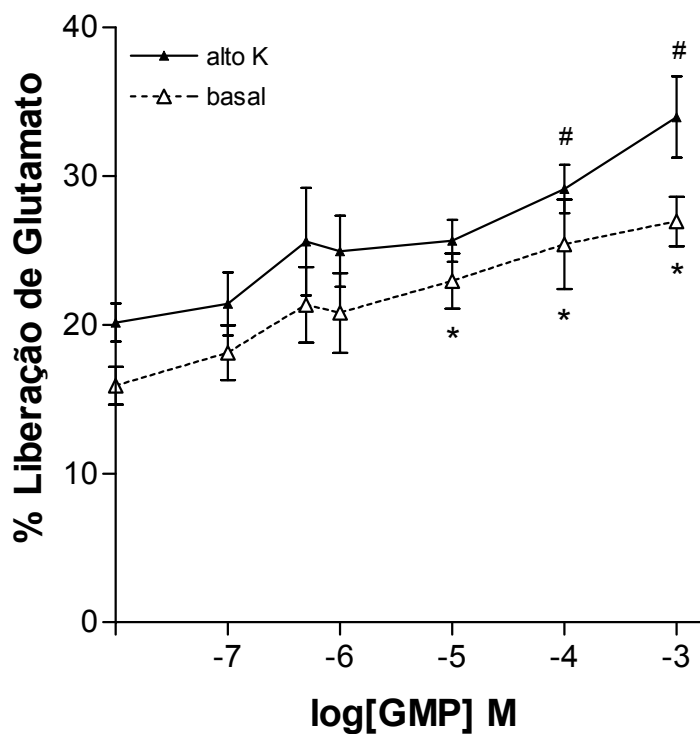


Figura 4. Efeito GMP sobre a liberação sinaptossomal de L-[³H]glutamato. Os resultados estão expressos como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[³H]glutamato captado. A liberação basal (sinaptossoma incubado em concentrações fisiológicas de KCl) no grupo controle foi de 15,91 %; em condições despolarizantes (40 mM KCl, alto K.) a liberação foi de 20,16 %. As concentrações finais de GMP foram de 100 nM, 500 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM e 1 mM. * indica médias significativamente diferentes do grupo controle; # indica médias significativamente diferentes do grupo controle despolarizado, n = 4.

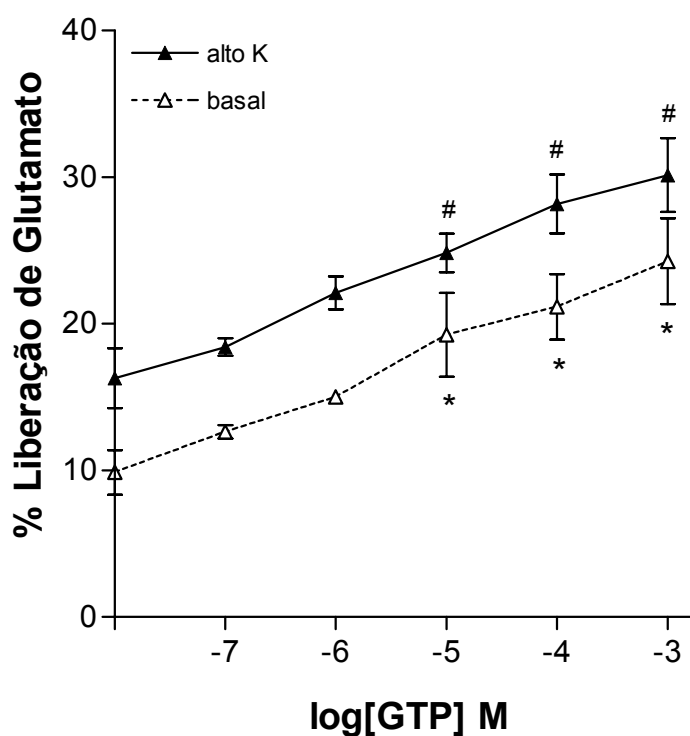


Figura 5. Efeito de GTP sobre a liberação sinaptossomal de L-[³H]glutamato. Os resultados estão expressos como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[³H]glutamato captado. A liberação basal (sinaptossoma incubado em concentrações fisiológicas de KCl) no grupo controle foi de 9,87 %; em condições despolarizantes (40 mM KCl, alto K.) a liberação foi de 16,28 %. As concentrações finais de GTP foram de 100 nM, 500 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M e 1 mM. * indica médias significativamente diferentes do grupo controle; # indica médias significativamente diferentes do grupo controle despolarizado, n = 4.

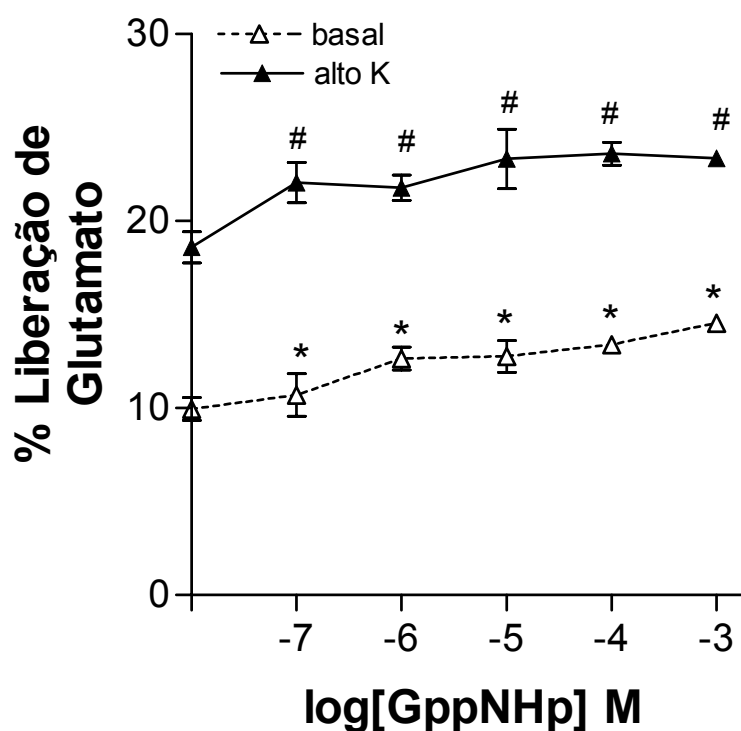


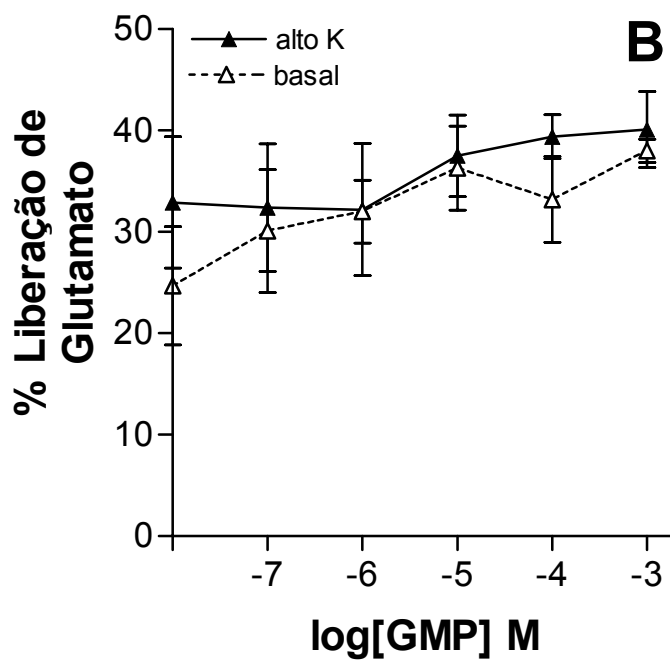
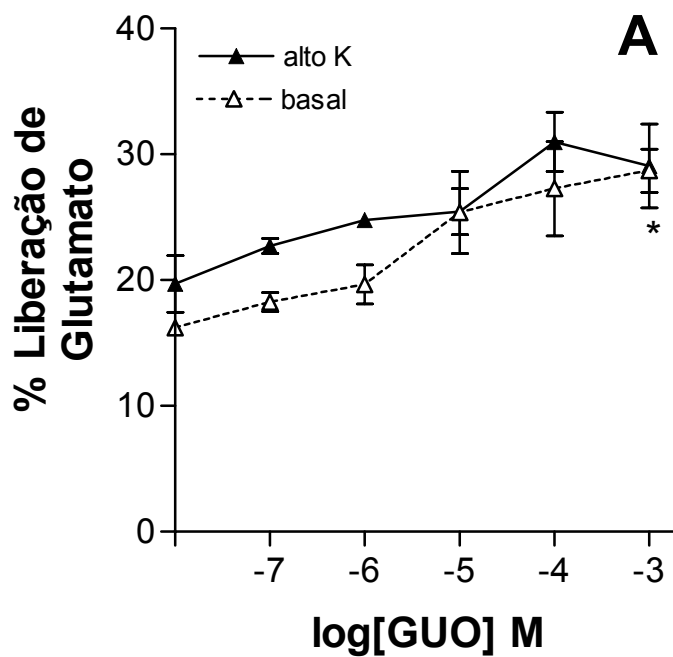
Figura 6. Efeito de GppNHp sobre a liberação sinaptossomal de L-[³H]glutamato. Os resultados estão expressos como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[³H]glutamato captado. A liberação basal (sinaptossoma incubado em concentrações fisiológicas de KCl) no grupo controle foi de 9,95 %; em condições despolarizantes (40 mM KCl, alto K.) a liberação foi de 18,60 %. As concentrações finais de GTP foram de 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM e 1 mM. * indica médias significativamente diferentes do grupo controle; # indica médias significativamente diferentes do grupo controle despolarizado, n = 4.

4.4. Avaliação da dependência de íons cálcio sobre o aumento da liberação de L-[³H]glutamato induzida por DG:

Conforme previamente demonstrado na literatura, a liberação de neurotransmissores por exocitose é dependente da presença de íons cálcio. Na Figura 7, avaliamos o efeito dos DG sobre a liberação de L-[³H]glutamato quando o CaCl₂ do meio de incubação foi substituído por EGTA (ácido etilenoglicol tetra-acético), quelante de íons cálcio do meio extracelular.

GUO promoveu um aumento de 57 % na liberação basal de L-[³H]glutamato somente na concentração mais alta, 1 mM (Fig. 7A). Não houve aumento significativo na liberação estimulada por despolarização na presença de GUO.

GMP não promoveu alteração na liberação basal nem na estimulada por KCl 40 mM (Fig. 7B). GTP não alterou a liberação induzida por despolarização (Fig. 7C), porém, causou um aumento de 96 % na liberação citosólica (basal), quando incubado na concentração de 1 mM. Portanto, observamos que o aumento na liberação basal de L-[³H]glutamato induzida por DG apresenta um componente independente de cálcio, porém somente na concentração mais elevada de GUO e GTP (1 mM) o efeito foi observado. Isso não ocorre com a liberação estimulada por potássio, demonstrando que a presença de cálcio nesta situação é necessária.



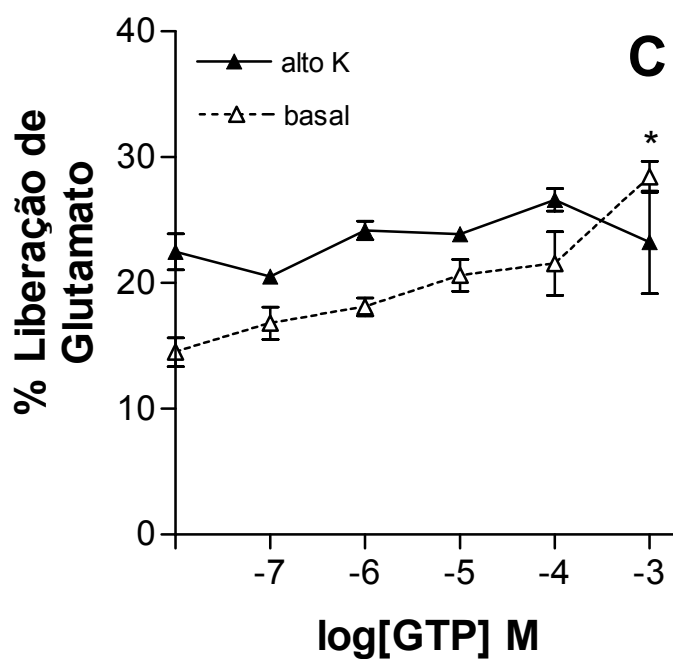


Figura 7. Avaliação da dependência de íons cálcio na liberação de L-[³H]glutamato sinaptossomal em presença de GUO (A), GMP (B) e GTP (C). Os resultados estão expressos como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[³H]glutamato captado. As concentrações finais dos DG foram 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M e 1 mM. * indica médias significativamente diferentes do controle, n = 3.

4.5. Avaliação do efeito da Bafilomicina A1 sobre a liberação de L-[³H]glutamato induzida por DG:

A Bafilomicina A1, toxina produzida pela bactéria *Streptomyces griseus*, depleta o conteúdo vesicular de neurotransmissor por inibir a atividade da H⁺-ATPase de vesículas sinápticas, a qual é responsável por induzir e manter o transporte de glutamato para o interior da vesícula (Cousin & Robinson, 1998). Utilizamos a Bafilomicina A1 como uma ferramenta para identificar se o L-[³H]glutamato liberado pelos sinaptossomas na presença de DG era de origem vesicular e/ou citosólica.

A pré-incubação com Bafilomicina A1 alterou a liberação de L-[³H]glutamato de modo que a liberação basal e despolarizada passam a não apresentar diferenças significativas. (Fig. 8).

O efeito dos DG sobre a liberação de L-[³H]glutamato na presença de Bafilomicina A1 foi avaliado. GUO, GMP e GTP (1 mM) aumentaram a liberação citosólica em 60, 64 e 67 %, respectivamente e a liberação despolarizada em 67, 50 e 55 %, respectivamente.

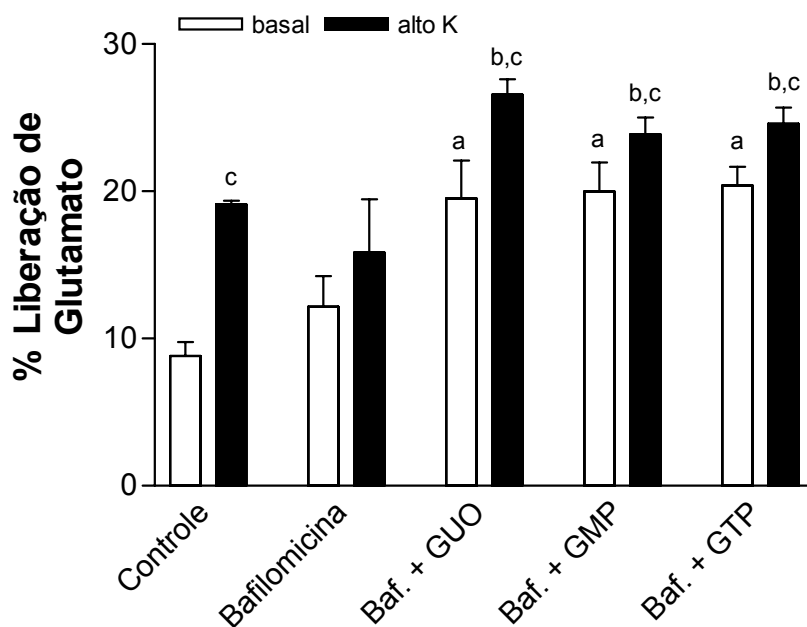


Figura 8. Avaliação da liberação de L-[³H]glutamato em presença da Bafilomicina A1.

Os resultados estão expressos como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[³H]glutamato captado. Baf. + GUO, Baf. + GMP e Baf. + GTP representam os ensaios realizados com sinaptossomas pré-incubados por 10 min na presença de Bafilomicina A₁ 1 μM. a = indica médias significativamente diferentes do grupo controle basal; b = indica médias significativamente diferentes do grupo controle alto K; c = indica médias significativamente diferentes da liberação basal do próprio grupo, n = 6.

4.6. Avaliação do efeito dos DG sobre a liberação de L-[³H]glutamato na presença de inibidores do transporte sinaptossomal:

O carreador sinaptossomal de glutamato é também capaz de utilizar o aminoácido aspartato como substrato para o transporte. Em alta concentração, o aspartato tanto na sua forma L- ou D-, pode agir como um inibidor da captação de glutamato (Bridges et al., 1999). No entanto, foi demonstrado que em ensaios de liberação, o aspartato ativa o transporte reverso, promovendo um aumento na liberação citosólica de glutamato (Anderson et al., 2001). Utilizamos L-aspartato (1 mM) para verificar se o efeito estimulatório dos DG sobre a liberação de L-[³H]glutamato estaria ocorrendo através de uma ação modulatória no carreador de membrana.

Em presença de L-aspartato (1 mM) a liberação basal de L-[³H]glutamato aumentou em 145 % e a liberação estimulada por despolarização aumentou 45 % em relação ao controle (Fig. 9). O efeito dos DG na presença de L-aspartato foi avaliado. Neste ensaio, utilizamos GMP, GTP e o análogo não-hidrolizável GppNHp. A presença de GMP, GTP ou GppNHp (1 mM) não alterou o aumento na liberação de L-[³H]glutamato provocado por aspartato (Fig. 9).

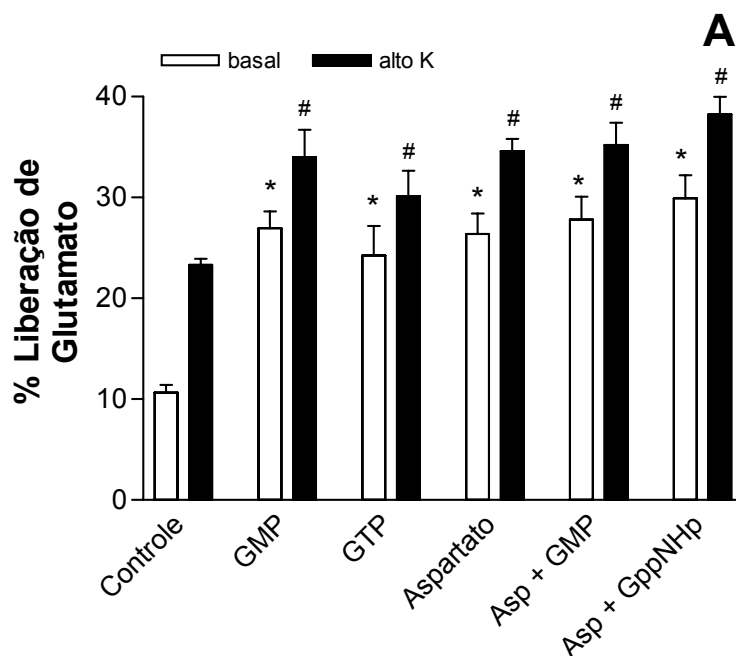


Figura 9. Efeito dos DG sobre a liberação de L-[³H]glutamato na presença de L-aspartato. Os resultados estão expressos como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[³H]glutamato captado. GMP, GppNHp e Aspartato (Asp.) foram incubados em concentração de 1 mM. As colunas da direita representam as incubações realizadas na presença de GMP + Aspartato e GppNHp + Aspartato. * indica médias significativamente diferentes do grupo controle; # indica médias significativamente diferentes do grupo controle despolarizado, n = 5.

Para verificar o efeito dos DG especificamente sobre os transportadores de glutamato, considerando que L-aspartato também tem ação sobre receptores de glutamato, foram realizados experimentos com inibidores do transporte de glutamato não-metabolizáveis, t-2,4-PDC (inibidor transportável) e DL-TBOA (inibidor não-transportável). Ambos diminuíram a captação de L-[³H]glutamato e os valores de IC₅₀ encontrados foram de $2,57 \pm 0,15 \mu\text{M}$ e $0,53 \pm 0,05 \mu\text{M}$ para t-PDC e DL-TBOA, respectivamente (Fig. 10). t-PDC aumentou a liberação de L-[³H]glutamato de maneira similar ao observado com L-aspartato. A liberação de L-[³H]glutamato estimulada por GTP mais t-PDC apresentou um efeito aditivo. DL-TBOA não modificou a liberação de L-[³H]glutamato e também o efeito estimulatório provocado pelo GTP (Fig. 11).

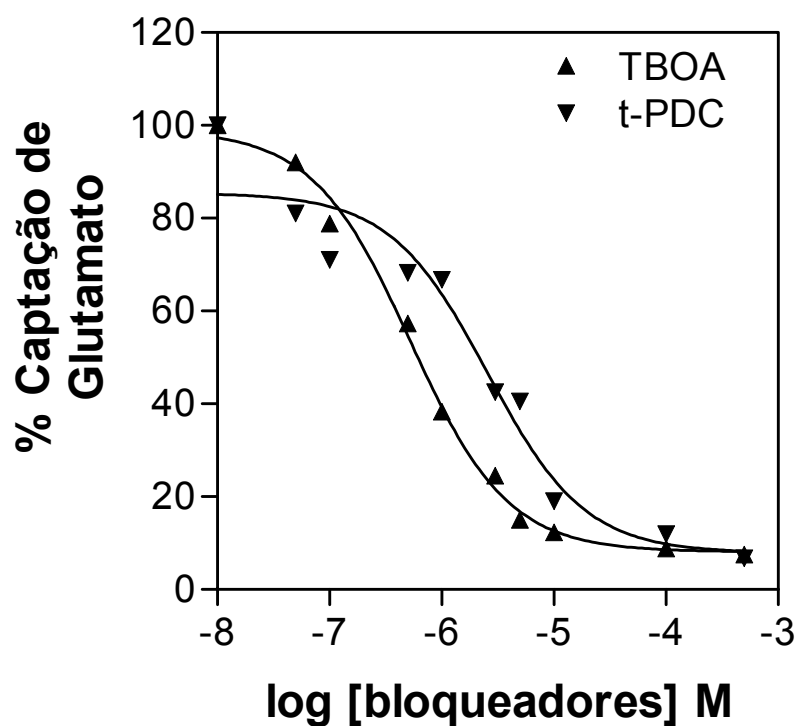


Figura 10. Efeito de concentrações crescentes de DL-TBOA e t-2,4-PDC sobre a captação sinaptossomal de L-[³H]glutamato. A captação de L-[³H]glutamato foi calculada em pmol/min/mg de proteína e está representada em porcentagens em relação ao controle, o qual corresponde a 100 % da captação de L-[³H]glutamato ($10,33 \pm 2,08$ pmol/min/mg de proteína). As concentrações dos inibidores foram de 50 nM a 500 μ M. A captação efetiva é calculada descontando-se os valores obtidos na ausência de íons sódio (captação inespecífica), n = 5.

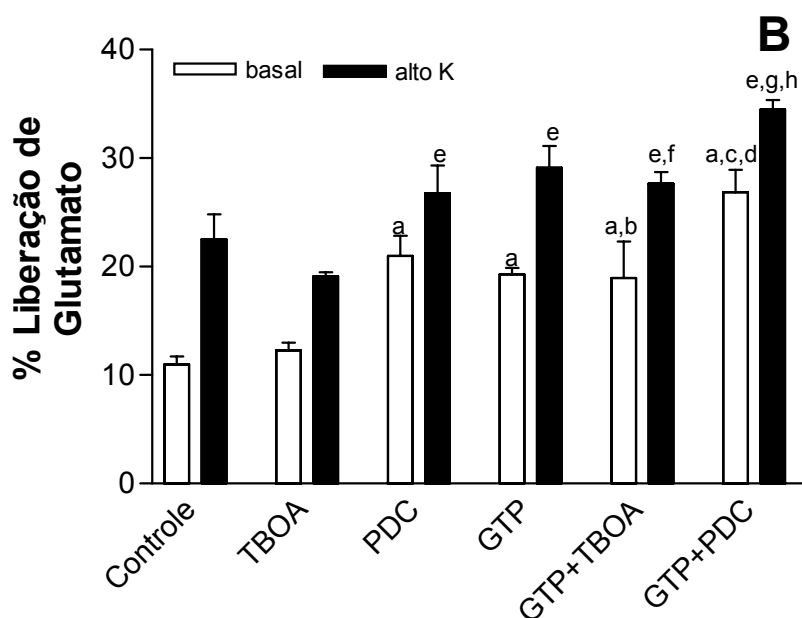


Figura 11. Efeito de DL-TBOA, t-PDC e GTP sobre a liberação sinaptossomal de L-[³H]glutamato. A liberação de glutamato está expressa como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[³H]glutamato. a = indica médias significativamente diferentes do grupo controle basal; b = indica média significativamente diferente de TBOA basal; c = indica média significativamente diferente de t-PDC basal; d = indica média significativamente diferente de GTP basal; e = indica média significativamente diferente de controle alto K; f = indica média significativamente diferente de TBOA alto K; g = indica média significativamente diferente de PDC alto K; h = indica média significativamente diferente de GTP alto K, n = 5.

4.7. Avaliação do efeito dos DG sobre a liberação de L-[³H]glutamato na presença de agonistas de receptores ionotrópicos de glutamato:

Os receptores glutamatérgicos também estão presentes no terminal pré-sináptico e podem modular a liberação de neurotransmissores. Para verificar a atividade dos receptores pré-sinápticos sobre o efeito dos DG, utilizamos os agonistas ionotrópicos NMDA e Cainato. A incubação dos sinaptossomas com NMDA 50 μ M não alterou a liberação de L-[³H]glutamato e não alterou o efeito estimulatório do GTP. Entretanto, o cainato 20 μ M promoveu um aumento significativo na liberação basal e apresentou um efeito aditivo quando GTP estava presente (Fig. 12).

4.8. Avaliação do efeito dos DG sobre a liberação de L-[³H]glutamato na presença de antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato:

Para avaliar o efeito da inibição da atividade de receptores ionotrópicos sobre o efeito estimulatório dos DG na liberação de L-[³H]glutamato, utilizamos o antagonista de receptor NMDA, MK-801 e o antagonista do receptor Cainato, GAMS.

MK-801 (20 μ M) aumentou a liberação basal de L-[³H]glutamato e apresentou efeito sinérgico sobre a liberação basal de glutamato na presença de GTP. Resultado similar foi obtido com GAMS (20 μ M), o qual sozinho promoveu aumento na liberação basal de L-[³H]glutamato e também teve efeito aditivo na presença de GTP 1mM (Fig. 13).

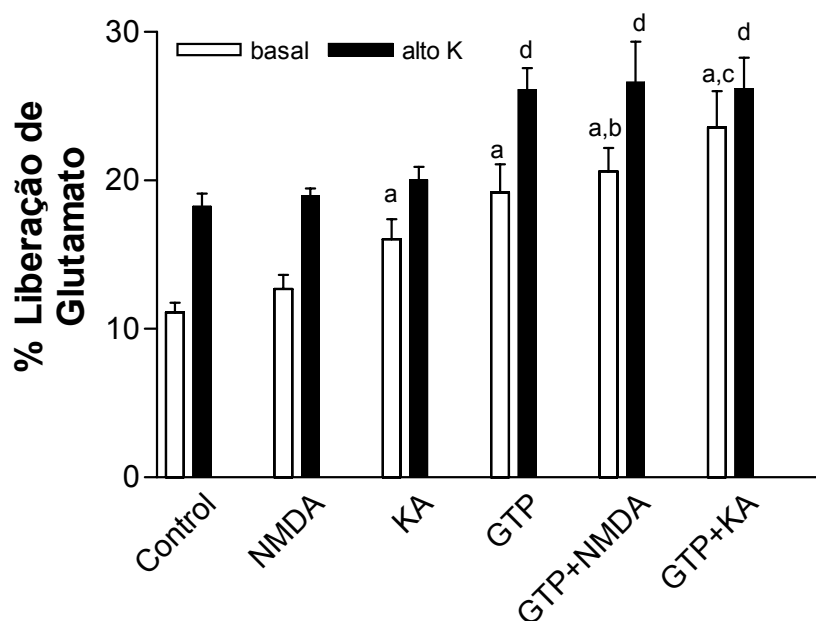


Figura 12. Liberação de L-[³H]glutamato na presença de agonistas de receptores glutamatérgicos e DG. NMDA, KA e GTP foram incubados nas concentrações de 50 μ M, 20 μ M e 1 mM, respectivamente. A liberação de glutamato está expressa como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[³H]glutamato captado. a = indica médias significativamente diferentes do grupo controle basal; b = indica média significativamente diferente de NMDA basal; c = indica média significativamente diferente de KA basal; d = indica médias significativamente diferentes de controle alto K, n = 5.

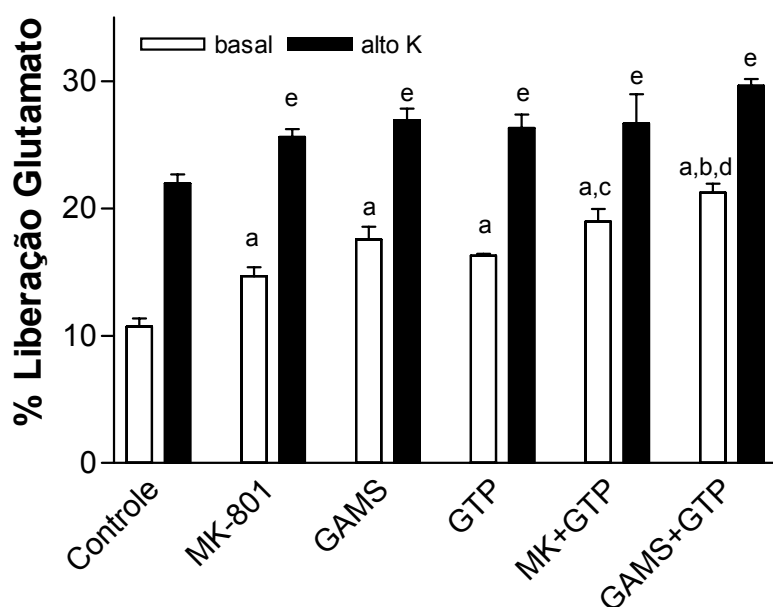


Figura 13. Liberação de L-[³H]glutamato na presença de antagonistas de receptores glutamatérgicos e DG. MK-801, GAMS foram incubados nas concentrações de 20 μ M, e GTP a 1 mM. A liberação de glutamato está expressa como a porcentagem de liberação em relação ao total de L-[³H]glutamato captado. a = indica médias significativamente diferentes do grupo controle basal; b = indica média significativamente diferente de GTP basal; c = indica média significativamente diferente de MK-801 basal; d = indica média significativamente diferente de GAMS basal; e = indica médias significativamente diferentes de controle alto K, n = 5.

Parte 2

4.9. Captação de nucleotídeos por vesículas sinápticas:

O conjunto de dados apresentados a seguir refere-se ao último objetivo do trabalho (7) que avalia a captação dos nucleotídeos da guanina em preparações de vesículas sinápticas de ratos. A captação de nucleotídeos da guanina foi realizada em condições de captação padrão, previamente descritas para outros neurotransmissores, como glutamato e ATP (Wolosker et al., 1996; Gualix et al., 1999; Tasca et al., 2004). Para distinguir a captação efetiva da captação inespecífica (união dos nucleotídeos na superfície da vesícula), as incubações devem ser realizadas em situações onde o transporte é desprezível, como: (i) incubações realizadas a 4° C, onde a atividade da H⁺-ATPase é consideravelmente reduzida; (ii) incubações realizadas na presença de Bafilomicina A₁, toxina que inibe a bomba de prótons H⁺-ATPase; (iii) incubações realizadas na ausência de ATP, substrato da H⁺-ATPase. Portanto, os valores de radioatividade presentes em incubações feitas nestas três situações serão considerados como união à membrana das vesículas sinápticas.

4.10. Avaliação da captação de [³H]GMP:

A avaliação do provável transporte de GMP em vesículas sinápticas mostrou semelhantes contagens de radioatividade em incubações realizadas na presença ou ausência de ATP. Os ensaios realizados a 4°C mostraram valores de radioatividade maiores que a 35°C e na presença de Bafilomicina A₁, as contagens foram reduzidas a valores próximos de zero (Fig. 14). Isto indica um provável perfil de união de GMP à superfície vesicular, ao invés do seu transporte específico.

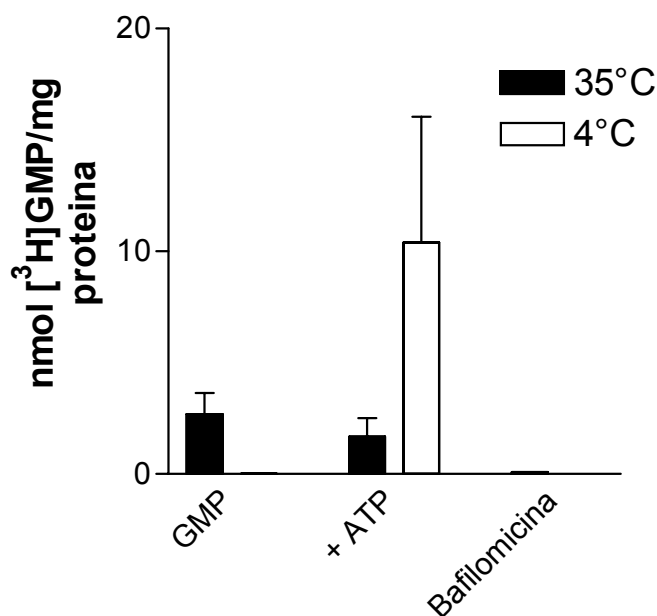


Figura 14. Avaliação do transporte de $[^3\text{H}]\text{GMP}$ em vesículas sinápticas. As vesículas sinápticas foram incubadas na presença de $[^3\text{H}]\text{GMP}$ com GMP 2 mM ou GMP 2mM mais ATP 2mM. Quando o efeito da Bafilomicina foi avaliado, as vesículas foram pré-incubadas por 10 minutos com 1 μM de Bafilomicina e a captação foi realizada na presença de GMP e ATP (2 mM) durante 30 min. As barras pretas representam incubações a 35° C (medida de transporte); barras brancas representam incubações a 4° C (medida de união), n = 6.

4.11. Avaliação da captação de [³H]GDP:

Resultados similares foram observados quando o transporte de [³H]GDP foi avaliado (Fig. 15). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre ensaios realizados a 35°C (ensaio de captação) ou 4°C (ensaio de união). Os valores das contagens também foram semelhantes na presença de Bafilomicina A₁, indicando que de maneira semelhante ao GMP, [³H]GDP, preferencialmente, une-se a vesícula ao invés de ser transportado para o lúmen vesicular.

4.12. Avaliação da captação de [³H]GppNHp:

Com o intuito de descartar a possível hidrólise de GTP por enzimas presentes na preparação vesicular, utilizamos o análogo não-hidrolizável [³H]GppNHp para avaliar a captação de GTP.

Em relação ao transporte de [³H]GppNHp em vesículas sinápticas, também observa-se um pequeno componente referente a união quando as vesículas foram incubadas a 4° C. Entretanto, GppNHp é captado em vesículas sinápticas na presença de substrato da H⁺-ATPase (ATP ou o próprio GTP) e tem seu transporte bloqueado por Bafilomicina A₁ (Fig. 16). Em um trabalho prévio, nós demonstramos que GTP pode ser usado de maneira alternativa pela H⁺-ATPase como fonte de energia (Tasca et al., 2004), desta forma, tanto GTP quanto ATP podem ser hidrolizados promovendo a indução do transportador. GTP e ATP podem competir pelo transportador vesicular, considerando que a captação de GTP diminui na presença de ATP.

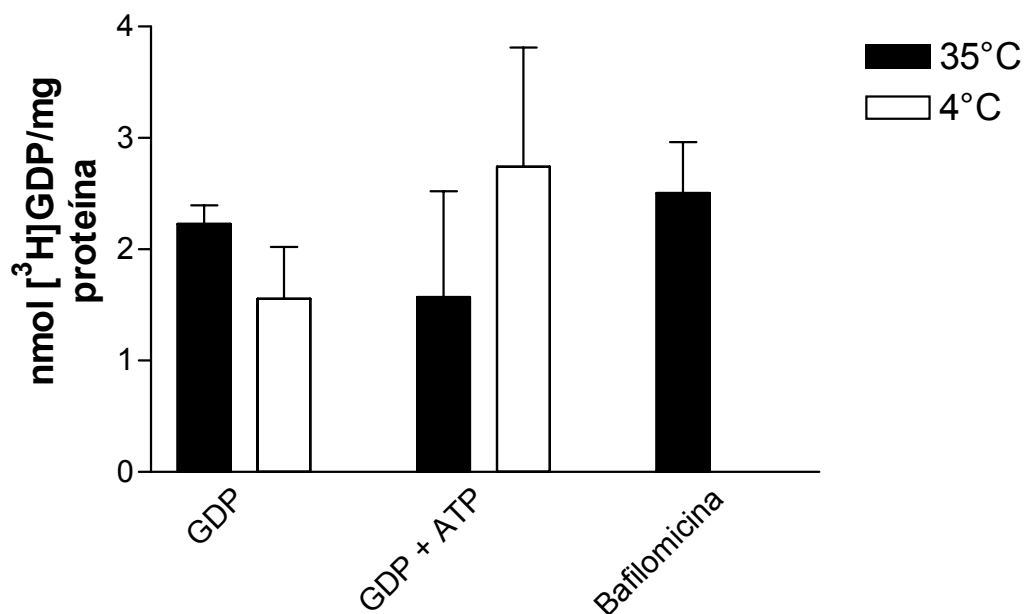


Figura 15. Avaliação do transporte de $[^3\text{H}]\text{GDP}$ em vesículas sinápticas. As vesículas sinápticas foram incubadas na presença de $[^3\text{H}]\text{GDP}$ com GDP 2 mM ou GDP 2mM mais ATP 2mM. Quando o efeito da Bafilomicina foi avaliado, as vesículas foram pré-incubadas por 10 minutos com 1 μM de Bafilomicina e a captação foi realizada na presença de GDP e ATP (2 mM) durante 30 min. Barras pretas representam incubações a 35° C (medida de transporte); barras brancas representam incubações a 4° C (medida de união), n = 6.

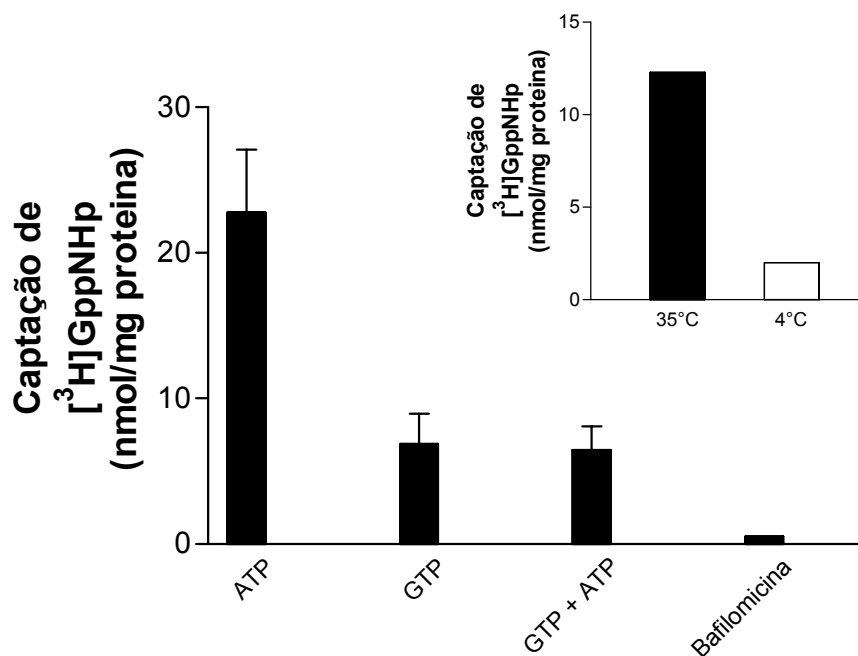


Figura. 16. Transporte de $[^3\text{H}]\text{GppNHp}$ em vesículas sinápticas. As vesículas sinápticas foram incubadas na presença de 3 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[^3\text{H}]\text{GppNHp}$ com GTP 2 mM ou GTP 2mM mais ATP 2mM. Quando o efeito da Bafilomicina foi avaliado, as vesículas foram pré-incubadas por 10 minutos com 1 μM de Bafilomicina e a captação foi realizada na presença de GDP e ATP (2 mM) durante 20 min. **Inset:** mostra a dependência da temperatura na captação de $[^3\text{H}]\text{GppNHp}$. Barras pretas representam incubações a 35° C (medida de transporte); barras brancas representam incubações a 4° C (medida de união), n = 6.

Estudos de saturação foram realizados com o intuito de caracterizar a captação vesicular de GTP. Uma cinética de tempo para a captação de [³H]GppNHp foi realizada de 10 a 60 minutos de incubação. A análise da curva mostrou que o transporte apresenta um perfil de saturação a partir de 20 minutos de incubação (Fig. 17). A avaliação da dependência da concentração de GTP na captação de [³H]GppNHp mostrou uma curva não-hiperbólica, com duas faixas de concentração apresentando saturação (Fig. 18). Esta curva atípica pode ser melhor interpretada quando separada em duas curvas independentes, com uma primeira e segunda cinética de saturação. A Tabela 1 representa os valores de K_M e V_{max} para cada curva.

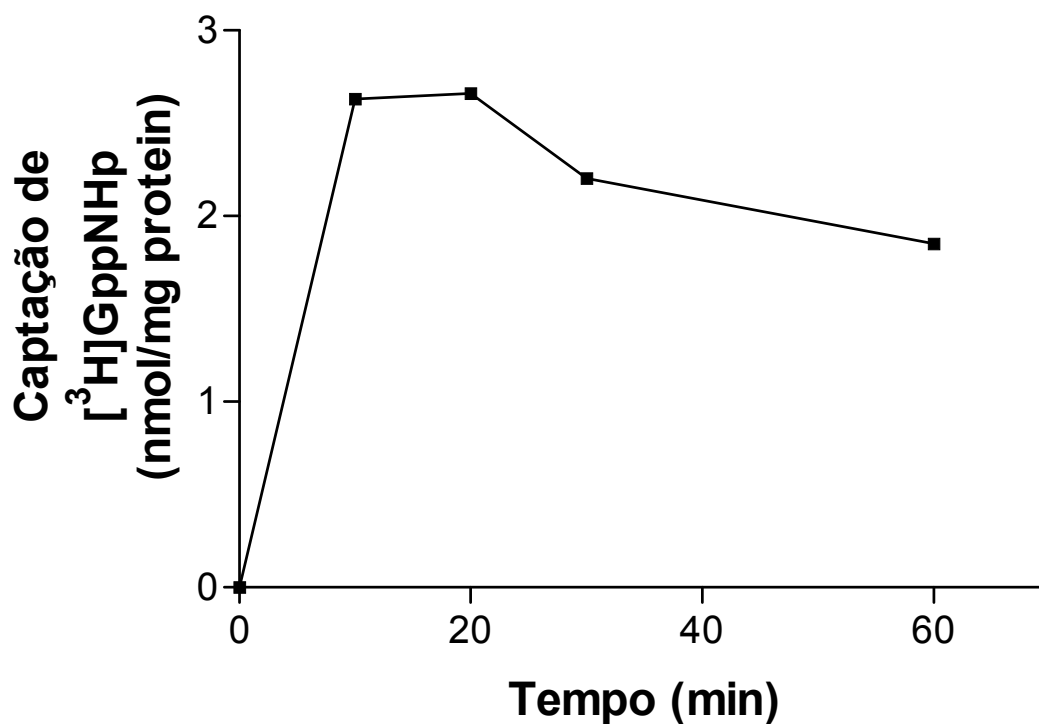


Figura 17. Dependência de tempo de incubação sobre a captação vesicular de $[^3\text{H}]\text{GppNHp}$. A incubação foi realizada em presença de GTP 2 mM, $[^3\text{H}]\text{GppNHp}$ 3 $\mu\text{Ci/ml}$ e sem ATP durante 10, 20, 30 e 60 minutos. A captação de GTP é corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de vesículas sinápticas. O gráfico mostra uma curva representativa de 4 experimentos individuais.

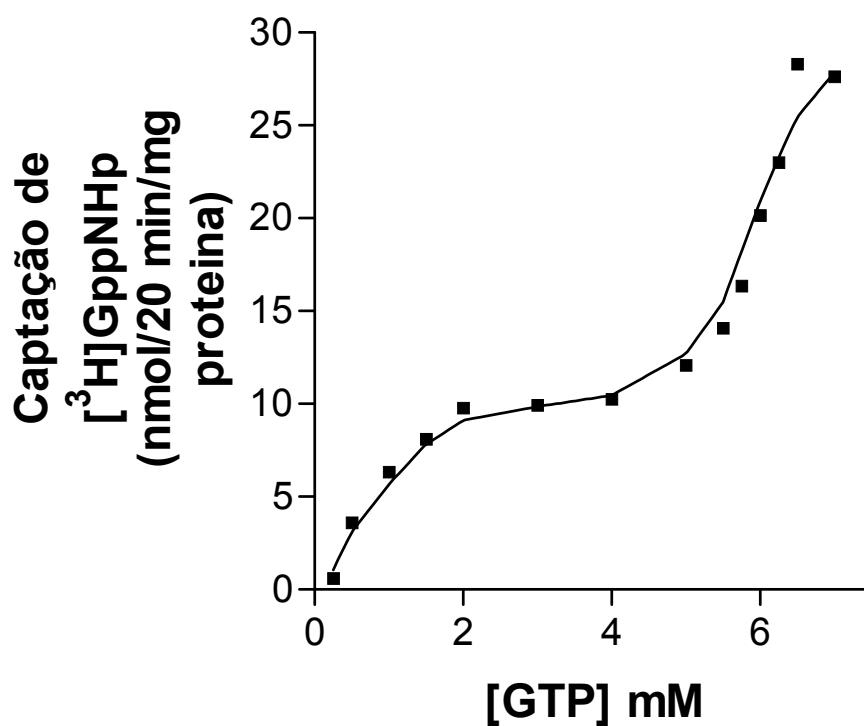


Figura 18. Dependência de concentração de GTP sobre a captação de $[^3\text{H}]\text{GppNHp}$ em vesículas sinápticas. As vesículas sinápticas foram incubadas na presença de $3 \mu\text{Ci/ml}$ de $[^3\text{H}]\text{GppNHp}$ com concentrações crescentes de GTP, de $0,25$ a $7,0 \text{ mM}$ a 35°C por 20 minutos. Gráfico mostra uma curva de saturação representativa de 5 experimentos individuais.

Tabela 1. Valores de V_{max} e K_M para a captação de [³H]GppNHp em vesículas sinápticas.

	Captação de GppNHp	
	1º Saturação	2º Saturação
V_{max} (nmol/mg proteína/20 min.)	9,78 ± 2,73	28,03 ± 3,36
K_M (mM)	1,1 ± 0,06	5,71 ± 0,19

Os dados representam média ± erro padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas.

4.13. Avaliação da influência de glutamato e GMP sobre a captação de GTP:

A captação de [³H]GppNHp foi realizada na presença de concentrações crescentes de GMP e glutamato (Tabela 2). O efeito do GMP sobre a captação de [³H]GppNHp foi avaliado com o intuito de verificar a seletividade para nucleotídeos da guanina do transportador vesicular de GTP. Considerando o trabalho prévio realizado por nós que demonstra a modulação do transporte vesicular de glutamato pelos DG (Tasca et al., 2004), procuramos demonstrar se a recíproca ocorre para o transporte de [³H]GppNHp. Concentrações intracelulares e fisiológicas de GMP e glutamato não alteram a captação de GppNHp.

Tabela 2. Efeito do Glutamato e GMP sobre a captação de [³H]GppNHp em Vesículas Sinápticas.

	Captação de GppNHp					
		mM				
Controle	2,51 ± 0,63	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0
Glutamato		2,24 ± 0,55	1,33 ± 0,52	2,51 ± 0,85	3,13 ± 1,49	3,60 ± 1,03
GMP		n.d.	n.d.	3,03 ± 1,37	6,06 ± 1,87	3,12 ± 1,41

Os valores estão expressos em nmol/mg proteína/20 min e representam média ± erro padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. n. d. = não determinado.

5. DISCUSSÃO

Os Derivados da Guanina promovem um aumento na liberação sinaptossomal de glutamato em condições basais ou despolarizantes sem afetar a captação de glutamato por sinaptossomas. Em estudo prévio, demonstramos que os DG inibem a captação de glutamato em vesículas sinápticas de maneira dependente de tempo e concentração (Tasca et al., 2004). Adicionalmente, já foi demonstrado que a guanosina aumenta a captação de glutamato em culturas de astrócitos (Frizzo, 2001). Este efeito da GUO parece ocorrer via transportadores de glutamato e não envolve os receptores de adenosina. Isto indicaria um papel regulatório e específico para a guanosina sobre os níveis extracelulares de glutamato, possivelmente protegendo células neurais contra a excitotoxicidade induzida por este neurotransmissor. Diferentemente do observado em astrócitos, não observamos efeito modulatório da GUO e de outros DG, como GMP e GTP, sobre a captação de L-[³H]glutamato (Fig. 2).

O efeito promovido pelos DG de aumentar a liberação de glutamato (Figs. 3, 4 e 5), foi antagônico aos estudos prévios que demonstram que os DG apresentam um efeito inibitório sobre a neurotransmissão glutamatérgica (Souza & Ramírez, 1991; Tasca et al, 1998, 1999, 2004). E ainda, o efeito dos nucleotídeos não parece ser dependente da formação de guanosina, pois o análogo não-hidrolizável do GTP, GppNHp, também estimulou a liberação de glutamato (Fig. 6). Fato esse que não foi demonstrado em outros trabalhos, onde o efeito dos nucleotídeos é revertido pela administração de inibidores de ectonucleotidases (Frizzo et al., 2003; Soares et al., 2004).

O mecanismo proposto para a estimulação da transmissão glutamatérgica induzida pelos DG envolve a modulação de receptores glutamatérgicos pré-sinápticos e de transportadores de glutamato. A presença de íons cálcio é essencial para a transmissão sináptica normal (Lin & Scheller, 2000). Quando cálcio é retirado do meio, o efeito dos DG

diminui consideravelmente e somente com a concentração de 1 mM foi possível observar o efeito de GUO e GTP sobre a liberação basal de glutamato. Isto sugere que na presença de cálcio os DG podem modular tanto a liberação citosólica quanto a vesicular, na ausência de cálcio, GUO e GTP podem ainda mobilizar o “pool” citosólico, sem alterar a liberação vesicular. Isto indica que existe uma dependência parcial de cálcio para a interação dos DG com a maquinaria de liberação de glutamato (Fig. 7).

Com o intuito de separar a liberação citosólica da vesicular (correspondente a estimulada por despolarização na presença de alta concentração de KCl), utilizamos a Bafilomicina A1, inibidor da H^+ -ATPase vesicular. Foi demonstrado que a Bafilomicina A1, por inibir a ATPase, depleta as vesículas sinápticas de seu conteúdo de neurotransmissor, diminuindo portanto a liberação vesicular de glutamato (Cousin & Robinson, 1998). Em nosso estudo, a aplicação de Bafilomicina reduziu a liberação induzida por potássio e aumentou a basal a ponto de torná-las iguais. O aumento da liberação basal deve ser devido à inibição da atividade da H^+ -ATPase, que impede a manutenção do gradiente próton-eletroquímico e o glutamato que estava concentrado no interior da vesícula difunde a favor de seu gradiente para o citosol e, por conseqüência, a liberação basal aumenta em detrimento da liberação vesicular (Fig. 8). A presença dos DG potencializou o efeito da toxina, ou seja, mesmo diminuindo o conteúdo vesicular de glutamato, os DG podem mobilizar com maior amplitude o glutamato presente no citosol, reforçando a idéia da participação dos transportadores de glutamato no aumento de liberação induzida por DG.

Além de sua função fisiológica, os transportadores de glutamato também podem contribuir para a liberação neurotóxica de glutamato pela atividade inversa (do citosol para fora), por um processo independente de cálcio conhecido como transporte reverso (Raiteri et al., 2002). Esta liberação mediada pelo transportador é geralmente observada em condições patológicas, como a isquemia (Phillis et al., 2000). O envolvimento do transporte reverso no

aumento da liberação de glutamato foi investigado através da utilização do aminoácido L-aspartato. Considerando que o L-aspartato também é substrato do transportador, ele pode de maneira competitiva, inibir a captação de glutamato. Como o transportador funciona nos dois sentidos, quando o aspartato é captado durante o ensaio de liberação, o transportador troca o glutamato intracelular pelo aspartato do meio, aumentando a concentração de glutamato no meio extracelular (Anderson et al., 2001). L-aspartato, como esperado, induziu liberação de glutamato e os DG tiveram efeito similar. Entretanto, como não existem evidências de que os DG possam ser co-transportados pelo mesmo transportador de glutamato, esta questão ainda deve ser investigada.

Considerando que o L-aspartato pode também ativar receptores NMDA, podendo levar a um efeito secundário independente da atividade do transportador, e para melhor demonstrar o efeito estimulatório dos DG sobre o transporte reverso, foram utilizados os inibidores seletivos da captação de glutamato, DL-TBOA e t-PDC. A captação de glutamato na presença dos inibidores foi inicialmente avaliada. Diversos estudos já determinaram os valores de IC_{50} para estes inibidores em diferentes tipos celulares, porém com valores destoantes. A caracterização inicial de DL-TBOA foi realizada em células COS-1 transfectadas com cDNA de EAAT- 1 e 2, os valores de IC_{50} foram de $67 \pm 7,5 \mu\text{M}$ para EAAT-1 e $5,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$ para EAAT-2. Para t-PDC foram encontrados IC_{50} de $65 \pm 7,1 \mu\text{M}$ para EAAT-1 e $14 \pm 6,8 \mu\text{M}$ para EAAT-2 (Shimamoto et al., 1998). Em culturas primárias de astrócitos, os valores de IC_{50} observados foram distintos, com $40,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$ e $74,1 \pm 15 \mu\text{M}$ para DL-TBOA e t-PDC, respectivamente. Em culturas de neurônios granulares, DL-TBOA apresentou IC_{50} de $6,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$ (Waagepetersen et al., 2001; Jabaudon et al., 1999). A diferença entre os valores encontrados na literatura mostra que a manipulação farmacológica destes transportadores envolve não somente diferenças de atividade, mas também do tipo celular e da preparação neural em que a atividade é analisada. Em

sinaptossomas os valores foram ainda menores, $0,525 \pm 0,05 \mu\text{M}$ e $2,568 \pm 0,15 \mu\text{M}$ para DL-TBOA e t-PDC, respectivamente (Fig. 10). Consistente com trabalhos anteriores, DL-TBOA foi mais potente em inibir a captação de glutamato (Anderson et al., 2001; Waagepetersen et al., 2001).

DL-TBOA não alterou a liberação sinaptossomal de glutamato (Fig. 11). De maneira semelhante, já foi demonstrado que DL-TBOA não promove transporte reverso em neurônios, e somente exposições deste inibidor a astrócitos por períodos mais longos levam a um aumento nos níveis de glutamato extracelular (Anderson et al., 2001). Também já foi demonstrado que DL-TBOA inibe o efluxo de glutamato através da redução transporte reverso durante a isquemia cerebral (Phillis et al., 2000). O mecanismo pelo qual DL-TBOA interage com o transportador diminuindo o transporte reverso ainda está sob investigação, mas é provável que este inibidor bloqueie o sítio de união do transportador na porção extracelular da membrana plasmática e reduza a taxa de saída do substrato citosólico (glutamato) (Koch, 1999). Neste estudo, DL-TBOA não alterou o aumento na liberação de glutamato induzido por GTP (Fig. 11).

Diferente do observado com DL-TBOA, o inibidor transportável t-PDC aumentou a liberação de glutamato e este efeito foi aumentado de maneira sinérgica por GTP (1mM) (Fig. 11). Estudos eletrofisiológicos já demonstraram que t-PDC aumenta a atividade neuronal no hipocampo, o que está relacionado com o aumento dos níveis de glutamato extracelular promovido por t-PDC (Ohta et al., 2002). No caso deste inibidor, o mecanismo de ação é diferente do DL-TBOA, uma vez que t-PDC pode funcionar como substrato para o transportador. Neste caso, o substrato transportável é acumulado dentro da célula, uma vez que não é metabolizável e isto leva a diminuição da entrada de um segundo substrato, devido à redução do número de transportadores disponíveis na superfície da membrana. Este mecanismo é também chamado de trans-inibição e já foi demonstrado em outros sistemas

como o transporte de aminoácidos em hepatócitos, transporte de tri-iodotironina em eritrócitos e o carreador lactato/ H^+ em células musculares (Debernardi et al., 1999).

Os inibidores da captação de glutamato foram utilizados com o intuito de investigar a participação dos transportadores no mecanismo de ação dos DG sobre a liberação de glutamato. Os dados apresentados, entretanto, sugerem que os DG possam estar atuando simultaneamente em outros sítios no terminal sináptico, além dos transportadores, como os receptores pré-sinápticos. Ou, alternativamente, os sítios de interação dos DG e dos inibidores nos transportadores de glutamato podem ser diferentes, desta forma os DG modulariam alostericamente o transporte de glutamato. É importante ressaltar que apesar da estrutura do transportador de glutamato ter sido recentemente descrita (Yernool et al., 2004), ainda são poucas as informações a respeito da localização dos sítios de união de substratos e mecanismo molecular de acoplamento entre íons e substrato e, mais importante, as mudanças conformacionais que acompanham cada etapa do transporte ainda precisam ser estabelecidas (Kavanaugh, 2004).

A participação de autoreceptores na liberação de glutamato estimulada por DG também foi avaliada (Fig. 12). No que concerne à ação de autoreceptores ionotrópicos na liberação de glutamato, estudos prévios não estão em completo acordo (Perkington & Sihra, 1999). NMDA pré-sináptico estimula a liberação de glutamato e aspartato em fatias hipocámpais por um mecanismo insensível a tetrodoxina, descartando o envolvimento de canais de sódio (Connick et al., 1988). NMDA também aumenta a liberação de glutamato em sinaptossomas de hipocampo e de cérebro anterior (Breukel et al., 1998; Tavares et al., 2002). Em contraste com estes estudos, neste trabalho NMDA não alterou a liberação de glutamato, possivelmente devido a presença de magnésio no meio de incubação, o que normalmente inibe o receptor NMDA (Breukel et al., 1998). Entretanto, quando a atividade

deste receptor é bloqueada por seu antagonista MK-801, ocorre um aumento na liberação basal de glutamato e que é aumentada por GTP de maneira sinérgica (Fig. 12).

Em relação aos autoreceptores não-NMDA, muitos trabalhos demonstraram uma ação estimulatória de cainato, AMPA e domoato sobre a liberação basal ou despolarizada (Perkington & Sihra, 1999; McDermott et al., 1999; Pittaluga et al., 1997). Entretanto, também foi demonstrado que cainato nem induziu como também não modulou a liberação de glutamato induzida por alto potássio em sinaptossomas hipocampais (Zhou et al., 1995). Em contraste, Chittajallu et al. (1996) mostrou que cainato inibiu a liberação de glutamato induzida por alto potássio. Neste trabalho, foi visto que mesmo ativando receptores cainato com seu agonista ou inativando com GAMS, ocorre um aumento na liberação de glutamato o que também é incrementada por GTP (Fig. 13).

Estudos anteriores têm demonstrado que os DG desempenham um papel como antagonistas de receptores glutamatérgicos (Souza & Ramírez, 1991; Paz et al., 1994; Dev et al., 1996; Paas et al., 1996). Neste estudo, observamos que os DG modulam positivamente a liberação de glutamato por um mecanismo envolvendo receptores glutamatérgicos pré-sinápticos e transportadores de glutamato, contrastando com o papel emergente dos DG como moléculas neuroprotetoras. Entretanto, diversos efeitos têm sido atribuídos aos DG, como a indução de efeitos tróficos (Rathbone et al., 1999, Francisco et al., 2004), indução de apoptose (Molz, 2003), e inclusive a indução de toxicidade celular (Regner et al., 1998). Além disto, Morciano e colaboradores (2004) não observaram efeito neuroprotetor da guanosina em modelos de neurotoxicidade induzida por NMDA e cainato.

Comparando os efeitos dos DG com compostos semelhantes como os derivados da adenina, uma classe de neurotransmissores já bem caracterizada e que também podem desencadear eventos tóxicos ou de proteção celular (Volonte et al., 2003; Di Iorio et al., 2002), não é surpreendente que os DG apresentem efeitos tão diversos. Não podemos

descartar um eventual efeito neurotóxico do GTP, entretanto, em nossas condições experimentais não houve extravasamento de LDH dos sinaptossomas, um marcador de integridade de membrana.

O efeito estimulatório dos DG sobre a transmissão glutamatérgica pode ter um significado biológico, considerando o papel crucial do glutamato na plasticidade neural como a potenciação de longa duração (LTP), que necessita de uma temporária e não-tóxica elevação dos níveis de glutamato extracelular (Malenka & Bear, 2004). E ainda, considerando a ação estimulatória da guanosina sobre a captação astrocitária de glutamato (Frizzo et al., 2001), a ação inibitória dos DG sobre o armazenamento vesicular de glutamato (Tasca et al., 2004) e a indução pelos DG do efluxo de glutamato de terminais pré-sinápticos, os DG poderiam agir como estimuladores do “turnover” de glutamato, potencializando a transmissão glutamatérgica.

Neste estudo, também foi demonstrado que [³H]GppNHp (um análogo não-hidrolizável do GTP) pode ser captado por vesículas sinápticas de cérebro de ratos, enquanto [³H]GDP e [³H]GMP somente se unem a componentes vesiculares (Fig. 14 e 15). Muitas observações dão suporte à conclusão de que GTP é armazenado em vesículas sinápticas por um processo mediado por transportador: (i) o acúmulo de [³H]GppNHp no compartimento vesicular é sensível à temperatura e à Bafilomicina A₁ (Fig. 16); (ii) o acúmulo de [³H]GppNHp apresenta uma cinética de tempo compatível com a captação vesicular (Fig. 17); (iii) o armazenamento vesicular é saturável (Fig. 18), mostrando uma afinidade similar à descrita para ATP (Gualix et al., 1999).

A presença de ATP e GTP em vesículas no órgão elétrico de *Torpedo marmorata* já foi descrita (Wagner et al., 1978). Em grânulos de células cromafins, já foi mostrado que GTP pode ser armazenado (Weber & Winckler, 1981; Bankston & Guidotti, 1996). A captação e armazenamento de GTP em vesículas sinápticas está sendo demonstrada neste

estudo. A curva de saturação obtida para a captação de GTP mostrou uma complexa cinética. Um perfil de saturação muito similar foi encontrado no transporte de ATP em grânulos cromafins (Gualix et al., 1996) e vesículas sinápticas (Gualix et al., 1999). GTP diminuiu a captação de [³H]GppNHp evocada por ATP (Fig.16) em uma aparente interação competitiva. Serão necessários maiores estudos para demonstrar se GTP e ATP são captados pelo mesmo transportador ou por diferentes transportadores de nucleotídeos.

A avaliação do transporte de nucleotídeos em grânulos secretórios de células cromafins mostrou uma inespecificidade para nucleotídeos, sendo ATP, ADP, AMP, GTP ou UTP captados por grânulos intactos (Weber and Winkler, 1981) ou fragmentos de grânulos (Bankston and Guidotti, 1996). Enquanto GTP e ATP competem pelo transportador de nucleotídeos, a captação de [³H]GppNHp não é alterada por GMP e glutamato (Tabela 2), demonstrando que GTP pode ser captado seletivamente por um transportador de nucleotídeos.

Os resultados observados com [³H]GDP ou [³H]GMP não descartam completamente a provável captação destes nucleotídeos, no entanto, a avaliação da dependência da temperatura em seu transporte sugere que eles estariam principalmente unindo-se em componentes vesiculares. Estes nucleotídeos da guanina poderiam unir-se à H⁺-ATPase vesicular, a proteínas-G associadas à membrana vesicular (Pahner et al., 2003), ou a ectonucleotidases associadas às vesículas sinápticas (James and Richardson, 1993).

GTP é captado e armazenado em vesículas sinápticas, o que reforça a importância dos Derivados da Guanina como neurotransmissores. A liberação de GTP na fenda sináptica pode levar à formação de guanosina através da atividade de ectonucleotidases, a qual poderia exercer seus efeitos em sítios específicos. A clonagem de receptores específicos e a identificação de um sistema de término da resposta (metabolização ou transporte) podem trazer maiores entendimentos para o papel da transmissão purinérgica da guanina nas funções cerebrais.

6. CONCLUSÕES

- GUO (guanosina), GMP (guanosina-5'-monofosfato) e GTP (guanosina-5'-trifosfato) não alteram a captação sinaptossomal de L-[³H]glutamato por seus carreadores de membrana;
- GUO, GMP, GTP e GppNHp aumentam a liberação citosólica (transporte reverso) de L-[³H]glutamato e a liberação induzida por despolarização das membranas sinaptossomais;
- A ausência de íons cálcio diminui a estimulação da liberação basal de L-[³H]glutamato promovida por GUO e GTP;
- Na presença de Bafilomicina A1, os derivados da guanina promovem a liberação do “pool” citosólico de L-[³H]glutamato,;
- GMP e GppNHp promovem um aumento na liberação de L-[³H]glutamato, similar ao observado com L-aspartato, o qual induz o transporte reverso de glutamato.
- DL-TBOA não induziu liberação de glutamato e não interferiu no efeito de GTP em aumentar a liberação de glutamato;
- t-PDC promoveu aumento na liberação de glutamato e seu efeito foi sinergicamente aumentado por GTP;

- NMDA não alterou a liberação de glutamato, nem alterou o efeito de GTP, porém quando seu antagonista MK-801 foi avaliado, houve aumento da liberação de glutamato e GTP aumentou a liberação;
- O agonista e o antagonista de receptor Cainato aumentaram a liberação de glutamato e GTP também contribui no aumento de liberação;
- Estes dados sugerem que os DG podem modular a liberação de glutamato por uma ação em receptores pré-sinápticos e transportadores de glutamato;
- O nucleotídeo da guanina, GTP, é captado por vesículas sinápticas de maneira semelhante a outros neurotransmissores.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito dos DG sobre o conteúdo de glutamato vesicular intrassinaptossomal;
- Avaliar o efeito de agonistas e antagonistas de receptores pré-sinápticos metabotrópicos;
- Avaliar o efeito da aplicação simultânea de cainato e t-PDC sobre e a indução de liberação de glutamato por DG.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1–14, 2000.
- ANDERSON, C. M.; BRIDGES, R. J.; CHAMBERLIN, A. R.; SHIMAMOTO, K.; YASUDA-KAMATAMI, Y.; SWANSON, R. A. Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J. Neurochem.* 79: 1207-1216, 2001.
- BANKSTON, L.; GUIDOTTI, G. Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J. Biol. Chem.* 271: 17132-17138, 1996.
- BARDONI, R.; TORSNEY, C.; TONG, C. K.; PRANDINI, M.; MACDERMOTT, A. Presynaptic NMDA receptors modulate glutamate release from primary sensory neurons in rat spinal cord dorsal horn. *J. Neurosci.* 24:2774–2781, 2004.
- BARNES, J. M.; HENLEY, J. M.; Modulation of [³H]Glutamate release from rat hippocampal synaptosomes by kainate. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 155S, 1994.
- BELHAGE, B.; HANSE, J. H.; SCHOUSBOE, A. Depolarization by K⁺ and glutamate activates different neurotransmitter release mechanisms in GABAergic neurons: vesicular versus non-vesicular release of GABA. *Neuroscience* 54: 1019-1034, 1996.
- BELLOCCHIO, E.; REIMER, R. J.; FREMEAU Jr., R. T.; EDWARDS, R. H. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science.* 289: 957-960, 2000.
- BOCKAERT, J. G proteins and G-protein-coupled receptors: structure, function and interactions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1: 32-42, 1991.
- BREUKEL, A. I. M.; BESSELSSEN, E.; LOPES DA SILVA, F. H.; GHIJSEN, W. E. J. M. A presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptor in rat hippocampus modulating amino acid release from a cytoplasmic pool. *E. J. Neurosci.* 10: 106-114, 1998.
- BRIDGES, R. J.; KAVANAUGH, M. P.; CHAMBERLIN, A. R. A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity, sodium-dependent glutamate transport in central nervous system. *Curr. Pharmaceut. Des.* 5:363-379, 1999.
- CASADOS, M.; BENDAHAN, A.; ZAFRA, F.; DANBOLT, N. C.; ARAGON, C.; GIMENEZ, C.; KANNER, B. I. Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 268: 27313-27317, 1993.
- CHATTON, J. Y.; SHIMAMOTO, K.; MAGISTRETTI, P. J. Effects of glial glutamate transporter inhibitors on intracellular Na in mouse astrocytes. *Brain Res.* 893: 46-52, 2001.

- CHITTAJALLU, R.; VIGNES, M.; DEV, K.K.; BARNES, J.M.; COLLINGRIDGE, G.L.; HENLEY, J.M. Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* 379: 78–81, 1996.
- CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; GIULIANI, P.; D'ALIMONTE, I.; BALLERINI, P.; CACIAGLI, F.; RATHBONE, M. P. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia* 25: 93-98, 1999.
- CICCARELLI, R.; BALLERINI, P.; SABATINO, G.; RATHBONE, M. P.; D'ONOFRIO, M.; CACIAGLI, F.; DI IORIO, P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Devl. Neurosci.* 19: 395-414, 2001.
- COHEN-CORY, S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* 298: 770-776, 2002.
- CONNICK, J. H.; STONE, T. W. Excitatory amino acid antagonists and endogenous aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. *Br. J. Pharmacol.* 93 863-867, 1988.
- COSSART, R.; TYZIO, R.; DINOCOURT, C.; ESCLAPEZ, M.; HIRSCH, J.C.; BEN-ARI, Y.; BERNARD, C. Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. *Neuron*. 29:497-508, 2001.
- COUSIN, M.A.; ROBINSON, P. J. Ba²⁺ does not support synaptic vesicle retrieval in rat cerebrocortical synaptosomes. *Neurosci Lett.* 253: 1-4, 1998.
- CUNHA, R.A.; MALVA, J.O.; RIBEIRO, J.A. Pertussis toxin prevents presynaptic inhibition by kainate receptors of rat hippocampal [³H]GABA release. *FEBS Lett.* 469:159-162, 2000.
- DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65: 1-105, 2001.
- DEBERNARDI, R.; MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L. Trans-inhibition of glutamate transport prevents excitatory amino acid-induced glycolysis in astrocytes. *Brain Res.* 850: 39–46, 1999.
- DEV, K.H.; ROBERTS, P.J.; HENLEY, J.M. Characterisation of the interaction between guanyl nucleotides and AMPA receptors in rat brain. *Neuropharmacol.* 35: 1583-1593, 1996.
- DI IORIO, P.; BALLERINI, P.; CACIAGLI, F.; CICCARELLI, R. Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. *Pharmacol. Res.* 37: 169-178, 1998.
- DI IORIO, P.; KLEYWEGT, S.; CICCARELLI, R.; TRAVERSA, U.; ANDREW, C.M.; CROCKER, C.E.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleosides in astrocytes. *Glia* 38:179-90, 2002.

- DI IORIO, P.; BALLERINI, P.; TRAVERSA, U.; NICOLETTI, F.; D'ALIMONTE, I.; KLEYWEGT, S.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P.; CACIAGLI, F.; CICCARELLI, R. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia* 46:356-68, 2004.
- DUGUID, I.C.; SMART, T.G. Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances GABA release at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *Nat. Neurosci.* 7:525-533, 2004.
- DUNKLEY, P. R.; HEATH, J. W.; HARRISON, S. M.; JARVIE, P. E.; GLENFIELD, P. J.; ROSTAS, J. A. P. A rapid percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res.* 441: 59-71, 1988.
- EXTON, J. H. Small GTPases minireview series. *J. Bio. Chem.* 273: 19923, 1998.
- FONNUM, F., LUND-KARLSEN, R., MALTHE-SORENSEN, D., STERRI, S., WALAAS, I. High affinity transport systems and their role in transmitter action. In: *The Cell Surface and Neuronal Function.* (Cotman, C. W., Poste, G., Nicholson, G. L. eds.) 455-504. Elsevier, Amsterdam, 1980.
- FRANCISCO, S. R. S. Estudo dos derivados da guanina como agentes protetores e tróficos em astrócitos e neurônios cerebelares. Florianópolis, 2004.
- FRERKING, M.; SCHMITZ, D.; ZHOU, Q.; JOHANSEN, J.; NICOLL, R.A. Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3/CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J. Neurosci.* 21:2958-66, 2001.
- FRIZZO, M. E. S.; LARA, D. R.; DAHM, K. C.; PROKOPIUK, A. S.; SWANSON, R. A.; SOUZA, D. O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocytes cultures. *NeuroReport* 12, 879-881, 2001.
- FRIZZO, M.E.; LARA, D.R.; PROKOPIUK, A.D.E., VARGAS, C.R.; SALBEGO, C.G.; WAJNER, M.; SOUZA, D.O. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell Mol. Neurobiol.* 22:353-63, 2002.
- FRIZZO, M.E.; ANTUNES SOARES, F.A.; DALL'ONDER, L.P.; LARA, D.R.; SWANSON, R.A.; SOUZA, D.O. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Res.* 972:84-89, 2003.
- FYKSE, E. M. & FONNUM F. Uptake of γ -Aminobutyric acid by a synaptic vesicle fraction isolated from rat brain. *J. Neurochem.* 50: 1237-1242, 1988.
- GAMMELSAETER, R.; FROYLAND, M.; ARAGON, C.; DANBOLT, N. C.; FORTIN, D.; STORM-MATHISEN, J.; DAVANGER, S.; GUNDERSEN, V. Glycine, GABA and their transporters in pancreatic islets of Langerhans: evidence for a paracrine transmitter interplay. *J. Cell Sci.* 117: 3749-3758, 2004
- GASIC, G. P.; & HOLLMAN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 507-536, 1994.

- GODA, Y. SNAREs and regulated vesicle exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:769-72, 1997.
- GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294: 1024-1030, 2001.
- GRUNINGER, H.A.; APPS, D.K.; PHILLIPS, J.H. Adenine nucleotide and phosphoenolpyruvate transport by bovine chromaffin granule "ghosts". *Neuroscience* 9: 917-924, 1983.
- GUALIX, J.; PINTOR, J.; MIRAS-PORTUGAL, M. T. Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 73: 1098-1104, 1999.
- GUALIX, J.; ABAL, M.; PINTOR, J.; GARCIA-CARMONA, F.; MIRAS-PORTUGAL, M.T. Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *J. Biol. Chem.* 271: 1957-1965, 1996.
- HERZOG, E.; BELLENCHI, G. C.; GRAS, C.; BERNARD, V.; RAVASSARD, P.; BEDET, C.; GASNIER, B.; GIROS, B.; EL MESTIKAWY, S. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J. Neurosci.* 21: 1-6, 2001.
- HERZOG, E.; GILCHRIST, J.; GRAS, C.; MUZERELLE, A.; RAVASSARD, P.; GIROS, B.; GASPAR, P.; EL MESTIKAWY, S. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain *Neuroscience* 123: 983–1002, 2004.
- JABAUDON, D.; SHIMAMOTO, K.; YASUDA-KAMATANI, Y.; SCANZIANI, M.; GAHWILER, B.H.; GERBER, U. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 8733-8738, 1999.
- JAHN, R.; LANG, T.; SUDHOF, T. C. Membrane Fusion. *Cell* 112:519–533, 2003.
- JAMES, S.; RICHARDSON, P. J. Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J. Neurochem.* 60: 219-227, 1993.
- JANE, D. E.; SAKAITANI, M.; SHIMADA, S.; TOKYAMA, M. Agonists and competitive antagonists: structure-activity and molecular modelling studies. In: *The NMDA receptor* (Collingridge, G. L. & Watkis, J. C. eds) pp31-104. Oxford University Press, Oxford, 1994.
- JIANG, S.; KHAN, M.I.; LU, Y.; WANG, J.; BUTTIGIEG, J.; WERSTIUK, E.S.; CICCARELLI, R.; CACIAGLI, F.; RATHBONE, M.P. Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. *Neuroreport* 14:2463-2467, 2003.

- JOHNSON, R.G. Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol. Rev.* 68:232-307, 1988.
- KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.; JESSEL, T. *Principles of neural science.* Elsevier, 1991.
- KANEKO, T. & FUJIYAMA, F. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci. Res.* 42: 234-250, 2002.
- KAVANAUGH, M. P. Accessing a transporter structure. *Nature* 431: 752-753, 2004.
- KOCH, H. P.; CHAMBERLIN, A. R.; BRIDGES, R. J. Nontransportable inhibitors attenuate reversal of glutamate uptake in synaptosomes following a metabolic insult. *Mol. Pharmacol.* 55:1044–1048, 1999.
- KRANTZ, D. E.; CHAUDHRY F. A.; EDWARDS, R. Neurotransmitters transporters. In: *Neurotransmitter Release, H.* Oxford University Press. pp: 145-207, 1999
- KREBS, M.O.; DESCE, J.M.; KEMEL, M.L.; GAUCHY, C.; GODEHEU, G.; CHERAMY, A.; GLOWINSKI, J. Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals. *J. Neurochem.* 56:81–85, 1991.
- KULLMANN, D. M. Minireview Presynaptic Kainate Receptors in the Hippocampus: Slowly Emerging from Obscurity. *Neuron* 32: 561–564, 2001.
- LARA, D. R.; SCHMIDT, A. P.; FRIZZO, M. E. S.; BURGOS, J. S.; RAMÍREZ, G.; SOUZA, D. O. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.* 912: 176-180, 2001.
- LERMA, J. roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 481-495, 2003.
- LIN, R. C.; SCHELLER, R. H. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:19–49, 2000.
- LIU, H.; WANG, H.; SHENG, M.; JAN, L.Y.; JAN, Y.N.; BASBAUM, A.I. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8383–8387, 1994.
- LONART, G.; SUDHOF, T.C. Assembly of SNARE core complexes prior to neurotransmitter release sets the readily releasable pool of synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 275:27703-27707, 2000.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
- MACDERMOTT, A. B.; ROLE, L. W.; SIEGELBAUM, S. A. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 443–485, 1999

- MALCON, C.; ACHAVAL, M.; KOMLUS S.; PARTATA, W.; SAURESSIG, M.; RAMÍREZ, G.; SOUZA, D. O. GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH diaphorase-positive cells in hte rat striatum. *Neurosci. Lett.* 225: 145-148, 1997.
- MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5-21, 2004.
- MALVA, J.O.; CARVALHO, A.P.; CARVALHO, C.M. Modulation of dopamine and noradrenaline release and of intracellular Ca²⁺ concentration by presynaptic glutamate receptors in hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 113:1439-47, 1994.
- MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutrit.* 130: 1007S-1015S, 2000.
- MORCIANO, M.; ORTINAU, S.; ZIMMERMANN, H. Guanine nucleotides inhibit NMDA and kainate-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal and neocortical neurons. *Neurochem Int.* 45:95-101, 2004.
- MOLZ, S.; OLIVEIRA, I.J.L.; SOUZA, D.O.; TASCA, C.I. GMP prevents toxicity in hippocampal slices submitted to glutamate in a chemical model of ischemia. *J. Neurochem.* 78(Suppl.1): 196, Abstract BP23-33, 2001.
- MOLZ, S. Estudo da morte celular induzida por glutamato e sua modulação por guanosina-5'-monofosfato em fatias de hipocampo de ratos. Florianópolis, 2003.
- MORRIS, A. J. & MALBON, C. G. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol. Rev.* 79: 1373-1430, 1999.
- MUNIR, M.; CORREALE, D. M.; ROBINSON, M. B. Substrate-induced up-regulation of Na⁺-dependent glutamate transport activity. *Neurochem. Intl.* 37: 147-162, 2000.
- OHTA, K.; NOMURA, T.; KANNO, T.; NAGAI, K.; YAMAMOTO, S.; YAJIMA, Y.; KONDOH, T.; KOHMURA, E.; SAITO, N.; NISHIZAKI, T. L-trans-PDC enhances hippocampal neuronal activity by stimulating glial glutamate release independently of blocking transporters. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* 295: 376–381, 2002.
- OLIVEIRA, I. J. L.; MOLZ, S.; SOUZA, D. O.; TASCA, C. I. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an in vitro model of ischemia. *Cel. Mol. Neurobiol.* 22: 335-344, 2002.
- OLIVEIRA, D.L.; HORN, J.F.; RODRIGUES, J.M.; FRIZZO, M.E.; MORIGUCHI, E.; SOUZA, D.O.; WOFCHUK, S. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. *Brain Res.* 1018: 48-54, 2004.
- OLNEY, J. W. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 47-71, 1990.

- PAAS, Y.; DEVILLERS-THIERY, A.; CHANGEUX, J. P.; MEDEVIELLE, F.; TEICHBERG, V. I. Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor. *EMBO J.* 15: 1548-1556, 1996.
- PAHNER, I.; HÖLTJE, M.; WINTER, S.; TAKAMORI, S.; BELLOCCHIO, E. E.; SPICHER, K.; LAAKE, P.; NÜMBERG, B.; OTTERSEN, O. P.; AHNERT-HILGER, G. Functional G-protein heterotrimers are associated with vesicles of putative glutamatergic terminals: implications for regulation of transmitter uptake. *Mol. Cell. Neurosci.* 23: 398-413, 2003.
- PAZ, M. M.; RAMOS, M.; RAMÍREZ, G.; SOUZA, D. O. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum. *FEBS Lett.* 355: 205-208, 1994.
- PERKINGTON, M. S.; SIHRA, T. S. A High-affinity Presynaptic Kainate-Type Glutamate Receptor Facilitates Glutamate Exocytosis From Cerebral Cortex Nerve Terminals (Synaptosomes). *Neuroscience* 90: 1281-1292, 1999.
- PETTIFER, K.M.; KLEYWEGT, S.; BAU, C.J.; RAMSBOTTOM, J.D.; VERTES, E.; CICCARELLI, R.; CACIAGLI, F.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Guanosine protects SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced apoptosis. *Neuroreport* 15:833-836, 2004.
- PHILLIS, J.W.; REN, J.; O'REGAN, M. H. Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-b-benzyloxyaspartate. *Brain Research* 868: 105-112, 2000.
- PITTALUGA, A.; RAITERI, M. Release-enhancing glycine-dependent presynaptic NMDA receptors exist on noradrenergic terminals of hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 191:231-234, 1990.
- PITTALUGA, A.; BONFANTI, A.; RAITERI, M. Differential desensitization of ionotropic non- NMDA receptors having distinct neuronal location and function. *Naun. Schmied. Arch. Pharmacol.* 356:29-38, 1997.
- POITRY-YAMATE, C. L.; VUTSKITS, L.; RAUEN, T. Neuronal-induced and glutamate-dependent activation of glial glutamate transporter function. *J. Neurochem.* 82: 987-997, 2002.
- PORCIUNCULA, L.O.; VINADE, L.; WOFCHUK, S.; SOUZA, D.O. Guanine based purines inhibit [³H]glutamate and [³H]AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 928:106-112, 2002.
- RAITERI, L.; STIGLIANI, S.; ZEDDA, L.; RAITERI, M.; BONANNO, G. Multiple mechanisms of transmitter release evoked by "pathologically" elevated extracellular [K⁺]: involvement of transporter reversal and mitochondrial calcium. *J. Neurochem.* 80:706-14, 2002.

- RAMON Y CAJAL, S. Significación fisiológica de las expansiones protoplasmáticas y nerviosas de las células de la sustância gris. *Re. Ciências Med. Barcelona* 22: 1-15, 1881.
- RATHBONE, M. P.; MIDDLEMIS, P. J.; GYSBERS, J. W.; ANDREW, C.; HERMAN, M. A. R.; REED, J. K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progr. Neurobiol.* 59: 663-690, 1999.
- REGNER, A.; CRESTANA, R. E.; SILVEIRA-FILHO, J. P. J.; FRIEDAMN, G.; CHEMALE, I.; SOUZA, D. O. Guanine nucleotides are present in human CSF. *NeuroReport* 8: 3771-3774, 1997.
- ROBINSON, M. B. & DOWD, L. A. Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. In: *Adv. Pharmacol.* 37: 69-113, 1997.
- ROBINSON, M. B. The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem. Intl.* 33: 479-491, 1999.
- ROTTA, L.N.; SOARES, F.A.; NOGUEIRA, C.W.; MARTINI, L.H.; PERRY, M.L.; SOUZA, D.O. Characterization of imido [$8\text{-}^3\text{H}$] guanosine 5'-triphosphate binding sites to rat brain membranes. *Neurochem Res.* 29:805-9, 2004
- SEGOVIA, G.; PORRAS, A.; DEL ARCO, A.; MORA, F. Glutamatergic transmission in aging: a critical perspective. *Mechan. Aging Develop.* 122: 1-29, 2001.
- SHIMAMOTO, K.; LEBRUM, B.; YASUDA-KAMATANI, Y.; SAKAITANI, M.; SHIGERI, Y.; YUMOTO, N.; NAKAJIMA, T. DL-threo- β -benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol. Pharmacol.* 53:195-201, 1998.
- SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; MARASCHIN, J. F.; PERLA, A. S.; SOUZA, D. O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864: 40-43, 2000.
- SOARES, F.A.; SCHMIDT, A.P.; FARINA, M.; FRIZZO, M.E.; TAVARES, R.G.; PORTELA, L.V.; LARA, D.R.; SOUZA, D.O. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Res.* 1005:182-186, 2004.
- SOUZA, D. O.; & RAMÍREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *J. Mol. Neurosci.* 3: 39-45, 1991.
- STEVENS, T.H.; FORGAC, M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H^+)-ATPase. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13: 779-808, 1997.
- TAKAMORI, S.; RHEE, J. S.; ROSEN MUND, C.; JAHN, R. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407: 189-194, 2000.

- TASCA, C. I.; WOFCHUK, S. T.; SOUZA, D. O.; RAMÍREZ, G.; RODNIGHT, R. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. *NeuroReport* 6: 249-252, 1995.
- TASCA, C. I.; CARDOSO, L. F.; MARTINI, L. H.; RAMÍREZ, G.; SOUZA, D. O. Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptors activation. *Neurochem. Res.* 23: 183-188, 1998.
- TASCA, C.I.; BURGOS, J.S.; BARAT, A.; SOUZA, D.O.; RAMÍREZ, G. Chick kainate binding protein lacks GTPase activity. *NeuroReport* 10: 1981-1983, 1999.
- TASCA, C. I.; SANTOS, T. G.; TAVARES, R. G.; BATTASTINI, A. M. O.; ROCHA, J. B. T.; SOUZA, D. O. Guanine derivatives modulate L-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles. *Neurochem. Intl.* 44: 423-431, 2004.
- TAVARES, R.G.; TASCA, C.I.; SANTOS, C.E.; ALVES, L.B.; PORCIUNCULA, L.O.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D.O. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem. Int.* 40:621-627, 2002.
- TRAVERSA, U; BOMBI, G.; DI IORIO, P.; CICCARELLI, R.; WERSTIUK, E. S.; RATHBONE, M. P. Specific [³H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *Brit. J. Pharmacol.* 135: 969-976, 2002.
- TROTTI, D.; DANBOLT, N.C.; VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci.* 9:328-34, 1998.
- VINADE, E.R.; SCHMIDT, A.P.; FRIZZO, M.E.; IZQUIERDO, I.; ELISABETSKY, E.; SOUZA, D.O. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Res.* 977:97-102, 2003.
- VINADE, E.R.; SCHMIDT, A.P.; FRIZZO, M.E.; PORTELA, L.V.; SOARES, F.A.; SCHWALM, F.D.; ELISABETSKY, E.; IZQUIERDO, I.; SOUZA, D.O. Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. *J. Neurosci. Res.* 79:248-253, 2005.
- VOLONTE, C.; AMADIO, S.; CAVALIERE, F.; D'AMBROSI, N.; VACCA, F.; BERNARDI, G. Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 2:403-412, 2003.
- WAAGEPETERSEN, H.S.; SHIMAMOTO, K.; SCHOUSBOE, A. Comparison of effects of DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) and L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (t-2,4-PDC) on uptake and release of [³H]D-aspartate in astrocytes and glutamatergic neurons. *Neurochem. Res.* 26:661-6, 2001.

- WAGNER J. A., CARLSON S. S., KELLY R. B. (1978) Chemical and physical characterization of cholinergic synaptic vesicles. *Biochemistry* 17, 1199-1206.
- WANG J.K. Presynaptic glutamate receptors modulate dopamine release from striatal synaptosomes. *J. Neurochem.* 57:819–822, 1991.
- WEBER, A.; WINKLER, H. Specificity and mechanism of nucleotide uptake by adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* 6: 2269-2276, 1981.
- WHITAKER V. P., MICHAELSON J. A., & KIRKLAND R. J. A. The separation of synaptic vesicles from nerve-endings particles (synaptosomes). *Biochem. J.* 90: 293-303, 1964.
- WOLOSKER H., SOUZA, D. O., & de MEIS L. Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J. Biol. Chem.* 271: 11726-11731, 1996.
- YERNOOL, D.; BOUDKER, O.; JIN, Y.; GOUAUX, E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 431: 811-818, 2004.
- ZHOU, M.; PETERSON, C.L.; LU, Y.B.; NADLER, J.V. Release of glutamate and aspartate from CA1 synaptosomes: selective modulation of aspartate release by ionotropic glutamate receptor ligands. *J. Neurochem.* 64:1556–1566, 1995.
- ZIMMERMANN H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 49:589-618, 1996.