

Daniel Tonial Thomaz

**O NUCLEOSÍDEO GUANOSINA PROMOVE
NEUROPROTEÇÃO CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO E
BIOENERGÉTICO EM UM MODELO DE ISQUEMIA
CEREBRAL *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

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

Co-orientadora: Dr^a Tharine Aparecida Dal-Cim.

**FLORIANÓPOLIS
MARÇO DE 2015**

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

Thomaz, Daniel Tonial

O nucleosídeo guanosina promove neuroproteção contra o estresse oxidativo e bioenergético em um modelo de isquemia cerebral in vitro / Daniel Tonial Thomaz ; orientadora, Carla Inês Tasca ; coorientadora, Tharine Aparecida Dal-Cim. - Florianópolis, SC, 2015.

111 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Acidente vascular cerebral. 3. Estresse oxidativo. 4. Estresse bioenergético. 5. Guanosina. I. Tasca, Carla Inês. II. Dal-Cim, Tharine Aparecida. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Daniel Tonial Thomaz

**O NUCLEOSÍDEO GUANOSINA PROMOVE
NEUROPROTEÇÃO CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO E
BIOENERGÉTICO EM UM MODELO DE ISQUEMIA
CEREBRAL *IN VITRO***

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Bioquímica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Florianópolis, 12 de Março de 2015

Prof. Dr. Carlos Peres Silva
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Carla Inês Tasca
Orientadora
BQA/CCB/UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Andreza Fabro de Bem
Membro
BQA/CCB/UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Lúcia H. do C. Vinade
Membro Externo ao Programa
UNIPAMPA

Dr. Rodrigo Bainy Leal
Membro
BQA/CCB/UFSC

Dedico este trabalho a todas as
pessoas que me apoiaram na decisão
de realizar este Mestrado em
Bioquímica, em especial, à minha
esposa Rafaela Rafognatto
Andregueti.

Agradecimentos

A Rafaela Rafognatto Andregueti. Por sua presença física e espiritual, por seu amor e por sua paciência.

Aos meus pais. Por me proporcionarem amor incondicional.

A Carla Inês Tasca. Por aceitar-me para participar de seu grupo de pesquisa, por sua orientação e por sua disponibilidade e presteza para conversas e esclarecimentos.

A Tharine Aparecida Dal-Cim. Por sua orientação, por sua ajuda e por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, em especial as Professoras Andreza Fabro de Bem e Alexandra Susana Latini e aos Professores Rodrigo Bainy Leal e Carlos Peres Silva.

A Professora Lúcia Helena do Canto Vinade. Por ter aceitado o convite para avaliar este trabalho.

A Vanessa Silva da Silva, Bibiana Sgorla de Almeida e Denis Dall Agnolo. Pela presteza e atenção disponibilizada no atendimento do Lameb 1.

A Maurício Peña Cunha. Por toda ajuda e atenção com alguns dos experimentos realizados neste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Neuroquímica 4: Caio Massari, Carine Bropp, Cláudia Aguiar, Débora Lanznaster, Fabiana Kalyne, Flávia Lopes, Gabriela Poluceno, Karen Oliveira, Laíse Figueiredo, Leandra Constantino, Lucas Bittencourt, Luíza Binder, Victor Coelho, Wagner Martins e aos colegas da Bioquímica/Neuroquímica, Débora Scheffer, Gianni Mancini e Marcos Stralioetto. Por todo tipo de ajuda prestada para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina e aos órgãos de fomento à pesquisa, em especial a Capes, que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

Se vai tentar
siga em frente.

Senão, nem comece!
Isso pode significar perder namoradas
esposas, famílias, trabalho...e talvez a cabeça.

Pode significar ficar sem comer por dias,
Pode significar congelar em um parque,
Pode significar cadeia,
Pode significar caçoadas, desolação...

A desolação é o presente
O resto é uma prova de sua paciência,
do quanto realmente quis fazer
E farei, apesar do menosprezo
E será melhor que qualquer coisa que possa
imaginar.

Se vai tentar,
Vá em frente.
Não há outro sentimento como este
Ficará sozinho com os Deuses
E as noites serão quentes
Levará uma vida com um sorriso perfeito
É a única coisa que vale a pena.

Charles Bukowski

RESUMO

As doenças vasculares cerebrais isquêmicas representam uma importante causa de mortalidade no Brasil e no mundo, sendo ainda responsáveis por consideráveis índices de morbidade. A diminuição do fluxo sanguíneo para o cérebro ocasiona a ativação de diferentes vias bioquímicas e celulares que resultam em danos celulares através da toxicidade causada, principalmente, pelo acúmulo de glutamato na fenda sináptica. Uma das organelas celulares que é afetada pela isquemia cerebral é a mitocôndria, devido ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, ocasionando estresse oxidativo, despolarização da membrana mitocondrial e interrupção da síntese de ATP. Estes eventos resultam em diminuição do fornecimento energético para a célula e liberação de fatores pró-apoptóticos, podendo levar à morte celular. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem estudado os efeitos da guanosina, um nucleosídeo endógeno, como agente neuroprotetor durante eventos de isquemia/reoxigenação cerebral. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito neuroprotetor da guanosina sobre o dano oxidativo e bioenergético em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio seguida por reoxigenação, um modelo de isquemia cerebral *in vitro*. Também avaliamos se os mecanismos de proteção promovidos pela guanosina dependem da atividade das enzimas óxido nítrico sintase. Nossos resultados demonstraram que a guanosina proporcionou neuroproteção para fatias de hipocampo de ratos submetidas à isquemia *in vitro*, impedindo o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, dentre estas de óxido nítrico e peroxinitrito; preveniu a perda do potencial de membrana mitocondrial e reverteu a queda dos níveis de ATP e de lactato ocasionado pela isquemia. Também observamos que o uso de inibidores das enzimas óxido nítrico sintase, principalmente da isoforma neuronal desta enzima, fornecem proteção celular para o tecido isquêmico, similar ao observado com a guanosina. No entanto, o efeito neuroprotetor da guanosina não depende diretamente da atividade das enzimas óxido nítrico sintase. De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o entendimento da neuroproteção promovida pela guanosina e o efeito das enzimas óxido nítrico sintase na isquemia cerebral experimental.

ABSTRACT

Ischemic cerebrovascular diseases are among the major causes of mortality in Brazil and in the world, and they are also responsible for considerable rise in morbidity. The decreased blood flow to the brain causes the activation of different biochemical pathways in the cell, resulting in damage through the toxicity caused mainly by an accumulation of glutamate in the synaptic cleft. Mitochondria is one of the cell organelles that is most affected by cerebral ischemia due to increased levels of reactive oxygen and nitrogen species, causing oxidative stress, loss of the mitochondrial membrane potential and disruption of ATP synthesis. These events may lead to cell death, since energy supply will be decreased and pro-apoptotic factors will be released. In recent years, our research group has studied the effects of guanosine, an endogenous nucleoside, as a neuroprotective agent during cerebral ischemia/reoxygenation events. Thus, the aim of this study was to investigate the neuroprotective effect of guanosine on oxidative damage and bioenergetics in hippocampal slices of rats subjected to oxygen and glucose deprivation (OGD) followed by reoxygenation, a model of cerebral ischemia in vitro. We also assess whether the protection promoted by guanosine depends on the activity of the enzymes nitric oxide synthase. Our results demonstrated that guanosine provided neuroprotection to hippocampal slices of rats subjected to OGD, preventing the increased production of reactive oxygen and nitrogen species. Guanosine also prevented the loss of mitochondrial membrane potential and reversed the fall in ATP and lactate levels caused by ischemia. The use of inhibitors of nitric oxide synthase enzymes, especially the neuronal isoform of this enzyme, provides cellular protection for ischemic tissue, which was similar to that seen with guanosine. However, the neuroprotective effect of guanosine does not depend on the activity of nitric oxide synthase. The results obtained in this study contribute to the understanding of the effects of guanosine and the nitric oxide synthase enzymes in experimental cerebral ischemia.

SUMÁRIO

RESUMO	11
LISTA DE ABREVIATURAS	17
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Acidente vascular cerebral.....	19
1.2 Mecanismos bioquímicos associados ao processo de isquemia cerebral.....	20
1.3 Estresse oxidativo associado à isquemia cerebral.....	22
1.4 A função mitocondrial na isquemia cerebral	24
1.5 O comprometimento energético celular ocasionado pela isquemia cerebral.	25
1.6 O papel neuroprotetor da guanosina frente à isquemia cerebral.....	26
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	30
3.1 Animais.....	30
3.2 Preparação de fatias hipocâmpais.	30
3.3 Modelo de isquemia: privação de glicose e oxigênio.	30
3.4 Tratamento das fatias de hipocampo.	31
3.5 Avaliação da viabilidade celular.....	33
3.6 Avaliação do dano celular.	33
3.7 Análise da geração de espécies reativas.	34
3.8 Avaliação da produção de óxido nítrico.	34
3.9 Avaliação da produção de peroxinitrito.....	35
3.10 Análise da capacidade antioxidante da guanosina.	36
3.11 Avaliação da atividade sequestradora de óxido nítrico pela guanosina.	36
3.12 Análise do potencial de membrana mitocondrial.....	37
3.13 Avaliação dos níveis intracelulares de ATP.	37
3.14 Avaliação dos níveis extracelulares de lactato.....	39
3.15 Análise estatística	39
4. RESULTADOS.....	40

4.1	Avaliação do efeito neuroprotetor da guanosina sobre o estresse oxidativo em fatias hipocâmpais submetidas à PGO.	41
4.1.1	Avaliação da viabilidade celular das fatias de hipocampo. .	41
4.1.2	Avaliação do dano celular induzido pela PGO em fatias de hipocampo.	44
4.1.3	Análise da produção de espécies reativas em fatias de hipocampo.	46
4.1.4	Avaliação da síntese de óxido nítrico em fatias de hipocampo.	48
4.1.5	Avaliação da produção de peroxinitrito em fatias de hipocampo.	51
4.1.6	Avaliação da capacidade antioxidante da guanosina.	54
4.1.7	Avaliação da atividade sequestradora de óxido nítrico pela guanosina.	56
4.1.8	Análise do potencial de membrana mitocondrial em fatias de hipocampo.	57
4.2	Avaliação do efeito neuroprotetor da guanosina sobre o dano bioenergético em fatias hipocâmpais submetidas à PGO.	61
4.2.1	Avaliação dos níveis intracelulares de ATP.	61
4.2.2	Avaliação dos níveis extracelulares de lactato.	64
4.2.3	Avaliação da viabilidade celular das fatias de hipocampo. .	68
5.	DISCUSSÃO	70
6.	CONCLUSÕES	87
7.	REFERÊNCIAS	88

LISTA DE ABREVIATURAS

1400W: N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina – inibidor seletivo da isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase
7-NI: 7-Nitroindazol – inibidor seletivo da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase
AMPA: Receptores ionotrópicos α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole
ANOVA: Análise de variância de uma via
AKT: Proteína cinase B
ATP: Adenosina-5'-trifosfato
AVC: Acidente vascular cerebral
BK: Canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio
 Ca^{2+} : Íon cálcio
 Cl^- : Íon cloro
DAF-2 DA: 4-5-diaminofluoresceína diacetato
DAF-2T: Diaminofluoresceína
DCFH-DA: 2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DHR 123: Diidrorodamina 123
DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DPPH: Difenil-1-picrilhidrazil
EROs: Espécies reativas de oxigênio
ERNs: Espécies reativas de nitrogênio
FCCP: Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
GMP: Guanosina-5'-monofosfato
GUO: Guanosina
 H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio
IP: Iodeto de propídio
KRB: Tampão Krebs-Ringer bicarbonato
 K^+ : Íon potássio
L-NAME: N ω -Nitro-L-arginina metil ester – inibidor não-seletivo das enzimas óxido nítrico sintase
MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium
eNOS/NOS3: Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS/NOS2: Óxido nítrico sintase induzível
nNOS/NOS1: Óxido nítrico sintase neuronal
 Na^+ : Íon sódio

Na⁺/K⁺-ATPase: Bomba de sódio/potássio dependente de ATP
NMDA: Receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato
NO: Óxido nítrico
NO₂⁻: Nitrito
NOS: Óxido nítrico sintase
•OH: Radical hidroxila
O₂: Oxigênio
O₂⁻: Ânion superóxido
ONOO⁻: Peroxinitrito
PGO: Privação de glicose e oxigênio
PI3K: Proteína cinase dependente de fosfatidilinositol
ROD 123: Rodamina 123
SNAP: S-nitro-N-acetilpenicilamina
SNC: Sistema nervoso central
SNP: Nitroprussiato de sódio
TMRE: Tetrametilrodamina-etil-éster
Ψ_m: Potencial de membrana mitocondrial

1. INTRODUÇÃO.

1.1 Acidente vascular cerebral.

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma entidade patológica com alta prevalência na população mundial, sendo considerada a segunda principal causa de morte e uma das principais causas de morbidade (DONNAN et al., 2008; OHTAKI et al., 2005).

Popularmente conhecido como derrame cerebral, esta doença atinge aproximadamente dezesseis milhões de pessoas no mundo a cada ano (GARCIA, 2012).

No Brasil o AVC é a primeira causa de morte, com uma taxa de mortalidade específica de 52,3 pessoas para cada 100.000 habitantes (DATASUS, 2009).

Na maioria dos casos, o AVC resulta de uma isquemia cerebral, a qual consiste em uma obstrução do fluxo sanguíneo, ocasionando um comprometimento do fornecimento de substratos metabólicos, incluindo o oxigênio e a glicose, que pode causar severa degeneração das células do sistema nervoso e consequente perda de funções cerebrais (LEFER; LEFER, 1996).

A interrupção do fluxo sanguíneo, dependendo do tempo e da intensidade, poderá determinar os mais variados graus de lesão celular. Além disto, as consequências da isquemia cerebral também levam em conta os danos que se desenvolvem durante o estágio de reperfusão tecidual (SILVA Jr. et al., 2002), termo utilizado para definir o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquemia (EVORA et al., 1996).

Devido ao envelhecimento da população, a incidência do AVC tende a aumentar, especialmente nos países em desenvolvimento (GARCIA, 2012).

Neste sentido, observamos que a tendência atual da população brasileira é de caminhar para o envelhecimento, pois, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o brasileiro possui ao nascer uma expectativa média de vida de 73 anos, podendo alcançar 81 anos em 2050 (BRASIL, 2010).

Alia-se a este dado o fato que aproximadamente 75% dos pacientes acometidos por AVC possuem idade acima de 65 anos e que

sua incidência dobra a partir de cada década após os 55 anos de idade. Assim, em função do aumento da longevidade do brasileiro e da elevada prevalência na população idosa, o AVC deve, em breve, aumentar ainda mais sua relevância dentre os problemas de saúde pública no Brasil (YAMAMOTO, 2009).

1.2 Mecanismos bioquímicos associados ao processo de isquemia cerebral.

O cérebro é um órgão que utiliza muita energia em relação aos outros órgãos do corpo humano, necessitando de suprimento contínuo de oxigênio e glicose para manter seu funcionamento normal. Quando este fornecimento é interrompido, uma cascata de eventos interligados ocorre, os quais são denominados de “cascata isquêmica”. A cascata isquêmica é uma sequência complexa de eventos patofisiológicos espaciais e temporais, que apresentam importantes inter-relações, perdurando por horas ou dias (BROUNS; DEYN, 2009; DURUKAN; TATLISUMAK, 2007).

Inicialmente ocorre uma redução nos níveis de oxigênio (O_2) e glicose, conseqüentemente, o suprimento energético diminui devido à queda dos níveis de adenosina-5'-trifosfato (ATP) (HERTZ, 2008; MORO et al., 2004; OHTAKI et al., 2005).

A homeostasia celular fica comprometida devido a alterações no funcionamento dos mecanismos celulares que dependem de ATP. A ruptura do gradiente iônico da membrana, devido à perda de função das bombas de sódio e potássio dependentes de ATP (Na^+/K^+ -ATPase), resulta em despolarização da membrana plasmática das células do sistema nervoso (ROBBINS et al., 1992).

Nesta circunstância, ocorre rápido efluxo de potássio (K^+) e influxo acentuado de íons sódio (Na^+), cloro (Cl^-) e cálcio (Ca^{2+}) para as células, induzindo ao edema citotóxico (OHTAKI, 2005; ROBBINS et al., 1992). Com a perda do gradiente iônico de membrana ocorre a reversão dos transportadores de aminoácidos e ativação dos canais de Ca^{2+} , provocando uma elevação nos níveis de Ca^{2+} citosólico livre (CARDEN; GRANGER, 2000; MORO et al., 2004).

O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} resulta na ativação de enzimas dependentes deste íon, que desempenham processos

potencialmente capazes de causar danos, como por exemplo proteólise, peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (CHOI, 1988; MORO et al., 2004).

Concomitante ao aumento intracelular dos níveis de Ca^{2+} , a despolarização neuronal acarreta no aumento da liberação de neurotransmissores, principalmente liberação de glutamato, um aminoácido considerado o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) em mamíferos (FEI; ZHANG, 2007; MELDRUM, 2000).

Fisiologicamente o glutamato está envolvido em várias funções no cérebro, tais como a aprendizagem e a memória (IZQUIERDO et al., 2006; STEVENS, 2008). Contudo, o aumento dos níveis extracelulares deste neurotransmissor está correlacionado com a patofisiologia de danos cerebrais isquêmicos (WHITE et al., 2000).

Os níveis de glutamato na fenda sináptica são cuidadosamente regulados a fim de preservar a integridade da transmissão sináptica excitatória. Esta regulação é um processo crucial para manter a concentração extracelular de glutamato abaixo dos níveis tóxicos. Tal regulação é efetuada por transportadores de aminoácidos excitatórios que estão localizados, principalmente, em células astrocitárias. Estes transportadores realizam o co-transporte de glutamato e Na^+ , desta forma, seu mecanismo de ação depende da atividade das bombas de Na^+/K^+ -ATPase, as quais, por sua vez, necessitam de grandes quantidades de ATP (CAMACHO; MASSIEU, 2006).

No entanto, com a falha energética causada pela isquemia, a captação de glutamato é prejudicada, além disso, pode ocorrer um fluxo reverso da atividade dos transportadores de aminoácidos excitatórios, contribuindo para um aumento ainda mais acentuado dos níveis extracelulares de glutamato (MALARKEY; PARPURA, 2008).

O aumento dos níveis de glutamato na fenda sináptica, causado tanto pela despolarização neuronal quanto pela falha na captação desse aminoácido, conduz à hiperativação dos receptores de glutamato, principalmente dos receptores ionotrópicos, que são denominados pelos ligantes sintéticos seletivos a estes receptores, como receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole (AMPA) (HERTZ, 2008; MORO et al., 2004; OHTAKI et al., 2005).

A ativação dos receptores NMDA, por seu ligante endógeno glutamato, contribui para a entrada de Ca^{2+} e Na^+ extracelular para o interior da célula. De forma semelhante, os receptores AMPA tornam-se permeáveis ao íon Ca^{2+} , permitindo sua entrada para o citosol celular (OZAWA et al., 1998; ZADORI et al., 2012).

O resultado do somatório destes eventos, denominado por excitotoxicidade, é a ativação de diversas vias de sinalização, de genes associados à morte celular, aumento da síntese de radicais livres e a indução de danos celulares (BROUNS; DEYN, 2009; MELDRUM, 2000).

1.3 Estresse oxidativo associado à isquemia cerebral.

O SNC possui um sistema de defesa antioxidante eficaz composto por enzimas antioxidantes, incluindo a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx). Estas enzimas, em conjunto com antioxidantes não enzimáticos, como por exemplo a glutatona reduzida (GSH) e a vitamina C, são responsáveis pela inativação de radicais livres, evitando assim o dano oxidativo (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993; CRACK; TAYLOR, 2005).

No entanto, dentre os múltiplos processos deletérios que ocorrem durante a isquemia/reperfusão cerebral, a excessiva produção de EROs e ERNs, incluindo o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO^-), têm sido considerados como importantes mediadores da lesão cerebral decorrente destes eventos (FERDINANDY; SCHULZ, 2003; MORO et al., 2004). Além disto, o aumento dos níveis de EROs e ERNs causa uma ineficiência enzimática e um esgotamento de moléculas que agem na remoção destas espécies reativas (BROWN, 2010; CHEN et al., 2011).

O desequilíbrio do sistema antioxidante desencadeia diversos eventos bioquímicos e celulares, incluindo a oxidação, a nitrosilação e/ou a nitração de proteínas, a peroxidação de lipídeos e danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), resultando em danos às macromoléculas e consequente ativação de mecanismos de sinalização que levam à morte celular (NANETTI et al., 2011; OLMEZ; OZYURT, 2012).

Uma das espécies de radicais livres que permanece com os níveis elevados durante o período de reperfusão é o NO (MORO et al., 2004).

Em condições fisiológicas normais, o NO é uma importante molécula para a manutenção da homeostasia celular. Esta molécula possui funções protetoras, tais como, a vasodilatação e ações antioxidantes e anti-plaquetárias (FERDINANDY; SCHULZ, 2003).

Por outro lado, algumas evidências sugerem que o NO pode exercer tanto um efeito protetor, quanto um efeito prejudicial durante e/ou após uma lesão cerebral isquêmica. Estes efeitos dependem de alguns fatores, tais como, a isoforma da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que atua na síntese de NO, o tipo de célula onde este composto é produzido e o estágio temporal em que o NO atua (ALMEIDA et al., 2001; BUISSON et al., 1992; MORO et al., 2004).

Desta forma, Huang et al. (1994) observaram que imediatamente após um episódio de isquemia cerebral, o NO sintetizado a partir da isoforma endotelial da NOS (eNOS ou NOS3) apresenta efeito protetor, principalmente por promover dilatação dos vasos sanguíneos. Inobstante, tem sido descrito que a atividade da isoforma óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS1) aumenta consideravelmente após um evento isquêmico (KADER et al., 1993), contribuindo para o aumento dos níveis de NO. Estas duas isoformas da NOS são dependentes de Ca^{2+} para serem ativadas (BOLANOS et al., 2009).

A síntese de NO também ocorre por outra isoforma da NOS, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2). Esta isoforma, diferente da eNOS e da nNOS, é independente de Ca^{2+} para ser ativada e é expressa após a exposição à algumas citocinas, tais como, interferon- γ , fator de necrose tumoral α ou interleucina- 1β (BOLANOS; HEALES, 2010; KNOWLES; MONCADA, 1994), nos astrócitos, nas células da microglia e nos macrófagos que se encontram na área lesionada, bem como nos neurônios (MORO et al., 2004).

Desta forma, a ativação da nNOS e da iNOS, após a isquemia cerebral, está relacionada com reações inflamatórias, e resulta em grande produção de NO no tecido cerebral lesionado, alterando seu papel protetor para um papel que contribuirá para o desenvolvimento do

dano cerebral e para a excitotoxicidade do glutamato (ALMEIDA et al., 2001; 2004; MORO et al., 2004).

1.4 A função mitocondrial na isquemia cerebral.

O balanço entre a geração de EROs e de ERNs e a ativação de processos antioxidantes parece estar comprometido em várias desordens neurológicas, como no AVC, epilepsia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e na doença de Huntington (ALBRECHT et al., 2013).

Durante o período de reperfusão tecidual, após o insulto isquêmico, ocorre um aumento de Ca^{2+} citosólico livre, ocasionando o aumento dos níveis de EROs e ERNs. Uma organela celular que é afetada diretamente, tanto pelo aumento de Ca^{2+} citosólico quanto pelo aumento de espécies reativas, é a mitocôndria (BOLANOS et al., 2009).

Uma das reações que ocorrem na mitocôndria, devido ao aumento dos níveis de EROs e ERNs, é a inibição da atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons, o que leva à alteração do potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) e ao desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons com a fosforilação oxidativa, comprometendo a síntese de ATP (ALMEIDA et al., 2004; BROWN, 2010).

Além disto, a alteração do Ψ_m pode levar à formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. O poro de transição de permeabilidade mitocondrial é um complexo proteico formado pela interação de diversas proteínas na membrana externa da mitocôndria; sendo que sua abertura ou fechamento são afetados por várias proteínas que estimulam ou suprimem a apoptose, respectivamente (LEHNINGER et al., 2008).

Com a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial ocorre um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, permitindo que a proteína citocromo *c* se desloque do espaço intermembrana para o citosol (LEHNINGER et al., 2008). Em seguida, ocorre também a liberação de fatores pró-apoptóticos que podem ativar mecanismos que conduzem à morte celular (HAUSENLOY et al., 2003; LIU et al., 1996).

Desta forma, o papel da mitocôndria para a produção de energia nas células é considerado fundamental para a sobrevivência celular,

mas, esta organela também pode atuar como reguladora da morte celular. A diminuição da atividade mitocondrial é um evento primordial e crucial na cascata excitotóxica que sucede uma isquemia cerebral (MURPHY et al., 1999).

1.5 O comprometimento energético celular ocasionado pela isquemia cerebral.

Conforme comentado brevemente, durante um episódio isquêmico o consumo de ATP aumenta significativamente, principalmente devido ao aumento da atividade das bombas de Na^+/K^+ -ATPase. Paralelamente a este evento, em parte devido ao aumento de radicais livres, a cadeia transportadora de elétrons é inibida, ocasionando o bloqueio da síntese de ATP. Desta forma, os estoques energéticos celulares são rapidamente degradados e a reposição de novas moléculas de ATP encontra-se comprometida.

Neste sentido, diversos autores têm sugerido a existência de um sistema de transporte de lactato, a partir de células astrocíticas para células neuronais (*lactate shuttle*), e que este sistema desempenha um importante papel para a manutenção do funcionamento normal do SNC (MAGISTRETTI et al., 1993; 1999). Além disto, este sistema de transporte de lactato entre astrócitos e neurônios pode também desempenhar um importante papel na recuperação da função cerebral após eventos, tais como, isquemia ou hipóxia (ALMEIDA et al., 2004; SCHURR et al., 2001).

O lactato é o produto final da glicólise anaeróbica que ocorre em tecidos hipóxicos ou isquêmicos. No entanto, tecidos oxigenados também podem, em certas condições, produzir lactato através da glicólise aeróbica (BERGENSEN, 2007).

No tecido cerebral hipóxico ou isquêmico as células astrocíticas são consideradas como fontes energéticas, pois este tipo celular é capaz de armazenar glicose, em forma de glicogênio, o qual pode ser rapidamente mobilizado para ser consumido pela via glicolítica e dar origem a lactato. Este armazenamento permite concentrações locais altamente dinâmicas de lactato. De acordo com o sistema de transporte de lactato entre astrócitos e neurônios, o lactato disponibilizado pelos astrócitos é capturado por neurônios através de

transportadores monocarboxílicos e utilizado como substrato metabólico (TANG et al., 2014).

Desta forma, tem-se sugerido que o sistema de transporte de lactato entre astrócitos e neurônios é de fundamental importância para a manutenção das células neuronais em um evento isquêmico, proporcionando substrato energético e prevenindo a morte neuronal.

1.6 O papel neuroprotetor da guanosina frente à isquemia cerebral.

Atualmente, os únicos procedimentos terapêuticos com benefícios comprovados na clínica para o tratamento de pacientes acometidos por uma isquemia cerebral são: a administração intravenosa do ativador do plasminogênio tecidual, dentro de 3 horas, a administração de aspirina, dentro de 48 horas, após o início do episódio isquêmico, ou um procedimento mais invasivo realizado a partir de uma cirurgia descompressiva (GO et al., 2014).

Neste sentido, novas estratégias terapêuticas e farmacológicas, juntamente com estudos que desvendem os eventos bioquímicos e celulares associados à morte celular causada pela isquemia cerebral, são necessárias na tentativa de melhorar a eficácia de procedimentos e reduzir os efeitos adversos ocasionados pela isquemia.

Desta forma, diversos estudos em animais já demonstraram a função protetora de diferentes compostos contra os danos causados pelo processo de isquemia cerebral, como por exemplo, adenosina (GOMES et al., 2011), extrato de chá verde (HONG et al., 2001), vitamina E (ZHANG et al., 2004) e diazepam (GALEFFI et al., 2000). Tais compostos, denominados como neuroprotetores, agem em diferentes vias bioquímicas e celulares, como por exemplo, atuando como vasodilatadores, antioxidantes e inibindo o colapso mitocondrial.

Entre estes compostos neuroprotetores, o nosso grupo de pesquisa tem dado bastante atenção à guanosina (GUO), a qual é um nucleosídeo endógeno derivado da base nitrogenada guanina.

A guanosina tem sido descrita como um potencial agente neuroprotetor em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* de doenças cerebrais associadas à excitotoxicidade glutamatérgica (CHANG et al., 2008; LARA et al., 2001; SCHMIDT et al., 2000; 2009) e também

devido aos seus efeitos tróficos em células neurais e gliais (RATHBONE et al., 2008; SCHMIDT et al., 2007).

Em modelos animais de neurodegeneração *in vivo* já foi observado que a administração sistêmica de guanosina protege contra convulsões induzidas por ácido quinolínico, um agonista dos receptores NMDA (OLIVEIRA et al., 2004; SCHMIDT et al., 2000). Além disto, o ácido quinolínico pode aumentar a liberação de glutamato em preparações de sinaptossomas e reduzir a captação glial de glutamato (TAVARES et al., 2002), aumentando a concentração extracelular de glutamato, entretanto esse aumento é revertido na presença de guanosina (TAVARES et al., 2005). A neuroproteção promovida pela guanosina frente a danos excitotóxicos também já foi observada em fatias de hipocampo de ratos submetidas à neurotoxicidade pelo tratamento com glutamato (MOLZ et al., 2011). O tratamento com guanosina também é capaz de reverter o dano oxidativo cerebral e o prejuízo cognitivo induzido em um modelo animal de seps (PETRONILHO et al., 2012).

O papel neuroprotetor da guanosina em eventos isquêmicos também vem sendo investigado (THAUERER et al., 2012). O tratamento com guanosina é capaz de prevenir o prejuízo cognitivo e diminuir o volume de infarto celular em cérebro de ratos submetidos a um modelo animal de isquemia cerebral (CHANG et al., 2008). Em cultura de células PC12 e em neurônios cerebelares submetidos à hipóxia, o tratamento com guanosina promove proteção celular e induz crescimento neurítico (THAUERER et al., 2010).

A análise de um possível sítio de interação para a guanosina (proteína receptora na membrana celular) demonstrou que os efeitos neuroprotetores promovidos pela guanosina contra a privação de glicose e oxigênio dependem da ativação dos canais de K^+ de alta condutância ativados por Ca^{2+} (BK) (DAL-CIM et al., 2011). Estudos prévios já haviam demonstrado que a guanosina é capaz de induzir a expressão de canais de K^+ retificadores em células astrocitárias (BENFENATI et al., 2006), demonstrando a importância destes canais de K^+ nos efeitos desencadeados pela guanosina.

O papel da guanosina sobre a modulação dos transportadores de glutamato também vem sendo considerado como um importante mecanismo de neuroproteção contra eventos de excitotoxicidade. O tratamento com guanosina é capaz de prevenir a diminuição da captação

de glutamato em fatias de hipocampo de ratos neonatos expostos a hipóxia (MORETTO et al., 2005).

Com o intuito de investigar o mecanismo pelo qual a guanosina estimula o transporte de glutamato, nosso grupo demonstrou que a guanosina diminui a liberação de glutamato em fatias de hipocampo submetidas à excitotoxicidade glutamatérgica, através da ativação da via da proteína cinase dependente de fosfatidilinositol (PI3K) / proteína cinase B (AKT) (MOLZ et al., 2011). Adicionalmente, nosso grupo demonstrou que a guanosina previne a redução da captação de glutamato induzida pela privação de glicose e oxigênio em fatias de hipocampo de ratos através da ativação da via de sinalização da PI3K/AKT e dos canais BK (DAL-CIM et al., 2011).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que em fatias de hipocampo de ratos, submetidas a 15 minutos de privação de glicose e oxigênio seguido por 120 minutos de reoxigenação (PGO; modelo *in vitro* de isquemia cerebral), os mecanismos neuroprotetores efetuados pela guanosina envolvem a inibição da translocação da subunidade p65 do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) para o núcleo celular e diminuição da expressão da iNOS (DAL-CIM et al., 2013).

Além disto, foi reportado um efeito antioxidante indireto da guanosina, possivelmente relacionado à sua capacidade de estimular a captação de glutamato, reduzindo os níveis de glutamato extracelular e, conseqüentemente, o estresse oxidativo que acompanha a hiperestimulação dos receptores glutamatérgicos (ROSS et al., 2009).

No entanto, ainda existem diversos mecanismos bioquímicos e celulares que precisam ser investigados para uma melhor compreensão do papel neuroprotetor da guanosina contra os danos causados pela isquemia cerebral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito neuroprotetor da guanosina sobre o dano oxidativo e bioenergético em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio seguida por reoxigenação, um modelo de isquemia cerebral *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o dano celular induzido pela privação de glicose e oxigênio/reoxigenação;
- Investigar se o modelo de isquemia cerebral *in vitro* proporciona dano oxidativo para as fatias de hipocampo através da avaliação do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e do potencial de membrana mitocondrial;
- Analisar, através de ensaios *in vitro*, se a guanosina apresenta capacidade antioxidante *per se*;
- Determinar os efeitos da privação de glicose e oxigênio/reoxigenação sobre parâmetros do metabolismo energético celular, como os níveis intracelulares de ATP e os níveis extracelulares de lactato;
- Avaliar se o tratamento com guanosina previne e/ou reverte as alterações bioquímicas e celulares ocasionadas pela privação de glicose e oxigênio/reoxigenação sobre os parâmetros analisados.
- Investigar a participação da atividade das enzimas óxido nítrico sintase no dano celular induzido pela isquemia *in vitro* e na neuroproteção promovida pela guanosina.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Animais.

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos com idade entre 60 e 90 dias. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com o protocolo de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFSC PP00551. Os animais foram mantidos no biotério setorial da Bioquímica, com temperatura local variando entre 20 - 24 °C, com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

3.2 Preparação de fatias hipocampais.

Os animais foram sacrificados por decapitação. O cérebro foi extraído e acondicionado em placa de Petri, sobre gelo, contendo tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB). Em seguida realizou-se a dissecação cerebral para extração dos hipocampos. Logo após, foi utilizado um fatiador de tecidos (McIlwain Tissue Chopper) para obtenção de fatias hipocampais medindo 400 µm de espessura.

O tampão KRB apresenta a seguinte composição: NaHCO₃ 25mM; NaCl 1,22 mM; KH₂PO₄ 0,4mM; KCl 3mM; MgSO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 1,3 mM e D-Glicose 10 mM. Esta solução tampão foi gaseificada com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂), para atingir o pH de 7,4 e mantida a temperatura de 4 °C, de acordo com o protocolo descrito por Oliveira et al. (2002).

3.3 Modelo de isquemia: privação de glicose e oxigênio.

A privação de glicose e oxigênio é um modelo de estudo que simula as condições que ocorrem em situação de isquemia. Este protocolo utiliza uma solução tampão composta por NaCl 1,22 mM; KH₂PO₄ 0,4mM; KCl 3mM; MgSO₄ 1,2 mM; HEPES 25 mM; CaCl₂ 1,3 mM e 2-deoxi-glicose 10 mM, um análogo não utilizável da D-glicose. A privação de oxigênio ocorre a partir da gaseificação com nitrogênio, de acordo com o protocolo desenvolvido por Strasser; Fischer (1995).

3.4 Tratamento das fatias de hipocampo.

Após a obtenção, as fatias de hipocampo foram selecionadas, separadas por grupos de tratamentos e pré-incubadas com tampão KRB por 30 minutos a 37 °C (Molz et al., 2008).

No grupo controle (Controle), as fatias de hipocampo foram incubadas com tampão KRB durante todo o protocolo experimental (Fig. 1).

No grupo guanosina (GUO) e privação de glicose e oxigênio + guanosina (PGO + GUO), as fatias hipocampais foram incubadas com guanosina na concentração de 100 µM, durante os 120 minutos de reoxigenação (Fig. 1).

No grupo inibidor (INI) e privação de glicose e oxigênio + inibidor (PGO + INI), as fatias de hipocampo foram incubadas com inibidores das enzimas óxido nítrico sintase (NOS): i) N ω -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 1 mM; BROWN et al., 2000), inibidor não-seletivo das NOS; ii) N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina (1400W, 50 µM; CARDENAS et al., 1998), inibidor seletivo da isoforma iNOS e; iii) 7-Nitroindazol (7-NI, 100 µM; KOVACS et al., 2009), inibidor seletivo da isoforma nNOS. As fatias permaneceram incubadas com os inibidores por 120 minutos durante o período de reoxigenação (Fig. 1).

As fatias de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio foram incubadas com tampão isquêmico por um período de 15 minutos, após o período de pré-incubação. Em seguida, o tampão isquêmico foi removido e as fatias foram incubadas com tampão KRB (grupo PGO), com guanosina (GUO) (grupo PGO + GUO) ou com os inibidores das NOS (INI) (PGO + INI) e mantidas por 120 minutos para simular as condições de reoxigenação tecidual (Fig. 1).

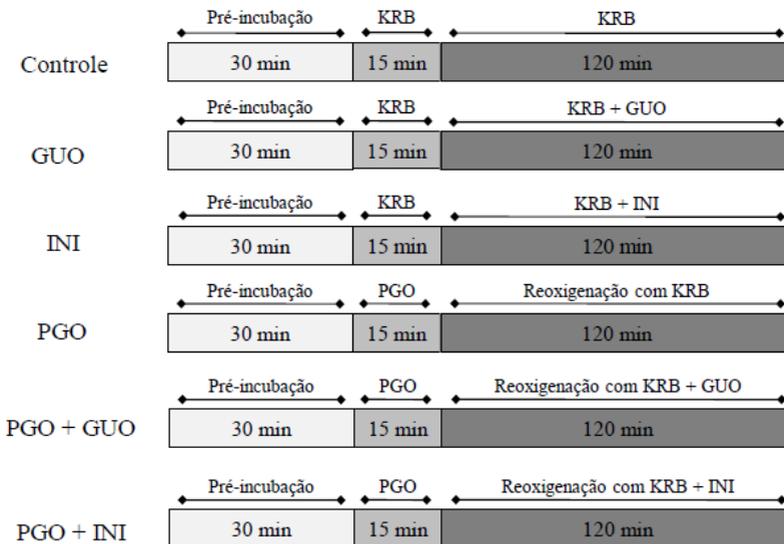


Figura 1: Modelo experimental de isquemia cerebral *in vitro* em fatias de hipocampo de ratos.

Ademais, também utilizamos diferentes tempos de reoxigenação para avaliarmos alguns parâmetros relacionados com o metabolismo bioenergético das fatias de hipocampo submetidas ao dano da privação de glicose e oxigênio. Desta forma, durante o período de reoxigenação, após a incubação com o tampão isquêmico por 15 minutos, as fatias de hipocampo foram incubadas em um tampão composto por KRB e meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – Gibco®), composto por 50% de KRB, 50% de DMEM e 20 mM de HEPES (pH 7.4) e permaneceram neste tampão por, no máximo, 180 minutos.

3.5 Avaliação da viabilidade celular.

A viabilidade celular das fatias de hipocampo de ratos foi avaliada através do método de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium). O método baseia-se na capacidade de células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT, por meio de desidrogenases mitocondriais ou outros agentes redutores endógenos, em cristais de formazan de cor azul-púrpura que se acumulam no citoplasma celular (MOSMANN, 1983).

Findo o período de reoxigenação (120 minutos), as fatias de hipocampo foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL) em KRB por 20 minutos a 37 °C. Em seguida, as fatias de hipocampo foram retiradas do meio contendo MTT e foram transferidas para placa de 96 poços. Nesta placa as fatias foram incubadas individualmente com dimetil sulfóxido (DMSO – 200 µL/poço), em temperatura ambiente, por 30 minutos, resultando em um composto colorido, cuja densidade ótica foi analisada em leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) no comprimento de onda de 550 nm. Utilizando-se este mesmo protocolo, a viabilidade celular das fatias de hipocampo também foi avaliada após a PGO seguida por 180 minutos de reoxigenação.

3.6 Avaliação do dano celular.

Para avaliar o dano celular induzido pelo modelo da PGO em fatias de hipocampo de ratos, utilizamos o método de incorporação de iodeto de propídio (IP). Em células que apresentam a membrana plasmática íntegra o IP, um composto polar, não consegue difundir-se para o citoplasma da célula. No entanto, se a integridade da membrana plasmática encontra-se comprometida, o IP atravessa esta barreira e se difunde no citoplasma celular. No interior da célula, o IP intercala-se com a molécula de DNA e torna-se fluorescente quando excitado por luz em comprimento de onda específico (NORABERG et al., 1999).

Ao término do período de reoxigenação (120 minutos) as fatias de hipocampo foram incubadas com IP (7 µg/mL) em KRB por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as fatias de hipocampo foram retiradas do meio contendo IP e foram transferidas para placa de 96 poços. Nesta placa as fatias foram incubadas individualmente com tampão KRB (200

$\mu\text{L/poço}$) e a fluorescência foi mensurada em leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) com os comprimentos de onda de 535 e 617 nm, para excitação e emissão, respectivamente (PRINGLE et al., 1996).

3.7 Análise da geração de espécies reativas.

A produção de espécies reativas foi mensurada a partir da sonda molecular 2',7'-diclorofluoresceína diacetato – DCFH-DA.

Seu mecanismo de ação ocorre no citoplasma celular, a partir de sua difusão através da membrana celular. No citoplasma, DCFH-DA é hidrolisada por esterases intracelulares a forma não fluorescente DCFH. Na presença de EROs e/ou ERNs (FERREIRA et al., 2012), DCFH é rapidamente oxidado e forma DCF, um composto fluorescente (TANAKA et al., 2002).

Ao término do período de reoxigenação (120 minutos), as fatias de hipocampo foram incubadas com DCFH-DA ($80 \mu\text{M}$) em KRB por 30 minutos a 37°C . Em seguida, as fatias de hipocampo foram retiradas do meio contendo DCFH-DA e foram transferidas para placa de 96 poços. Nesta placa as fatias foram incubadas individualmente com tampão KRB ($200 \mu\text{L/poço}$) e a fluorescência foi mensurada em leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) com os comprimentos de onda de 480 e 525 nm, para excitação e emissão, respectivamente (EGEA et al., 2007).

3.8 Avaliação da produção óxido nítrico.

A produção de NO foi mensurada a partir da sonda molecular 4-5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA), conforme a metodologia descrita por Hernanz et al. (2008), adaptando-se o protocolo para nosso modelo experimental.

A sonda DAF-2 DA difunde-se através da membrana celular e é hidrolisada por esterases intracelulares para a forma não fluorescente DAF-2. Na presença de NO, DAF-2 reage com este composto para dar origem à forma fluorescente DAF-2T (KOJIMA et al., 1998).

Neste protocolo, as fatias de hipocampo foram incubadas com DAF-2 DA ($10 \mu\text{M}$) durante o período de reoxigenação. Aos 60 minutos

desta etapa, o meio de incubação de todos os tratamentos foi substituído por meio de incubação contendo DAF-2 DA em KRB. As fatias permaneceram incubadas neste meio por 60 minutos, completando a etapa de 120 minutos de reoxigenação do protocolo experimental.

Nos grupos incubados com guanosina (GUO e PGO + GUO) ou com os inibidores (INI e PGO + INI) durante a reoxigenação, ao substituir o meio para a incubação com DAF-2 DA, também foram mantidas as incubações com guanosina e/ou com os inibidores até o término do protocolo experimental.

Findo o período de reoxigenação, as fatias de hipocampo foram retiradas do meio contendo DAF-2 DA e foram transferidas para placa de 96 poços. Nesta placa as fatias foram incubadas individualmente com tampão KRB (200 μ L/poço) e a fluorescência foi mensurada em leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) com os comprimentos de onda de 485 e 520 nm, para excitação e emissão, respectivamente (HERNANZ et al., 2008).

3.9 Avaliação da produção de peroxinitrito.

Para avaliar a produção de peroxinitrito (ONOO^-) nas fatias de hipocampo foi utilizada a sonda molecular diidrorodamina 123 (DHR 123), conforme a metodologia descrita por Frantseva et al. (2001), adaptando-se o protocolo para nosso modelo experimental.

A sonda lipofílica, não fluorescente, DHR 123 difunde-se através da membrana celular e na presença de ONOO^- é oxidada para sua forma fluorescente rodamina 123 (ROD 123) (KOOY et al., 1994).

Ao término do período de reoxigenação (120 minutos), as fatias de hipocampo foram incubadas com DHR 123 (15 μ M) em KRB por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as fatias de hipocampo foram retiradas do meio contendo DHR 123 e foram transferidas para placa de 96 poços. Nesta placa as fatias foram incubadas individualmente com tampão KRB (200 μ L/poço) e a fluorescência foi mensurada em leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) com os comprimentos de onda de 485 e 525 nm, para excitação e emissão, respectivamente (VELAZQUEZ et al., 1997).

3.10 Análise da capacidade antioxidante da guanosina.

Para investigar se a guanosina apresenta atividade antioxidante *in vitro* foi utilizado o método descrito por Brand-Willians et al. (1995). O método consiste em medir a redução de difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), um radical estável, espectrofotometricamente através da diminuição da absorbância a 518 nm, a partir da reação de transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (BRAND-WILLIANS et al., 1995).

Para avaliar a capacidade antioxidante, foram utilizadas diferentes concentrações de guanosina: 10 μM , 100 μM , 500 μM ou 1 mM. Como controle positivo para esta reação foi utilizado o antioxidante ácido ascórbico (10 μM).

Para a reação, a guanosina foi diluída em uma solução de acetato de sódio (100 mM) para um volume final de 500 μL . Em seguida 500 μL de etanol foram adicionados à solução de acetato de sódio contendo guanosina nas diferentes concentrações avaliadas, atingindo um volume final de 1.000 μL . Logo em seguida, 250 μL de DPPH (500 μM) foram adicionados. O experimento foi conduzido em temperatura ambiente. Após 30 minutos a reação foi transferida para uma placa de 96 poços. Nesta placa foi pipetado, em triplicata por tratamento, 200 μL /poço e a absorbância foi mensurada em leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) em comprimento de onda de 518 nm (COLLE et al., 2012).

3.11 Avaliação da atividade sequestradora de óxido nítrico pela guanosina.

Para investigar se a guanosina apresenta capacidade sequestradora de NO, foi realizado um ensaio *in vitro* de produção de NO por nitroprussiato de sódio (GREEN et al., 1982). Neste ensaio, o NO foi produzido a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (SNP, 5 mM) em tampão fosfato salina (PBS, pH 7.4). O método baseia-se na reação do NO com O₂ para produzir nitrito (NO₂⁻), o qual é quantificado espectrofotometricamente pela reação com o composto de Griess (Sigma Aldrich®).

A reação foi conduzida em temperatura ambiente, com 50 μL de SNP na ausência (Controle) ou presença de guanosina (10 μM , 100 μM , 500 μM ou 1 mM) por 120 minutos, para um volume final de 500 μL . No grupo controle foi adicionado 450 μL de água Milli-Q. Após 120 minutos, foi adicionado o reagente de Griess (500 μL) e procedeu-se sua homogeneização (COLLE et al., 2012).

Em seguida, a reação foi transferida para uma placa de 96 poços. Nesta placa foi pipetado, em triplicata por tratamento, 200 μL /poço. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 550 nm em leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF). Os valores obtidos foram comparados com os valores do grupo controle para determinar o percentual de inibição da reação do NO_2^- com o reagente de Griess, os quais forneceram um índice para avaliar se a guanosina apresenta atividade sequestradora de NO (COLLE et al., 2012).

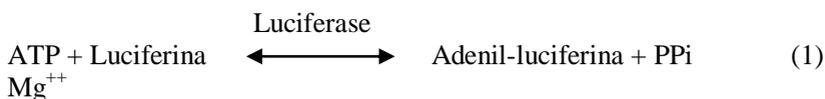
3.12 Análise do potencial de membrana mitocondrial.

Para analisar o potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) foi utilizando a sonda fluorescente tetrametilrodamina-etil-éster (TMRE). TMRE é uma sonda catiônica, lipofílica, que é acumulada na matriz mitocondrial quando esta apresenta-se carregada negativamente (EHRENBERG et al., 1988).

Ao término do período de reoxigenação as fatias de hipocampo foram incubadas com TMRE (100 nM) em KRB por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as fatias de hipocampo foram retiradas do meio contendo TMRE e foram transferidas para placa de 96 poços. Nesta placa as fatias foram incubadas individualmente com tampão KRB (200 μL /poço) e a fluorescência foi mensurada em leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) com os comprimentos de onda de 550 e 590 nm, para excitação e emissão, respectivamente (LORRIO et al., 2013).

3.13 Avaliação dos níveis intracelulares de ATP.

A quantificação dos níveis de ATP foi realizada pelo método bioluminescente luciferina-luciferase. O princípio do método baseia-se nas seguintes reações:



Em uma reação de ativação inicial (1), a luciferina é adenilada por uma molécula de ATP para dar origem a adenil-luciferina e pirofosfato livre (PPi). Na etapa seguinte da reação (2), a adenil-luciferina é oxidada por O₂ molecular, resultando em uma molécula de oxiluciferina, adenosina monofosfato (AMP), dióxido de carbono (CO₂) e fótons (luz) (BOWERS et al., 1993).

Considerando que a emissão de fótons baseia-se na própria reação química e não necessita de qualquer luz de excitação, este fenômeno é referido como bioluminescência. Ademais, como a molécula de ATP é o fator limitante da reação, a bioluminescência emitida é considerada como proporcional aos níveis de ATP da amostra analisada (FOSTER et al., 2006).

Os níveis intracelulares de ATP foram mensurados imediatamente após os 15 minutos de privação de glicose e oxigênio e também após 120 e 180 minutos de reoxigenação. Para o ensaio, as fatias de hipocampo foram homogeneizadas, a partir de um *pool* de três fatias, em 160 µL de água Milli-Q. A este homogeneizado foi adicionado 40 µL de ácido tricloroacético (2%). O homogenato foi centrifugado por 3 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. Em seguida, retirou-se aproximadamente 200 µL do sobrenadante e verificou-se o pH, ajustando-se a neutralização deste sobrenadante para um pH próximo a 7,4 com adição de tris-(hidroximetil)-aminometano 1 M (OLIVEIRA et al., 2002).

O nível de ATP presente nas amostras foi avaliado pelo kit de ensaio bioluminescente, conforme as orientações do fabricante (Sigma Aldrich®). A mensuração da concentração de ATP, nas amostras avaliadas, foi obtida através de uma curva padrão com concentrações conhecidas de ATP.

3.14 Avaliação dos níveis extracelulares de lactato.

A quantificação dos níveis extracelulares (meio de incubação) de lactato foi realizada utilizando um analisador eletroquímico (YSI 2700 STAT®, Yellow Springs, Ohio, EUA).

Neste protocolo, as fatias de hipocampo foram incubadas individualmente em 200 μ L de KRB. Os níveis de lactato foram analisados imediatamente após os 15 minutos de privação de glicose e oxigênio e também após 120 e 180 minutos de reoxigenação.

Para o ensaio, foi realizada a coleta de 100 μ L do meio de incubação das fatias de hipocampo para análise do nível extracelular de lactato. As amostras permaneceram congeladas (-70 °C) até o momento da análise. Os resultados foram expressos em nmol/L.

3.15 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão. Para a análise estatística, utilizamos o *software* GraphPad Prism 5.0®. Os dados foram avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo Teste de Tukey. Diferenças estatísticas foram aceitas quando $p < 0,05$.

Para a análise de correlação linear utilizamos o *software* GraphPad Prism 5.0®.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em duas partes. Inicialmente apresentamos os resultados relacionados com o estresse oxidativo ocasionado a partir do dano da PGO em fatias de hipocampo de rato. Em seguida, apresentamos os resultados relacionados com o dano bioenergético provocado pela PGO nas fatias hipocampais.

4.1 Avaliação do efeito neuroprotetor da guanosina sobre o estresse oxidativo em fatias hipocâmpais submetidas à PGO.

Na primeira parte de nosso trabalho buscamos avaliar se o nucleosídeo guanosina proporciona neuroproteção, frente ao estresse oxidativo, às fatias de hipocampo submetidas ao dano causado pela PGO. Inicialmente avaliamos dois parâmetros de viabilidade celular: i) redução do sal de MTT e ii) incorporação de IP. Em seguida, avaliamos se a guanosina apresenta um papel neuroprotetor sobre os seguintes parâmetros relacionados ao estresse oxidativo: i) produção de EROs e ERNs, ii) produção de NO, iii) produção de ONOO⁻ e iv) potencial de membrana mitocondrial. Além destes ensaios, também avaliamos se a guanosina apresenta uma atividade antioxidante intrínseca a partir de dois métodos: i) redução do radical DPPH e ii) atividade sequestradora de NO.

4.1.1 Avaliação da viabilidade celular das fatias de hipocampo.

Para avaliar o dano celular induzido pela PGO nas fatias de hipocampo de ratos, realizamos a análise da viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT. Observamos que as fatias incubadas em situação de PGO apresentaram uma significativa diminuição da viabilidade celular. Por outro lado, quando a guanosina é incubada no período de reoxigenação após a PGO, observamos uma prevenção da perda da viabilidade celular, demonstrando assim o papel neuroprotetor deste nucleosídeo (Fig. 2).

Visando avaliar o papel das enzimas NOS sobre a viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas à PGO, foi utilizado o inibidor L-NAME e observou-se que este inibidor confere proteção às fatias de hipocampo sujeitas a PGO. Além disto, em situação controle o uso deste inibidor não acarreta em diminuição da viabilidade celular. Entretanto, quando as fatias de hipocampo, submetidas à PGO, foram incubadas concomitantemente com L-NAME + GUO, não foi observado efeito neuroprotetor (Fig. 2 A). Este resultado sugere que o mecanismo de neuroproteção da guanosina pode estar envolvido com alguma das isoformas das enzimas NOS.

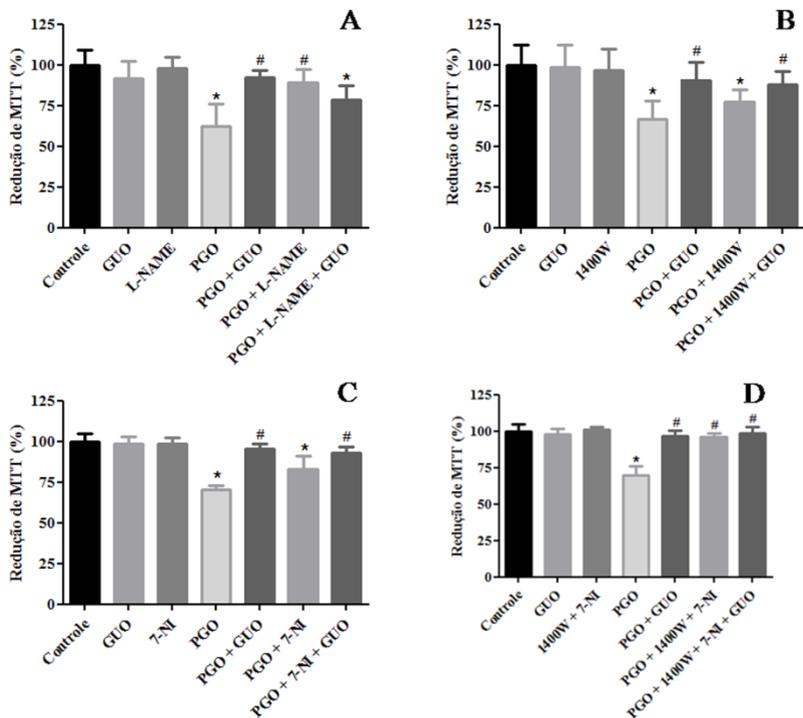


Figura 2 – Avaliação da atividade neuroprotetora promovida pela guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias de hipocampo foram incubadas em situação controle (Controle), controle com guanosina (GUO), por 15 minutos de PGO seguidos de 120 minutos de reoxigenação na ausência (PGO) ou presença de guanosina (PGO + GUO). Quando presente, L-NAME (1 mM, A); 1400W (50 μ M, B); 7-NI (100 μ M, C) ou 1400W + 7-NI (50 μ M; 100 μ M, respectivamente D) foram incubados durante o período de reoxigenação (120 minutos). Nas fatias incubadas com os inibidores + GUO, os inibidores foram incubados 15 minutos antes da adição de GUO. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do MTT. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação aos grupos controles; $p < 0,05$. # representa média diferente em comparação ao grupo PGO; $p < 0,05$; (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Desta forma, a partir do resultado obtido com o inibidor não-seletivo das NOS, L-NAME, decidimos avaliar a viabilidade celular das fatias de hipocampo utilizando inibidores seletivos das NOS. Ao utilizarmos os inibidores 1400W (seletivo para a isoforma iNOS) e 7-NI (seletivo para a isoforma nNOS), observamos que estes inibidores, em situação controle, não alteram a viabilidade celular das fatias de hipocampo. Além disto, não foi observada alteração na diminuição da viabilidade celular das fatias de hipocampo quando submetidas à PGO na presença de 1400W ou 7-NI. Por outro lado, o tratamento com 1400W + GUO ou 7-NI + GUO nas fatias de hipocampo que sofreram PGO não alterou o efeito protetor da guanosina, apresentando recuperação da viabilidade celular após a PGO (Fig. 2 B e C, respectivamente), demonstrando que a inibição da atividade da isoforma iNOS ou da isoforma nNOS não bloqueia o efeito neuroprotetor da guanosina.

Em seguida, realizamos o tratamento com os inibidores 1400W e 7-NI concomitantemente. Em situação controle as fatias de hipocampo não sofreram alteração na viabilidade celular. Não obstante, o uso simultâneo de ambos inibidores conferiu uma recuperação da viabilidade celular das fatias de hipocampo que sofreram PGO. Além disto, o tratamento com ambos inibidores, em conjunto com a guanosina, também apresentou uma recuperação da viabilidade celular (Fig. 2 D). Este resultado sugere que a inibição das isoformas iNOS e nNOS, as quais são correlacionadas com mecanismos de estresse oxidativo (ALMEIDA et al., 2004; MORO et al., 2004), proporciona proteção celular, impedindo a perda da viabilidade celular.

4.1.2 Avaliação do dano celular induzido pela PGO em fatias de hipocampo.

Em diversos estudos (CIMAROSTI et al., 2001; PRINGLE et al., 1996; RUNDEN-PRAN et al., 2005), a incorporação celular de IP tem sido utilizada como um marcador para células mortas ou que estão em processo de morte celular.

Nossos resultados mostraram um aumento na incorporação de IP nas fatias de hipocampo que sofreram PGO, demonstrando que o modelo de isquemia cerebral utilizado neste trabalho induz alteração na permeabilidade da membrana celular. Por outro lado, não foi observado aumento na incorporação de IP nas fatias de hipocampo que sofreram PGO e tiveram a guanosina incubada durante o período de reoxigenação. Este resultado demonstra que a guanosina promove proteção nas fatias de hipocampo de rato contra a PGO (Fig. 3).

Também observamos que o uso dos inibidores L-NAME (Fig. 3 A), 1400W (Fig. 3 B), 7-NI (Fig. 3 C) ou 1400W + 7-NI (Fig. 3 D), proporcionam proteção para as fatias de hipocampo sujeitas à PGO, pois não foi observado a incorporação de IP nestas fatias. Além disto, na avaliação do mecanismo protetor desempenhado pela guanosina, frente à PGO, observamos que nenhum dos inibidores das enzimas NOS foi capaz de bloquear o efeito neuroprotetor da guanosina. Este resultado sugere que a inibição da síntese de NO pode ser uma via de neuroproteção celular, também induzida pela guanosina, impedindo o aumento da permeabilidade da membrana celular.

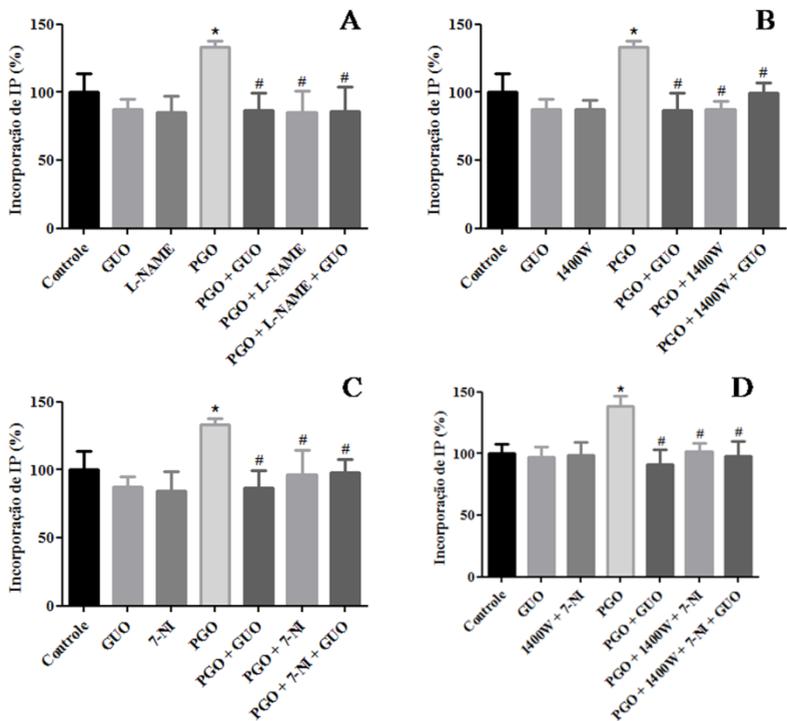


Figura 3 – Avaliação da atividade neuroprotetora promovida pela guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias de hipocampo foram incubadas em situação controle (Controle), controle com guanosina (GUO), por 15 minutos de PGO seguidos de 120 minutos de reoxigenação na ausência (PGO) ou presença de guanosina (PGO + GUO). Quando presente, L-NAME (1 mM, A); 1400W (50 μ M, B); 7-NI (100 μ M, C) ou 1400W + 7-NI (50 μ M; 100 μ M, respectivamente D) foram incubados durante o período de reoxigenação (120 minutos). Nas fatias incubadas com os inibidores + GUO, os inibidores foram incubados 15 minutos antes da adição de GUO. A avaliação da morte celular foi realizada através do método de incorporação de IP. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação aos grupos controles; $p < 0,05$. # representa média diferente em comparação ao grupo PGO; $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

4.1.3 Análise da produção de espécies reativas em fatias de hipocampo.

A partir dos resultados obtidos com a guanosina, indicando que este nucleosídeo é capaz de prevenir a diminuição da viabilidade celular e impedir o aumento na incorporação de IP nas fatias de hipocampo de rato submetidas à PGO, buscamos avaliar se a guanosina pode atenuar a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio induzidas pela PGO/reoxigenação.

Para este ensaio, utilizamos a sonda molecular DCFH-DA. Esta sonda, após difundir-se para o citosol celular, pode ser oxidada tanto por EROs quanto por ERNs (MYHRE et al., 2003).

Como parâmetro para avaliar a funcionalidade da sonda DCFH-DA, utilizamos peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Vetec®) como controle positivo. As fatias de hipocampo incubadas com H₂O₂ (1 mM; TROTTI et al., 1997) apresentaram uma emissão de fluorescência significativamente maior (170.4 ± 21.2%) quando comparada ao valor encontrado para o grupo controle (100.0 ± 13.9%), confirmando sua funcionalidade (dados não mostrados).

Nossos resultados mostraram que ocorre um aumento significativo na síntese de espécies reativas em fatias de hipocampo submetidas à PGO, indicado pelo aumento na emissão de fluorescência. A guanosina, quando incubada durante o período de reoxigenação nas fatias de hipocampo sujeitas à PGO, demonstrou atenuar a produção de espécies reativas (Fig. 4). De forma semelhante, a incubação das fatias de hipocampo com o inibidor L-NAME ou a co-incubação de L-NAME + GUO, durante o período de reoxigenação, impediu o aumento na síntese de radicais livres nas fatias de hipocampo que sofreram PGO (Fig. 4 A).

Por outro lado, não foi observado uma redução na produção de espécies reativas nas fatias de hipocampo sujeitas à PGO que foram incubadas com os inibidores seletivos 1400W e 7-NI *per se*. No entanto, quando as fatias de hipocampo foram incubadas com 1400W + GUO ou 7-NI + GUO, observamos que a síntese de radicais livres é atenuada (Fig. 4 B e C, respectivamente).

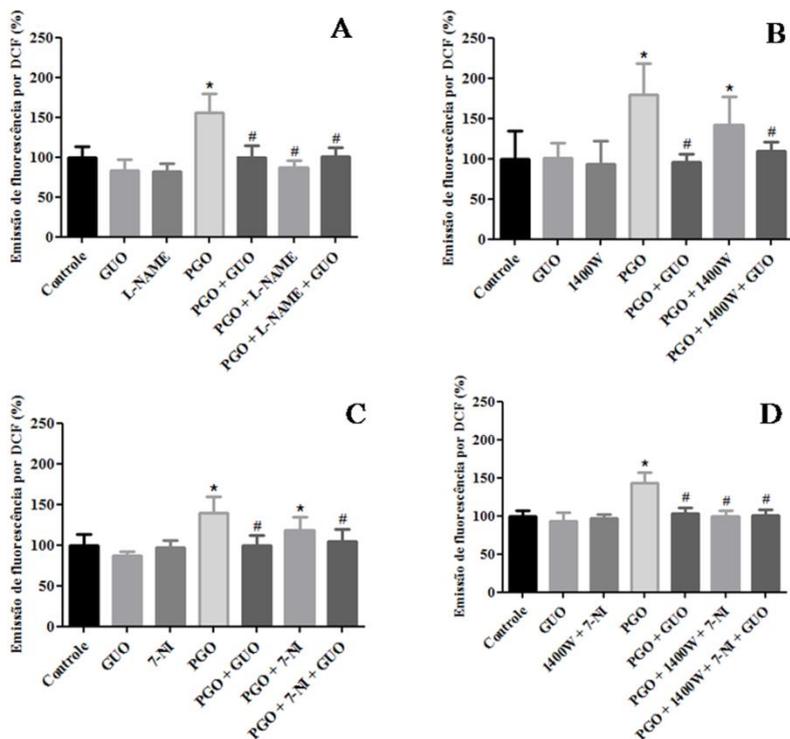


Figura 4 – Avaliação da produção de espécies reativas em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias de hipocampo foram incubadas em situação controle (Controle), controle com guanosina (GUO), por 15 minutos de PGO seguidos de 120 minutos de reoxigenação na ausência (PGO) ou presença de guanosina (PGO + GUO). Quando presente, L-NAME (1 mM, A); 1400W (50 μ M, B); 7-NI (100 μ M, C) ou 1400W + 7-NI (50 μ M; 100 μ M, respectivamente D) foram incubados durante o período de reoxigenação (120 minutos). Nas fatias incubadas com os inibidores + GUO, os inibidores foram incubados 15 minutos antes da adição de GUO. A avaliação da produção de espécies reativas foi realizada através do ensaio de fluorescência utilizando a sonda DCFH-DA. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação aos grupos controles; $p < 0,05$. # representa média diferente em comparação ao grupo PGO; $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Além disto, ao submettermos as fatias de hipocampo à PGO e incubarmos estas fatias com 1400W + 7-NI simultaneamente, observamos uma redução na produção de espécies reativas (Fig. 4 D).

Estes resultados demonstram que a guanosina inibe o aumento da produção de radicais livres e sugerem que ela possa atuar em vias de sinalização celular envolvidas com a síntese de espécies reativas, proporcionando neuroproteção. Também podemos sugerir que as isoformas iNOS e nNOS contribuem de forma significativa para a produção de espécies reativas, pois, a partir de sua inibição com L-NAME ou 1400W + 7-NI, observamos uma significativa diminuição da produção de espécies reativas nas fatias de hipocampo sujeitas à PGO.

4.1.4 Avaliação da síntese de óxido nítrico em fatias de hipocampo.

Conforme nossos resultados demonstraram, a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio aumenta significativamente nas fatias de hipocampo de rato submetidas à PGO. Neste sentido, investigamos a produção de NO nas fatias de hipocampo submetidas à PGO e se a guanosina atua sobre a produção deste radical livre.

Para este ensaio, utilizamos a sonda fluorescente DAF-2 DA. De acordo com Brown et al. (1999) e Kojima et al. (1998), esta sonda possui seletividade para a molécula de NO.

Como parâmetro para avaliar a funcionalidade da sonda DAF-2 DA, utilizamos como controle positivo um composto doador de NO, SNAP (*S*-nitro-*N*-acetil-DL-penicilamina, Sigma Aldrich®). As fatias de hipocampo incubadas com SNAP (1 mM; YANG et al., 2004) apresentaram uma emissão de fluorescência significativamente maior ($224.1 \pm 37.6\%$) quando comparada ao valor encontrado para a emissão de fluorescência das fatias de hipocampo do grupo controle ($100.0 \pm 9.7\%$), confirmando sua funcionalidade (dados não mostrados).

Como podemos observar na Figura 5, ocorreu um aumento significativo na emissão de fluorescência nas fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO, indicando um aumento na síntese de NO. Não obstante, nas fatias de hipocampo que sofreram PGO e que a guanosina foi incubada durante a reoxigenação, a emissão de fluorescência foi semelhante ao encontrado para o grupo controle,

demonstrando que a guanosina consegue atenuar o aumento da síntese de NO.

O uso do inibidor L-NAME também impediu o aumento da emissão de fluorescência ocasionado pelo insulto da PGO (Fig. 5 A).

No entanto, nos tratamentos com os inibidores seletivos 1400W ou 7-NI *per se*, observamos que somente o inibidor 7-NI foi capaz de atenuar o aumento da emissão de fluorescência nas fatias de hipocampo submetidas à PGO (Fig. 5 B e C, respectivamente), sugerindo uma maior participação da atividade da isoforma nNOS, neste modelo de isquemia cerebral, do que a isoforma iNOS.

Para investigar se a isoforma eNOS participa do aumento da produção de NO em fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO, realizamos a incubação simultânea dos inibidores seletivos 1400W e 7-NI durante o período de reoxigenação. Nossos resultados mostraram que a incubação concomitante destes inibidores resultou no abrandamento da emissão de fluorescência nestas fatias de hipocampo (Fig. 5 D), indicando que a isoforma eNOS não participa da síntese de NO neste modelo de isquemia cerebral.

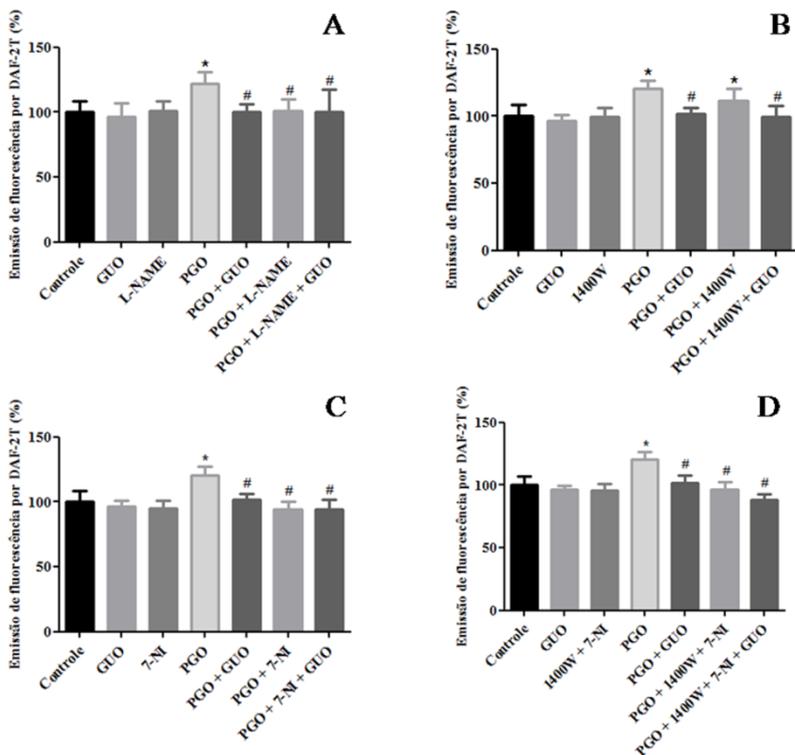


Figura 5 – Avaliação da síntese de NO em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias de hipocampo foram incubadas em situação controle (Controle), controle com guanosina (GUO), por 15 minutos de PGO seguidos de 120 minutos de reoxigenação na ausência (PGO) ou presença de guanosina (PGO + GUO). Quando presente, L-NAME (1 mM, A); 1400W (50 μ M, B); 7-NI (100 μ M, C) ou 1400W + 7-NI (50 μ M; 100 μ M, respectivamente D) foram incubadas durante o período de reoxigenação (120 minutos). Nas fatias incubadas com os inibidores + GUO, os inibidores foram incubados 15 minutos antes da adição de GUO. A avaliação da síntese de NO foi realizada através do ensaio de fluorescência utilizando a sonda DAF-2 DA. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação aos grupos controles; $p < 0,05$. # representa média diferente em comparação ao grupo PGO; $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Além disto, na avaliação do mecanismo protetor desempenhado pela guanósina frente à PGO, observamos que nenhum dos inibidores das enzimas NOS, quando estes foram co-incubados com a guanósina, foi capaz de bloquear o efeito neuroprotetor deste nucleosídeo.

4.1.5 Avaliação da produção de peroxinitrito em fatias de hipocampo.

Considerando os resultados anteriores, onde observamos que a guanósina é capaz de impedir o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e também de inibir o aumento da síntese de NO, nas fatias de hipocampo submetidas à PGO, buscamos, em seguida, analisar a produção de ONOO⁻ nas fatias de hipocampo de ratos submetidas ao dano por PGO e se a guanósina apresenta papel neuroprotetor sobre esta via.

Nossos resultados mostraram que ocorre um aumento significativo da síntese desta molécula nas fatias de hipocampo submetidas à PGO, indicado pelo aumento na emissão de fluorescência. Por outro lado, a guanósina foi capaz de inibir o aumento da síntese de ONOO⁻ nas fatias de hipocampo que foram submetidas ao dano da PGO (Fig. 6).

Ao incubarmos as fatias de hipocampo com o inibidor L-NAME ou com L-NAME + GUO, também observamos uma atenuação da produção de ONOO⁻ (Fig. 6 A).

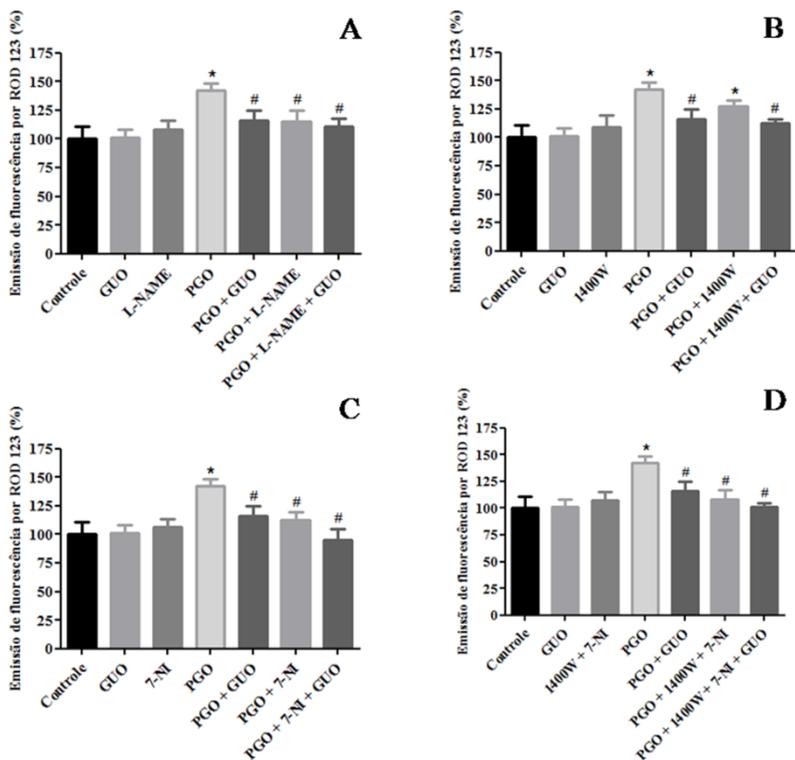


Figura 6 – Avaliação da produção de ONOO⁻ em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias de hipocampo foram incubadas em situação controle (Controle), controle com guanosina (GUO), por 15 minutos de PGO seguidos de 120 minutos de reoxigenação na ausência (PGO) ou presença de guanosina (PGO + GUO). Quando presente, L-NAME (1 mM, A); 1400W (50 μ M, B); 7-NI (100 μ M, C) ou 1400W + 7-NI (50 μ M; 100 μ M, respectivamente, D) foram incubados durante o período de reoxigenação (120 minutos). Nas fatias incubadas com os inibidores + GUO, os inibidores foram incubados 15 minutos antes da adição de GUO. A avaliação da síntese de ONOO⁻ foi realizada através do ensaio de fluorescência utilizando a sonda DHR 123. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação aos grupos controles; $p < 0,05$. # representa média diferente em comparação ao grupo PGO; $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Nos tratamentos com os inibidores seletivos 1400W e 7-NI *per se*, observamos que somente o inibidor 7-NI foi capaz de atenuar a síntese de ONOO⁻ nas fatias de hipocampo submetidas à PGO. No entanto, na co-incubação de 1400W + GUO ou 7-NI + GUO, o efeito neuroprotetor da guanosina é mantido e não ocorre um aumento da produção de ONOO⁻ (Fig. 6 B e C, respectivamente).

Em função deste resultado, o qual foi semelhante ao resultado que obtivemos ao avaliarmos a produção de NO, sugerindo que a isoforma nNOS encontra-se mais ativa, neste modelo de isquemia cerebral, do que a isoforma iNOS, buscamos avaliar se a síntese de ONOO⁻ possui correlação com a síntese de NO.

Desta forma, realizamos uma análise de correlação linear e obtivemos um valor de correlação de $R^2 = 0.9309$ (Fig. 7). Este dado nos indica que a maior parte do NO produzido está sendo usado para gerar ONOO⁻, considerando que na PGO ocorre um predomínio de um meio pró-oxidante.

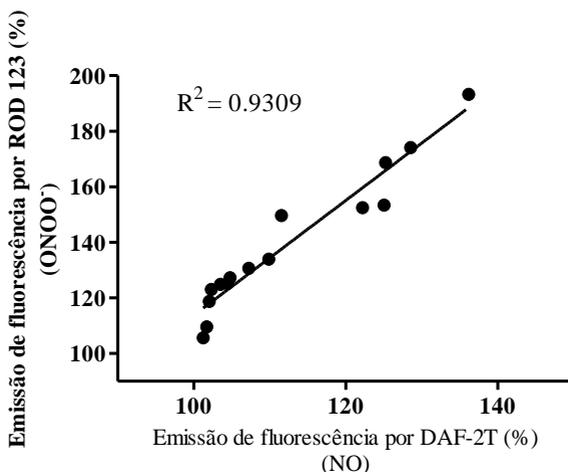


Figura 7 – Correlação linear entre a síntese de ONOO⁻ com a síntese de NO em fatias de hipocampo submetidas à PGO.

Para investigar se a isoforma eNOS participa do aumento da síntese de ONOO⁻ em fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO, a partir do aumento na disponibilidade de moléculas de NO, realizamos a incubação simultânea dos inibidores seletivos 1400W e 7-NI durante o período de reoxigenação. Nossos resultados demonstraram que as fatias de hipocampo incubadas concomitante com estes inibidores tiveram uma emissão de fluorescência significativamente menor, quando comparadas com a emissão de fluorescência das fatias de hipocampo que não receberam tratamento após a PGO, demonstrando que não ocorre um aumento na produção de ONOO⁻ quando as isoformas iNOS e nNOS encontram-se inibidas (Fig. 6 D), corroborando nossa hipótese de que a isoforma eNOS não participa da síntese de NO neste modelo de isquemia cerebral.

4.1.6 Avaliação da capacidade antioxidante da guanosina.

Em função dos resultados obtidos, demonstrando que a guanosina é capaz de atuar em vias de produção de espécies reativas, impedindo um aumento da síntese de EROs e ERNs, decidimos avaliar, a partir do método de redução do radical DPPH, se a guanosina apresenta capacidade antioxidante *per se*.

Para esta avaliação, utilizamos ácido ascórbico como controle positivo, devido as suas conhecidas propriedades antioxidantes (ARRIGONI; TULLIO, 2002). A incubação do radical DPPH com ácido ascórbico resultou em intensa redução no valor de absorbância deste radical, confirmando a significativa capacidade antioxidante do ácido ascórbico (Fig. 8).

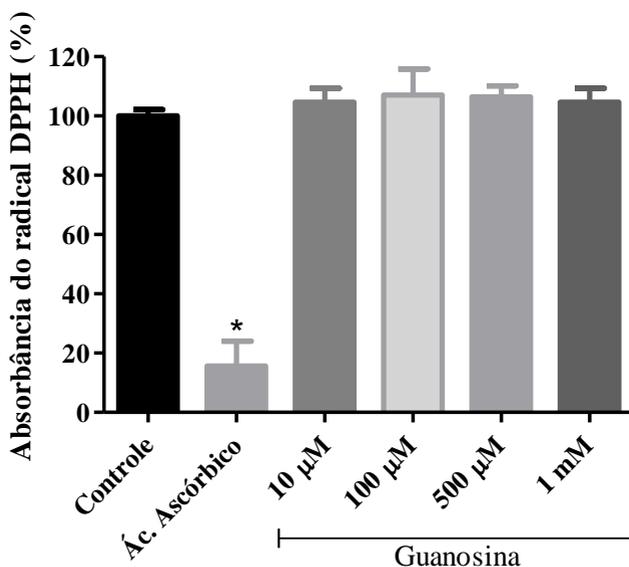


Figura 8 – Avaliação da capacidade antioxidante da guanosina através do método DPPH. A solução de DPPH (500 µM) foi incubada com ácido ascórbico (10 µM), e em diferentes concentrações de guanosina (10, 100 e 500 µM ou 1 mM) e na ausência de droga (Controle). Os valores representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação aos grupos Controle e Guanosina (10, 100 e 500 µM e 1 mM); $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Por outro lado, ao incubarmos o radical DPPH com concentrações crescentes de guanosina, não observamos uma diminuição nos valores de absorbância, demonstrando que a guanosina não possui atividade antioxidante *per se* capaz de reduzir o radical DPPH.

4.1.7 Avaliação da atividade sequestradora de óxido nítrico pela guanosina.

Em seguida, buscamos avaliar se a guanosina possui atividade sequestradora para moléculas de NO, pois nossos resultados mostraram que este nucleosídeo foi capaz de impedir o aumento da síntese de NO e de ONOO⁻ em fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO.

Desta forma, realizamos o ensaio de inibição de formação do radical nitrito (NO₂⁻). Os resultados estão expressos como percentual de inibição em relação ao valor do grupo controle ($24.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ de NO₂⁻).

Nossos resultados demonstraram que a guanosina apresentou, em todas as concentrações testadas, uma pequena, no entanto significativa atividade sequestradora de NO (Fig. 9), sugerindo que esta pode ser uma das vias pela qual a guanosina é capaz de atenuar os níveis de NO e ONOO⁻ nas fatias de hipocampo submetidas à PGO.

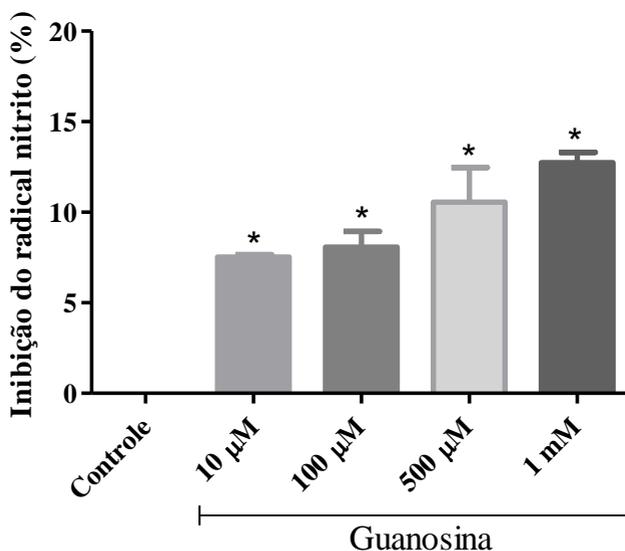


Figura 9 – Avaliação da capacidade sequestradora de NO pela guanosina. A solução contendo SNP (5 mM) foi incubada com diferentes concentrações de guanosina (10, 100 e 500 μM ou 1 mM) e na ausência de droga (Controle). Os valores representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação ao grupo Controle (24.5 \pm 0.3 μM de NO_2^-); $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

4.1.8 Análise do potencial de membrana mitocondrial em fatias de hipocampo.

De acordo com os resultados anteriores, onde observamos um aumento da síntese de EROs e de ERNs, em fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO, decidimos analisar o potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m), pois diversos estudos já demonstraram que o aumento da síntese de radicais livres, dentre eles NO e ONOO^- , possuem a capacidade de inibir os complexos da cadeia transportadora de elétrons, despolarizando a membrana mitocondrial e desencadeando processos apoptóticos (HEALES;0020BOLANOS, 2002; KEELAN et al., 1999; KOWALTOWSKI et al., 2009).

Neste sentido, para investigar o Ψ_m das fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO e se a guanosina apresenta alguma atividade sobre este parâmetro, utilizamos a sonda fluorescente TMRE.

Para a interpretação dos resultados obtidos com a sonda TMRE, utilizamos como parâmetro um grupo controle onde as fatias de hipocampo foram incubadas com o protonóforo FCCP (Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona, Sigma Aldrich®), na concentração de 10 μ M por 120 minutos. Este protonóforo possui a capacidade de despolarizar a membrana mitocondrial interna, a partir do aumento da permeabilidade aos prótons, translocando-os do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial (PERRY et al., 2011).

Nossos resultados demonstraram que as fatias de hipocampo incubadas com FCCP apresentaram uma diminuição na emissão de fluorescência da sonda TMRE ($37.19 \pm 8.56\%$), quando comparadas às fatias do grupo controle ($100.0 \pm 11.46\%$), indicando que a diminuição da fluorescência da sonda representa a perda do Ψ_m das fatias hipocâmpais (dados não mostrados).

Desta forma, nossos resultados indicam que ocorre uma despolarização da mitocôndria nas fatias de hipocampo submetidas à PGO. Também observamos que a guanosina foi capaz de impedir a perda do Ψ_m nas fatias de hipocampo sujeitas ao dano de PGO (Fig. 10).

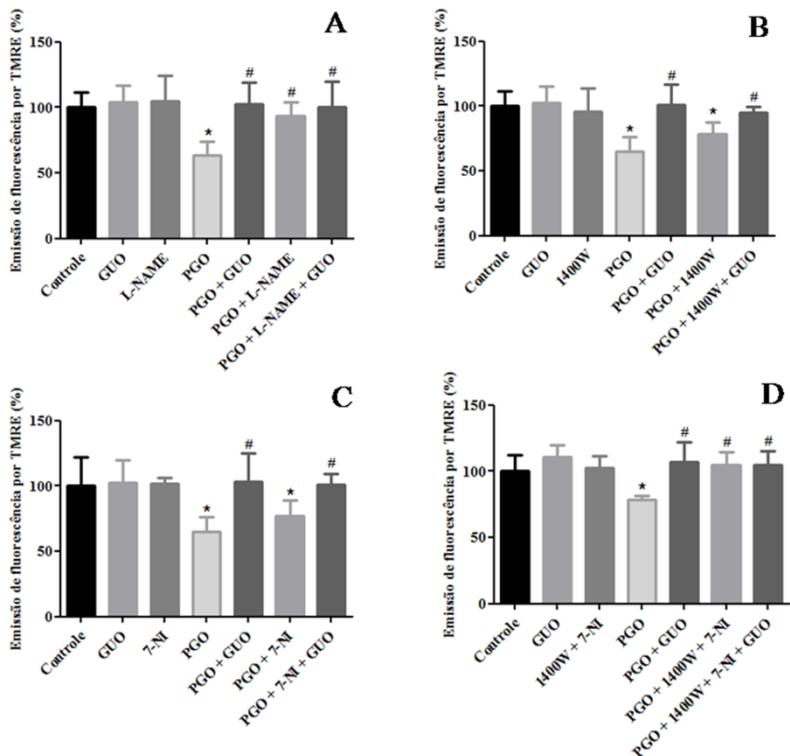


Figura 10 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias de hipocampo foram incubadas em situação controle (Controle), controle com guanosina (GUO), por 15 minutos de PGO seguidos de 120 minutos de reoxigenação na ausência (PGO) ou presença de guanosina (PGO + GUO). Quando presente, L-NAME (1 mM, A); 1400W (50 μ M, B); 7-NI (100 μ M, C) ou 1400W + 7-NI (50 μ M; 100 μ M, respectivamente, D) foram incubados durante o período de reoxigenação (120 minutos). Nas fatias incubadas com os inibidores + GUO, os inibidores foram incubados 15 minutos antes da adição de GUO. A avaliação do Ψ_m foi realizada através do ensaio de fluorescência utilizando a sonda TMRE. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação aos grupos controles; $p < 0,05$. # representa média diferente em comparação ao grupo PGO; $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

A incubação das fatias de hipocampo com o inibidor L-NAME ou a co-incubação de L-NAME + GUO, durante o período de reoxigenação, também foi capaz de impedir a perda do Ψ_m devido ao dano de PGO (Fig. 10 A).

Por outro lado, não foi observado um bloqueio da perda do Ψ_m nas fatias de hipocampo sujeitas à PGO que foram incubadas com os inibidores seletivos 1400W e 7-NI *per se*. No entanto, quando as fatias de hipocampo foram incubadas com 1400W + GUO ou 7-NI + GUO, observamos que não ocorre uma perda do Ψ_m nestas fatias (Fig. 10 B e C, respectivamente). Além disto, ao submetemos as fatias de hipocampo à PGO e incubarmos estas fatias com 1400W + 7-NI simultaneamente, observamos um bloqueio da perda de Ψ_m (Fig. 10 D).

4.2 Avaliação do efeito neuroprotetor da guanosina sobre o dano bioenergético em fatias hipocampais submetidas à PGO.

Na segunda parte deste trabalho buscamos avaliar se o nucleosídeo guanosina proporciona neuroproteção, frente ao dano bioenergético, às fatias de hipocampo submetidas à PGO. Desta forma, avaliamos os seguintes parâmetros relacionados com o metabolismo energético: i) níveis intracelulares de ATP e ii) níveis extracelulares de lactato. Como estas análises foram realizadas em diferentes tempos após a PGO, também avaliamos a viabilidade celular das fatias de hipocampo após 180 minutos de reoxigenação.

4.2.1 Avaliação dos níveis intracelulares de ATP.

Com base em nossos resultados, onde observamos que as fatias hipocampais submetidas à PGO apresentam um significativo aumento na produção de EROs e ERNs, além da significativa perda do potencial de membrana mitocondrial, buscamos avaliar o metabolismo bioenergético das fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO e se o nucleosídeo guanosina atua de forma neuroprotetora sobre este parâmetro.

Nossos resultados mostraram que as fatias de hipocampo submetidas à PGO e mantidas por 120 minutos de reoxigenação, sofreram uma perda significativa dos níveis de ATP. O tratamento com guanosina *per se* não ocasionou uma alteração dos níveis de ATP. Além disto, nas fatias de hipocampo submetidas à PGO e incubadas com guanosina durante o período de reoxigenação, este nucleosídeo não foi capaz de reverter a queda dos níveis de ATP promovido pela PGO (Fig. 11 B).

A partir deste resultado que demonstrou que a guanosina não proporcionou proteção sobre este parâmetro do metabolismo energético, decidimos analisar os níveis intracelulares de ATP das fatias de hipocampo em diferentes tempos após a PGO.

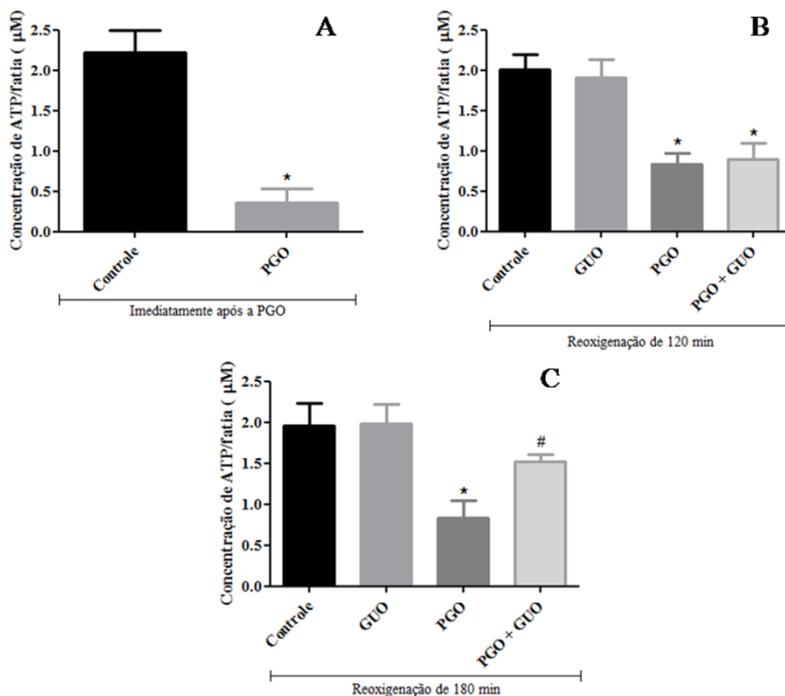


Figura 11 – Avaliação dos níveis intracelulares de ATP em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias de hipocampo foram incubadas em situação controle (Controle), controle com guanosina (GUO), por 15 minutos de PGO seguidos de 120 ou 180 minutos de reoxigenação na ausência (PGO) ou presença de guanosina (PGO + GUO). A avaliação dos níveis de ATP foi realizada a partir de um kit enzimático bioluminescente (luciferina-luciferase) imediatamente após a PGO (A), após 120 minutos de reoxigenação (B) e após 180 minutos de reoxigenação (C). Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação aos grupos controles; $p < 0,05$. # representa média diferente em comparação ao grupo PGO; $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Nossos resultados mostraram que, imediatamente após a PGO, os níveis intracelulares de ATP também sofrem uma significativa queda (Fig. 11 A). Devido aos resultados previamente obtidos por nosso grupo, demonstrando que o efeito neuroprotetor da guanosina somente é observado quando este nucleosídeo é incubado durante o período de reoxigenação, não apresentando efeito protetor quando a guanosina é incubada durante os 15 minutos de PGO (OLESCKOVIKZ et al., 2008), somente as fatias de hipocampo do grupo controle e do grupo PGO foram analisados imediatamente após os 15 minutos de PGO.

Posteriormente, avaliamos os níveis de ATP nas fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO seguido por 180 minutos de reoxigenação. Nossos resultados demonstraram que houve uma queda significativa dos níveis de ATP nas fatias de hipocampo submetidas à PGO. No entanto, observamos que os níveis de ATP são restaurados nas fatias de hipocampo quando estas são incubadas com guanosina (Fig. 11 C).

Ao analisarmos nossos dados, observamos que a diferença encontrada para os níveis de ATP, imediatamente após a PGO, entre o grupo Controle ($2.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$) e o grupo PGO ($0.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$) foi maior do que a encontrada quando os níveis de ATP foram analisados após 120 minutos de reoxigenação (Controle: 2.0 ± 0.2 ; PGO: $0.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$) ou após 180 minutos de reoxigenação (Controle: 1.9 ± 0.3 ; PGO: $0.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$). Imediatamente após a PGO, nossos resultados mostraram uma queda dos níveis de ATP acima de 80% nas fatias de hipocampo; por outro lado, após a PGO e reoxigenação de 120 minutos, a queda dos níveis de ATP foi de 60%, enquanto que após 180 minutos de reoxigenação a queda dos níveis de ATP foi de 57%. Este resultado indica que mesmo na ausência de guanosina, houve um aumento dos níveis de ATP durante o período de reoxigenação nas fatias de hipocampo submetidas à PGO. Não obstante, o aumento dos níveis de ATP, observado ao longo do período de reoxigenação não foi significativamente suficiente para restaurar os níveis de ATP para níveis fisiológicos (Fig. 12).

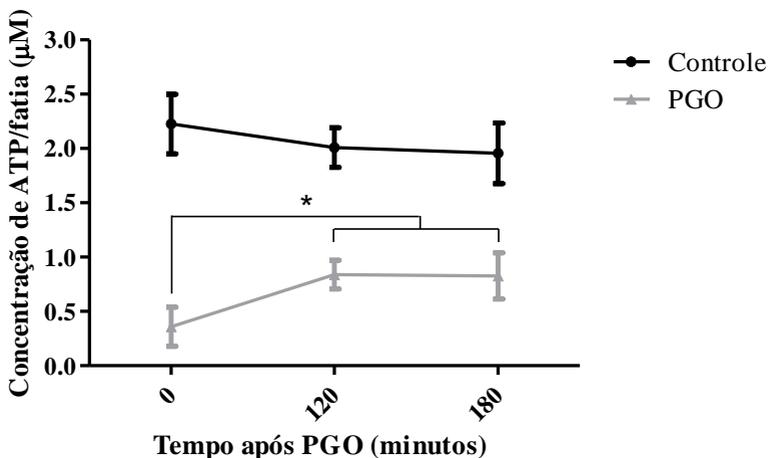


Figura 12 – Comparação dos níveis de ATP nas fatias de hipocampo. Análise comparativa realizada entre as fatias de hipocampo incubadas em situação controle (Controle) *versus* as fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de PGO seguidos de 120 ou 180 minutos de reoxigenação na ausência de guanosina (PGO). A avaliação dos níveis de ATP foi realizada através de um kit enzimático bioluminescente (luciferina-luciferase) imediatamente após a PGO (0), após 120 minutos de reoxigenação (120) e após 180 minutos de reoxigenação (180). Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação ao tempo 0; $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

4.2.2 Avaliação dos níveis extracelulares de lactato.

Considerando que houve uma redução temporária dos níveis de ATP, após a situação isquêmica que as fatias hipocampais foram submetidas, investigamos a manutenção do fornecimento bioenergético no tecido isquêmico, através da análise dos níveis extracelulares de lactato, o qual é produzido através da glicólise anaeróbica.

Nossos resultados mostraram que imediatamente após a PGO houve uma queda significativa dos níveis extracelulares de lactato, ou seja, do lactato presente no meio de incubação (Fig. 13 A).

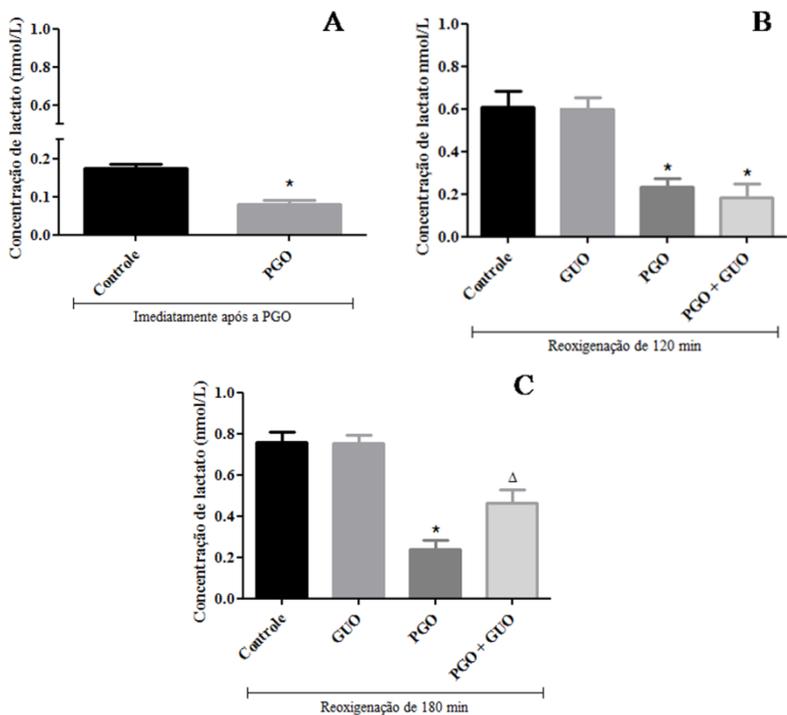


Figura 13 – Avaliação dos níveis de lactato no meio de incubação das fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias de hipocampo foram incubadas em situação controle (Controle), controle com guanosina (GUO), por 15 minutos de PGO seguidos de 120 ou 180 minutos de reoxigenação na ausência (PGO) ou presença de guanosina (PGO + GUO). A avaliação dos níveis de lactato foi realizada a partir de um analisador eletroquímico (YSI 2700 STAT®) imediatamente após a PGO (A), após 120 minutos de reoxigenação (B) e após 180 minutos de reoxigenação (C). Os valores representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação aos grupos controles; $p < 0,05$. Δ representa média diferente em comparação ao grupo PGO e aos grupos controles; $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Em seguida, avaliamos os níveis de lactato presente no meio de incubação das fatias de hipocampo submetidas à PGO seguido por 120 minutos de reoxigenação. Nossos resultados mostraram uma significativa queda dos níveis de lactato no meio de incubação destas fatias. Além disto, não observamos uma alteração dos níveis de lactato no meio de incubação das fatias de hipocampo submetidas à PGO e tratadas com guanosina (Fig. 13 B).

Ao avaliarmos os níveis de lactato presente no meio de incubação das fatias de hipocampo submetidas à PGO seguido por 180 minutos de reoxigenação, observamos uma queda significativa dos níveis de lactato no meio de incubação das fatias de hipocampo sujeitas ao dano da PGO. Não obstante, observamos que o tratamento com a guanosina proporcionou uma recuperação parcial dos níveis extracelulares de lactato (Fig. 13 C).

Ademais, nossos resultados demonstraram que houve um aumento significativo dos níveis de lactato, ao decorrer do período de reoxigenação, no meio de incubação das fatias de hipocampo em situação controle. Da mesma forma, também observamos um aumento dos níveis de lactato, ao longo do período de reoxigenação, no meio de incubação das fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO, mesmo na ausência de guanosina. Não obstante, o aumento dos níveis de lactato, observado ao longo do período de reoxigenação nas fatias de hipocampo submetidas à PGO, não foi significativamente suficiente para restaurar os níveis de lactato para níveis fisiológicos (Fig. 14).

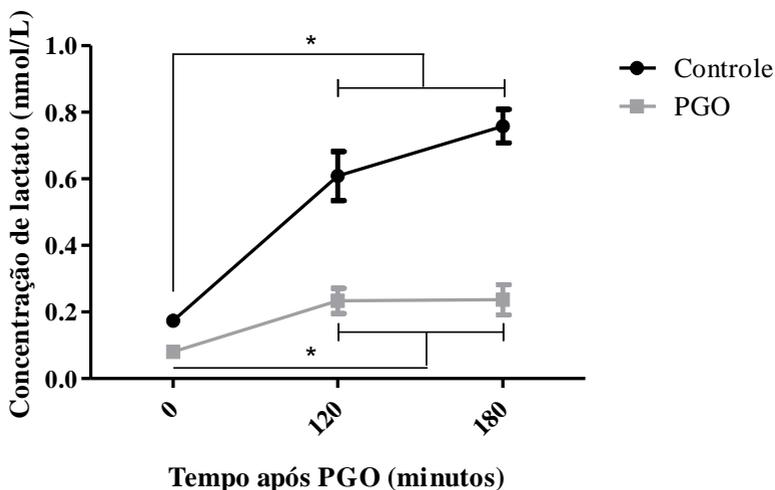


Figura 14 – Comparação dos níveis de lactato no meio de incubação das fatias de hipocampo. Análise comparativa realizada entre as fatias de hipocampo incubadas em situação controle (Controle) *versus* as fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de PGO seguidos de 120 ou 180 minutos de reoxigenação na ausência de guanosina (PGO). A avaliação dos níveis de lactato foi realizada através de um analisador eletroquímico (YSI 2700 STAT®) imediatamente após a PGO (0), após 120 minutos de reoxigenação (120) e após 180 minutos de reoxigenação (180). Os valores representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação ao tempo 0; $p < 0,05$ (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

4.2.3 Avaliação da viabilidade celular das fatias de hipocampo.

Desde que observamos uma recuperação total dos níveis de ATP e uma recuperação parcial dos níveis de lactato após 180 minutos de reoxigenação, avaliamos se neste período as fatias hipocampais ainda apresentam viabilidade celular. Investigamos também se a guanosina é capaz de proporcionar neuroproteção para as fatias de hipocampo submetidas à PGO e mantidas por 180 minutos de reoxigenação.

Resultados anteriores de nosso grupo já demonstraram que, imediatamente após a PGO de 15 minutos, as fatias de hipocampo sofrem uma significativa perda da viabilidade celular e que a guanosina não proporciona proteção para as fatias de hipocampo quando incubada durante os 15 minutos de PGO (DAL-CIM et al., 2011).

Também já observamos, neste trabalho, que ocorre uma diminuição da viabilidade celular nas fatias de hipocampo submetidas à PGO e mantidas por 120 minutos de reoxigenação; e que a guanosina é capaz de impedir esta perda de viabilidade celular (Fig. 2, sub-item 4.1.1).

Ao avaliarmos as fatias de hipocampo submetidas à PGO e mantidas por 180 minutos de reoxigenação, observamos que a viabilidade celular destas fatias sofre uma significativa perda. No entanto, a incubação com guanosina novamente foi capaz de impedir esta perda da viabilidade celular nas fatias de hipocampo (Fig. 15).

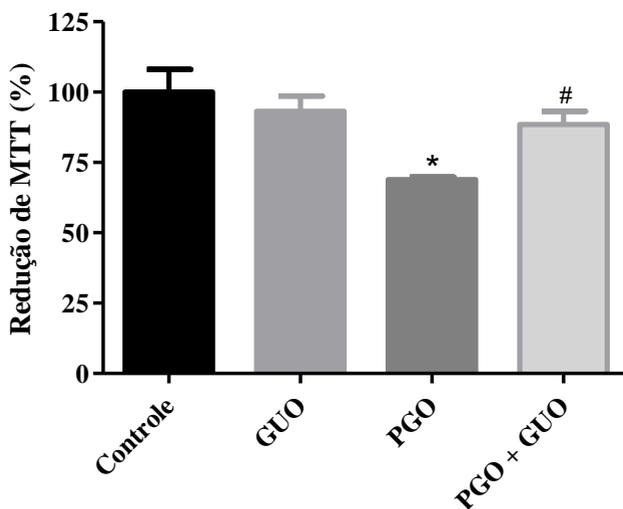


Figura 15 – Avaliação da atividade neuroprotetora promovida pela guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias de hipocampo foram incubadas em situação controle (Controle), controle com guanosina (GUO), por 15 minutos de PGO seguidos de 180 minutos de reoxigenação na ausência (PGO) ou presença de guanosina (PGO + GUO). A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do MTT. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * representa média diferente em comparação aos grupos controles; $p < 0,05$. # representa média diferente em comparação ao grupo PGO; $p < 0,05$; (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, evidências demonstram que as purinas, neste trabalho representadas pela guanosina, desempenham efeito neuroprotetor em diversos modelos de neurotoxicidade e de neurodegeneração (DAL-CIM et al., 2013; LARA et al., 2001; SCHMIDT et al., 2007; VINADE et al., 2003). No entanto, o exato mecanismo de ação da guanosina ainda não é completamente conhecido.

Tendo em vista que o AVC é um problema de grande relevância clínica, devido à sua alta incidência e morbidade, nossa proposta foi avaliar, em um modelo *in vitro* de isquemia cerebral, alguns eventos bioquímicos e celulares relacionados com a neurotoxicidade e em quais destes eventos a guanosina atua como neuroprotetor. Investigamos mecanismos envolvidos com a atividade das enzimas NOS, com o estresse oxidativo e com alterações no metabolismo energético do SNC.

Neste estudo utilizamos como modelo de isquemia cerebral a privação de glicose e oxigênio (PGO) em fatias de hipocampo de ratos. Neste modelo experimental, a citoarquitetura do tecido hipocampal e a organização da matriz extracelular são mantidas, criando um microambiente *in vitro* onde as conexões entre células neuronais e gliais são conservadas (GONG et al., 2001; LAAKE et al., 1999). Além disto, o hipocampo é frequentemente utilizado por ser a área do SNC mais susceptível à isquemia (SCHMIDT-KASTNER; FREUND, 1991).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as fatias de hipocampo submetidas à PGO apresentaram significativa perda de viabilidade celular, sendo que quando estas fatias foram mantidas por 120 minutos de reoxigenação, após a PGO, não foi observada uma melhora na viabilidade celular destas fatias. No entanto, quando a guanosina foi adicionada ao meio de incubação, durante o período de reoxigenação, foi observada uma significativa melhora da viabilidade celular, corroborando os resultados de nosso grupo de pesquisa.

Durante a reoxigenação para a região isquêmica, os danos às células tornam-se acentuados, pois, nesse período ocorre uma grande oferta de O₂ a estas células causando um aumento na produção de EROs e ERNs (CARDEN; GRANGER, 2000). Deste modo, o uso de compostos neuroprotetores, como a guanosina, após um episódio

isquêmico, pode atenuar os efeitos tóxicos causados pela isquemia e melhorar a viabilidade celular.

Além disto, para investigar um provável mecanismo de ação intracelular da guanosina e também analisar a participação das enzimas NOS, fizemos uso de inibidores seletivos para as isoformas iNOS (1400W) e nNOS (7-NI) e, também utilizamos um inibidor não seletivo para as enzimas NOS (L-NAME). Estes inibidores foram incubados, nas fatias de hipocampo, durante o período de reoxigenação, com o objetivo de analisar a participação da atividade das NOS durante o processo de reoxigenação, quando a guanosina atua como neuroprotetor.

As fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO e incubadas com L-NAME apresentaram uma recuperação da viabilidade celular, resultado semelhante ao obtido quando a incubação foi realizada com a guanosina. Este resultado indica que as enzimas NOS podem atuar em processos neurotóxicos para as células que sofreram uma isquemia cerebral.

Huang et al. (1994), utilizando camundongos geneticamente modificados que não expressam a isoforma nNOS, observaram um menor dano isquêmico, medido a partir do volume da área infartada e também observaram uma recuperação celular mais rápida nos camundongos que não expressam a isoforma nNOS.

Por outro lado, não observamos uma recuperação da viabilidade celular nas fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO e co-incubadas com L-NAME + GUO. Este resultado nos levou a considerar a hipótese de que a ação neuroprotetora da guanosina pode estar relacionada com a atividade de alguma isoforma das enzimas NOS ou com seu produto, o NO.

O NO é um dos mediadores biológicos mais ubíquos em células de mamíferos. Em baixas concentrações o NO induz efeitos fisiológicos tais como vasorelaxamento, inibição da agregação de plaquetas e proliferação celular. No entanto, o aumento da concentração celular de NO conduz a efeitos patofisiológicos para a célula, tais como, dano ao DNA, nitração de proteínas e geração de ONOO⁻ (IADECOLA, 1997; NAGAFUJI et al., 1995).

Neste sentido, estudos prévios já demonstraram a correlação das isoformas iNOS e nNOS com efeitos patofisiológicos (IZUMI et al., 1996; NAGAFUJI et al., 1995; SHIBATA et al., 1995) e, por outro lado,

os efeitos protetores da isoforma eNOS (TERPOLILLI et al., 2012; ENDRES et al., 2004).

Desta forma, submetemos as fatias de hipocampo à PGO e incubamos estas fatias com 1400W e 7-NI, *per se*, para avaliar se a inibição das isoformas iNOS ou nNOS, respectivamente, proporcionam proteção celular, permitindo a recuperação da viabilidade celular das fatias de hipocampo. Não obstante, nossos resultados demonstraram que as fatias de hipocampo não recuperaram a viabilidade celular quando incubadas com 1400W ou 7-NI, indicando que a manutenção da atividade da isoforma iNOS ou da isoforma nNOS, é suficiente para manter o aumento da síntese de NO, elevando a concentração desta molécula e impedindo uma recuperação celular. Entretanto, a co-incubação destes inibidores com a guanosina (1400W + GUO ou 7-NI + GUO), proporcionou a recuperação da viabilidade celular das fatias de hipocampo submetidas à PGO. Este resultado indica que a inibição de somente uma das isoformas das enzimas NOS (iNOS ou nNOS) não bloqueia a atividade neuroprotetora desempenhada pela guanosina.

No entanto, alguns trabalhos sobre neuroproteção já sugerem que a combinação de diferentes drogas, como por exemplo, inibidores das NOS com antagonistas de aminoácidos excitatórios (HICKS et al., 1999), ou inibidores das NOS com um antioxidante (SPINNEWYN et al., 1999), ou até mesmo a combinação de dois antioxidantes (SCHMID-ELSAESSER et al., 1999), proporcionam maior neuroproteção do que somente um único agente neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral.

Portanto, decidimos inibir simultaneamente as isoformas iNOS e nNOS, nas fatias de hipocampo submetidas à PGO, a partir da co-incubação dos inibidores 1400W e 7-NI. A incubação concomitante destes inibidores permitiu uma recuperação da viabilidade celular nestas fatias, indicando que as isoformas iNOS e nNOS contribuem com os danos patofisiológicos que ocorrem durante um episódio isquêmico e que a inibição destas isoformas proporciona proteção celular. Ainda, ao realizarmos a incubação de ambos inibidores em conjunto com a guanosina (1400W + 7-NI + GUO), observamos uma recuperação da viabilidade celular das fatias de hipocampo, indicando que a inibição das atividades das enzimas iNOS e nNOS não altera a neuroproteção proporcionada pela guanosina. Além disto, estes resultados sugerem que

o efeito neuroprotetor desempenhado pela guanosina pode estar correlacionado com a atividade da isoforma eNOS, pois, ao inibirmos simultaneamente as três isoformas das enzimas NOS, com o inibidor não-seletivo L-NAME, observamos que o efeito neuroprotetor da guanosina é perdido, conforme descrito anteriormente.

Outros autores também consideram a hipótese de que a isoforma eNOS possui papel protetor para células de tecidos que sofreram dano isquêmico. Huang et al. (1994) observaram que camundongos *knockout* para a isoforma nNOS apresentaram uma menor área isquêmica em um modelo de isquemia por oclusão da artéria cerebral média, conforme comentado anteriormente. No entanto, ao administrarem um inibidor seletivo da isoforma eNOS para estes camundongos *knockout*, o resultado foi um aumento da área infartada, sugerindo que a inibição desta isoforma ocasionou mudanças nas funções hemodinâmicas e plaquetárias que culminaram com o dano celular. Em seu trabalho onde investiga os efeitos adversos do NO em danos isquêmicos, Iadecola (1997) sugere que a perda dos efeitos neuroprotetores, a partir de inibidores não-seletivos das enzimas NOS, podem ser devido a inibição da isoforma eNOS.

Em seguida, buscamos avaliar a viabilidade celular das fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO a partir do método de incorporação de IP. A incorporação de IP tem sido utilizada para distinguir células viáveis de células não viáveis (LAAKE et al., 1999; RUNDEN-PRAN et al., 2005). Neste protocolo, células viáveis excluem o IP da interação com a membrana, enquanto que a membrana de células mortas ou danificadas pode ser penetrada pelo IP, indicando um aumento da permeabilidade da membrana celular (BRANA et al., 2002).

Nossos resultados mostraram que as fatias de hipocampo submetidas à PGO apresentaram uma maior incorporação de IP. Não obstante, a incubação das fatias de hipocampo com guanosina impediu o aumento da incorporação de IP.

O aumento da incorporação de IP também foi inibido quando as fatias de hipocampo foram incubadas com L-NAME. No entanto, diferente do resultado anterior, onde observamos que a co-incubação de L-NAME e GUO resultou na mitigação dos efeitos neuroprotetores da guanosina, neste parâmetro, a incubação simultânea de L-NAME e GUO não resultou na perda dos efeitos protetores da guanosina.

Também observamos que a incubação das fatias de hipocampo com os inibidores seletivos 1400W e 7-NI, ou a co-incubação de ambos, proporcionaram uma atenuação do aumento da incorporação de IP. Ainda, a incubação simultânea de guanosina com os inibidores seletivos também proporcionaram um bloqueio do aumento da incorporação de IP. Desta forma, a partir destes resultados, não podemos sustentar a hipótese de que o efeito protetor proporcionado pela guanosina, em relação ao parâmetro aqui analisado, ou seja, a alteração da permeabilidade da membrana celular esteja correlacionada com a atividade da isoforma endotelial da enzima NOS.

Uma das principais causas de morte celular durante um evento isquêmico é a excessiva liberação de glutamato para o meio extracelular (DANBOLT, 2001). Como o glutamato não é metabolizado extracelularmente, a manutenção da neurotransmissão glutamatérgica ocorre pela presença de transportadores de aminoácidos excitatórios (NICIU et al., 2012). Neste sentido, nosso grupo demonstrou que a PGO induz um significativo comprometimento na captação do glutamato extracelular em fatias de hipocampo de rato. No entanto, no mesmo estudo foi demonstrado que o tratamento com guanosina inibiu a redução da captação de glutamato induzida pela PGO (DAL-CIM et al., 2011).

Nosso e outros trabalhos também demonstram que a neuroproteção promovida pela guanosina está relacionada com a modulação da resposta ao estresse oxidativo ocasionado pelo dano isquêmico e oxidativo (DAL-CIM et al., 2013; HANSEL et al., 2014). A elevada taxa de metabolismo oxidativo durante a isquemia cerebral leva a uma excessiva produção de radicais livres (EROs e ERNs). Este processo desencadeia muitos eventos bioquímicos e celulares, resultando em danos às macromoléculas e consequente ativação de mecanismos de sinalização que levam à morte celular (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009; NANETTI et al., 2011). Além disto, altos níveis de espécies reativas podem inibir a captação de glutamato, diretamente por alterar a atividade dos transportadores ou indiretamente por prejudicar a atividade das bombas Na^+ , K^+ -ATPase (DANBOLT, 2001).

A partir deste contexto, decidimos avaliar a produção de radicais livres nas fatias de hipocampo submetidas à PGO. Para este

protocolo utilizamos a sonda molecular DCFH-DA, uma sonda que não apresenta especificidade e que pode ser oxidada tanto por EROs quanto por ERNs, como por exemplo, H_2O_2 (GUNASEKAR et al., 1995), NO (VOWELLS et al., 1995), $ONOO^-$ (KOOY et al., 1997) O_2^- e $\bullet OH$ (ZHU et al., 1994).

Nossos resultados mostraram que houve um aumento significativo da produção de radicais livres em nosso modelo de isquemia cerebral, corroborando resultados obtidos por outros estudos (DAL-CIM et al., 2013; HANSEL et al., 2014; OLMEZ; OZYURT, 2012). O tratamento com guanosina, durante o período de reoxigenação, nas fatias de hipocampo sujeitas à PGO, foi efetivo em atenuar a acentuada produção de espécies reativas devido ao dano isquêmico.

Já é bem caracterizado que o aumento da concentração de radicais livres pode provocar estresse oxidativo e promover danos celulares (FINKEL; HOLBROOK, 2000), tais como, danos a lipídios, proteínas e ao DNA (LOVE, 1999; OLMEZ; OZYURT, 2012). Neste sentido, o papel neuroprotetor apresentado pela guanosina é de extrema importância, pois, devido a grande quantidade de lipídios com ácidos graxos insaturados, o SNC é altamente susceptível aos danos causado pelo estresse oxidativo (CHAN, 1996).

Nossos resultados também mostraram que nas fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO e incubadas com L-NAME, a síntese de espécies reativas também foi atenuada, indicando que as enzimas NOS atuam significativamente para o aumento da produção de radicais livres neste modelo de isquemia cerebral. A incubação de L-NAME com guanosina também proporcionou um bloqueio do aumento da produção de espécies reativas, demonstrando que os mecanismos de neuroproteção acionados pela guanosina não dependem diretamente da atividade das NOS, mas também sugerem que a guanosina atue através de vias que modulam a atividade destas enzimas.

Por outro lado, a incubação das fatias de hipocampo com os inibidores seletivos 1400W ou 7-NI, *per se*, não foi capaz de controlar o aumento da produção de radicais livres. Inobstante, a co-incubação de 1400W + GUO ou 7-NI + GUO proporcionou uma proteção contra o estresse oxidativo para as fatias de hipocampo submetidas à PGO, impedindo o aumento da síntese de espécies reativas durante o período de reoxigenação.

De forma semelhante, a incubação concomitante de 1400W e 7-NI foi capaz de atenuar o aumento da produção de radicais livres. Este resultado nos indica que as isoformas iNOS e nNOS encontram-se ativas no tecido hipocampal sujeito ao dano isquêmico, contribuindo para o aumento da produção de radicais livres e para o desenvolvimento do dano oxidativo.

A cascata de sinalização celular que conduz ao aumento da síntese de espécies reativas, devido à excessiva liberação de glutamato em um evento isquêmico, inclui a hiperativação das enzimas NOS e um aumento na síntese de NO (TROTTI et al., 1998). O NO é considerado um mensageiro fisiológico do SNC onde todas as células são capazes de sintetizá-lo, porém, a partir de diferentes estímulos (BOLANOS et al., 2009). Ultimamente o NO vem sendo bastante investigado devido as suas propriedades fisiológicas, mas também devido aos seus efeitos patológicos para o SNC (IADECOLA, 1997; MORO et al., 2004). Desta forma, nós buscamos avaliar a produção de NO nas fatias de hipocampo submetidas à PGO, utilizando a sonda DAF-2 DA.

Nossos resultados demonstraram que houve um aumento significativo da produção de NO nas fatias de hipocampo submetidas à PGO. Outros trabalhos já demonstraram que a síntese de NO sofre um acentuado aumento durante o episódio isquêmico, considerando este evento como determinante para o desenvolvimento de danos celulares (FEKETE et al., 2008; KOJIMA et al., 2001).

Kojima et al (2001) demonstraram, a partir de um modelo de PGO, que o aumento da síntese de NO está diretamente relacionada com o aumento no nível intracelular de Ca^{2+} . Além disto, estes autores demonstram que a síntese de NO também é dependente da disponibilidade de O_2 . Desta forma, tais autores observaram que o NO é sintetizado, principalmente, durante o período de reoxigenação e que o nível de NO encontra-se inalterado durante a isquemia, possivelmente devido à baixa disponibilidade de O_2 .

Por outro lado, em nossos resultados, observamos que a guanosina novamente foi capaz de inibir o aumento da síntese de espécies reativas, neste caso de NO, quando incubada durante o período de reoxigenação nas fatias de hipocampo sujeitas à PGO.

Resultados anteriores de nosso grupo demonstraram que a guanosina foi capaz de diminuir a expressão da isoforma iNOS,

induzida pela PGO (DAL-CIM et al., 2013). Molz et al. (2011) demonstraram que o dano com glutamato também induz ao aumento da expressão da iNOS, e que o tratamento com guanosina também foi capaz de prevenir o aumento da expressão desta isoforma. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que não somente a isoforma iNOS é ativada a partir do evento isquêmico, mas também a isoforma nNOS e, eventualmente a eNOS. A futura avaliação da expressão destas isoformas da NOS, em situação isquêmica e de proteção pela guanosina, poderá auxiliar no entendimento dos mecanismos de proteção pela guanosina.

Nossos resultados também mostraram que o aumento da produção de NO é inibido quando as fatias de hipocampo foram incubadas com L-NAME. Em um estudo utilizando um modelo de isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média em ratos, Margail et al. (1997) demonstraram que a administração intraperitoneal de L-NAME, após o episódio isquêmico, resultou em um menor volume de infarto no córtex destes animais. Tais autores concluem que a neuroproteção promovida por L-NAME se deve a inibição das isoformas iNOS e nNOS, por sua vez, impedindo o aumento da síntese de óxido nítrico; no entanto, sentenciam que, devido ao uso de um inibidor não-seletivo das enzimas NOS, tal resultado não pode indicar a respectiva contribuição de tais isoformas para a neuroproteção.

Neste sentido, buscamos avaliar a participação das diferentes isoformas das enzimas NOS para a síntese de NO em nosso modelo de isquemia cerebral. As fatias de hipocampo submetidas ao dano de PGO e incubadas com 1400W não apresentaram uma inibição do aumento da produção de NO, por outro lado, a incubação com 7-NI mostrou-se eficaz em inibir o aumento da síntese de NO. Este resultado indica que, em nosso modelo de isquemia cerebral, a isoforma nNOS encontra-se em maior atividade do que a isoforma iNOS; sugerindo que a isoforma nNOS contribui de forma significativa para o desenvolvimento do dano celular.

Semelhantemente, diversos trabalhos já demonstraram que a isoforma nNOS encontra-se em maior atividade durante um episódio isquêmico e que inibidores desta isoforma são capazes de proporcionar proteção celular contra os danos isquêmicos. Estudos preliminares com 7-NI mostraram que a inibição da isoforma nNOS não causou efeito

adverso sobre o fluxo sanguíneo e proporcionou neuroproteção em um modelo de isquemia focal (YOSHIDA et al., 1994), sendo corroborado seu efeito neuroprotetor posteriormente (ESCOTT et al., 1998). Além disto, outros estudos demonstraram que o inibidor 7-NI fornece proteção em modelos de isquemia cerebral em camundongos (MESENGE et al., 1996) e ratos (SUN et al., 2009).

Iadecola (1997) sugere que o aumento da atividade enzimática da isoforma nNOS é acompanhada paralelamente com o aumento da expressão gênica (RNA mensageiro) da isoforma nNOS na região isquêmica. Além disto, este autor indica que o aumento da concentração de NO, a partir da isoforma nNOS, contribui para a degradação metabólica no tecido isquêmico, resultando em um maior volume de infarto.

Nossos resultados também demonstraram, a partir da co-incubação com 1400W + 7-NI, que a isoforma eNOS não possui atividade catalítica significativa para aumentar a síntese de NO neste modelo de isquemia cerebral.

Endres et al. (2004) concluem que, embora a síntese de NO a partir da isoforma eNOS seja importante para a manutenção do fluxo sanguíneo e para reduzir o volume da área infartada, principalmente nos estágios iniciais de uma isquemia cerebral, o aumento de atividade da isoforma nNOS ao decorrer de um evento isquêmico, resulta no aumento da concentração de NO. Por sua vez, o aumento da concentração de NO na área isquêmica pode desencadear uma maior toxicidade ao reagir com O_2^- e dar origem ao $ONOO^-$, uma molécula extremamente oxidante capaz de causar danos celulares de forma mais intensa do que o NO (IADECOLA, 1997; O'NEILL et al., 2000).

Desta forma, nosso próximo passo foi avaliar se em nosso modelo de isquemia cerebral o NO está reagindo com O_2^- e formando $ONOO^-$. Nossos resultados mostraram que, nas fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO, está ocorrendo tal reação e conseqüentemente um aumento da concentração de $ONOO^-$. Por outro lado, também observamos que a incubação com guanosina foi capaz de impedir o aumento da concentração de $ONOO^-$ nas fatias de hipocampo sujeitas à PGO.

Esta ação neuroprotetora da guanosina, impedindo o aumento da concentração de ONOO^- , provavelmente esta correlacionada com sua ação anterior, ou seja, a inibição do aumento da síntese de NO.

As fatias de hipocampo, incubadas com o inibidor L-NAME, também apresentaram menores níveis de ONOO^- , corroborando nossos resultados de que este inibidor impede a atividade das enzimas NOS e proporciona neuroproteção para o tecido isquêmico. Não obstante, a inibição da isoforma iNOS, nas fatias de hipocampo submetidas a PGO, não foi suficiente para impedir o aumento da produção de ONOO^- . Entretanto, ao inibirmos a isoforma nNOS, observamos uma atenuação da produção de ONOO^- . Este resultado novamente indica que, no modelo de isquemia cerebral adotado neste trabalho, a isoforma nNOS encontra-se em maior atividade do que a isoforma iNOS. Ademais, a incubação simultânea de 1400W com 7-NI, resultou em menor produção de ONOO^- nas fatias de hipocampo, sugerindo que a isoforma eNOS não participa dos processos patofisiológicos neste modelo de isquemia cerebral.

Ao incubarmos as fatias de hipocampo, que foram submetidas ao dano da PGO, com L-NAME + GUO, não observamos uma perda da atividade protetora da guanosina, tanto na avaliação da produção de NO quanto na avaliação da produção de ONOO^- . Da mesma forma, a incubação das fatias de hipocampo com 1400W + GUO ou 7-NI + GUO, não ocasionou um bloqueio da proteção desempenhada pela guanosina, ou seja, a síntese de NO e de ONOO^- foi atenuada a partir da incubação dos diferentes inibidores das NOS em conjunto com a guanosina. Este resultado indica que o mecanismo neuroprotetor desempenhado pela guanosina, frente ao estresse oxidativo, não é dependente da atividade da isoforma endotelial da NOS; no entanto, estes resultados sugerem que um dos mecanismos de proteção desencadeado pela guanosina pode ser através da diminuição ou inibição da atividade das isoformas induzível e/ou neuronal das NOS.

A análise de correlação entre a produção de NO e a produção de ONOO^- em nossa situação experimental, demonstrou uma correlação positiva entre a síntese de NO e a produção de ONOO^- ($R^2 = 0.9309$). Desta forma, podemos inferir que mais de 90% das moléculas de NO, nas fatias de hipocampo submetidas à PGO, sofrem reação com moléculas de O_2^- , formando moléculas de ONOO^- .

Diversos autores têm sugerido que a maioria dos efeitos patofisiológicos associados ao NO, são, de fato, devido à toxicidade do ONOO⁻ (BROWN, 2001; ELIASSON et al., 1999; MORO et al., 2004).

Assim como o NO, o ONOO⁻ pode facilmente difundir-se através das membranas celulares devido a sua alta solubilidade, e, portanto, podem atingir alvos distantes do seu local de produção (LIM et al., 2008). O ONOO⁻ está implicado em danos a vários componentes celulares, incluindo a inibição irreversível da respiração mitocondrial, bloqueio da síntese de ATP, nitração e/ou oxidação de lipídeos, DNA e proteínas mitocondriais e celulares (BOLANOS; HEALES, 2010; BROOKES et al., 1998; MORO et al., 2004).

De maneira geral, estes resultados indicam que, após o dano da PGO por 15 minutos, seguidos por 120 minutos de reoxigenação, em fatias de hipocampo de rato, a enzima NOS em maior atividade é a isoforma nNOS, proporcionando uma grande produção de NO, aumentando a concentração desta molécula e, conseqüentemente, aumentando a concentração de ONOO⁻ e contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento dos danos celulares relacionados com o estresse oxidativo. Todavia, nossos resultados também indicam que o nucleosídeo guanosina possui propriedades neuroprotetoras, em fatias de hipocampo, contra os danos celulares ocasionados pelo aumento da concentração de radicais livres.

De acordo, tem sido descrito um papel antioxidante da guanosina, possivelmente indireto e relacionado à sua capacidade de estimular a captação de glutamato (ROSS et al., 2009).

Neste sentido, para investigar um possível mecanismo de ação da guanosina, para inibir o aumento da produção de espécies reativas, decidimos analisar se este nucleosídeo apresenta atividade antioxidante, utilizando modelos *in vitro* que avaliam o potencial antioxidante de uma determinada substância.

Começamos investigando se a guanosina é capaz de reduzir o radical estável DPPH. No entanto, nossos resultados indicam que a guanosina, em todas as concentrações testadas, não apresenta atividade antioxidante *per se*, capaz de reduzir um radical muito semelhante ao •OH (CHOI et al., 2002).

Também investigamos se a guanosina apresenta atividade sequestradora de NO. A incubação de guanosina, em todas as

concentrações testadas, foi capaz de reduzir a formação de NO_2^- a partir de um doador de NO, indicando uma diminuição nos níveis de NO. No entanto, a capacidade sequestradora de NO pela guanosina, observada neste ensaio, foi pequena (7.5; 8.0; 11.4 e 12.7% para as concentrações de 10 μM ; 100 μM ; 500 μM e 1 mM, respectivamente).

Colle et al. (2012) avaliaram a capacidade sequestradora de NO a partir do extrato de folhas de *Taraxacum officinale* (Dente-de-Leão), uma planta com propriedades antioxidantes. Seus resultados demonstraram, em média, uma inibição de 30% de NO_2^- .

Em nosso protocolo de isquemia cerebral, a concentração de guanosina utilizada é de 100 μM . Nesta concentração, o percentual de inibição de NO_2^- foi de 8.0%, uma diferença de quase 4 vezes menor quando comparado ao resultado obtido por Colle et al. (2012).

De maneira geral, a guanosina apresentou uma pequena atividade sequestradora de NO, no entanto, não podemos afirmar que a guanosina possui uma atividade antioxidante intrínseca, pois este nucleosídeo não foi capaz de reduzir o radical DPPH. Além disto, não existem dados disponíveis na literatura relatando a atividade sequestradora de NO pela guanosina, desta forma, faz-se necessário o uso de outras metodologias para que possamos embasar esta propriedade da guanosina e se a mesma é relevante em relação ao seu efeito neuroprotetor.

Em seguida, levando em consideração que nossos resultados demonstraram um aumento significativo de espécies reativas, em fatias de hipocampo sujeitas à PGO, e que o aumento da concentração de NO e ONOO^- podem causar a inibição da respiração mitocondrial e ocasionar a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (IIJIMA et al., 2006; LIZASOAIN, et al., 1996), decidimos investigar, em fatias de hipocampo submetidas à PGO, outro parâmetro mitocondrial que pode ser afetado pelo aumento da concentração de NO e ONOO^- , o potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m).

Nossos resultados demonstraram que houve uma alteração significativa do Ψ_m das fatias de hipocampo sujeitas à PGO, quando comparado com o Ψ_m das fatias de hipocampo em situação controle.

Por outro lado, ao incubarmos as fatias de hipocampo, submetidas ao dano da PGO, com guanosina, observamos que houve uma recuperação do Ψ_m . De maneira semelhante, as fatias de hipocampo

incubadas com o inibidor L-NAME apresentaram uma recuperação do Ψ_m . Tais resultados podem ser explicados a partir de nossos resultados anteriores, onde observamos que a guanosina proporciona neuroproteção, impedindo o aumento da concentração de radicais livres e que o inibidor L-NAME bloqueia a atividade catalítica das diferentes isoformas das enzimas NOS, impedindo o aumento da síntese de NO e, conseqüentemente, de ONOO⁻. A incubação simultânea, das fatias de hipocampo, com L-NAME + GUO não resultou uma perda da função neuroprotetora da guanosina, sugerindo que a atividade da isoforma eNOS não é um requisito para o mecanismo neuroprotetor desempenhado pela guanosina.

Entretanto, a incubação com os inibidores 1400W ou 7-NI, não proporcionou uma recuperação do Ψ_m nas fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO. Todavia, observamos uma recuperação do Ψ_m quando incubamos as fatias de hipocampo com 1400W + GUO ou 7-NI + GUO, indicando que a recuperação do Ψ_m , nestas condições, é proporcionada pela guanosina e que seu mecanismo de ação não é bloqueado a partir da inibição das isoformas iNOS e nNOS.

Nossos resultados também demonstraram que a co-incubação das fatias de hipocampo, submetidas ao dano da PGO, com os inibidores 1400W e 7-NI, proporcionou uma recuperação do Ψ_m . Este resultado sugere que a atividade da isoforma eNOS não contribui, de forma significativa, para o aumento da produção de NO capaz de bloquear a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e ocasionar a perda do Ψ_m .

Estudos anteriores já demonstraram que, devido ao aumento da síntese de NO e de ONOO⁻, estas moléculas são capazes de interagir com a mitocôndria e prejudicar seu funcionamento normal, inibindo o complexo I (NADH desidrogenase) e o complexo IV (citocromo *c* oxidase) da cadeia transportadora de elétrons (BOLANOS et al, 1994; RADİ et al., 1994; RIOBO et al., 2001). A inibição dos complexos da cadeia transportadora de elétrons pode conduzir a uma depleção da energia celular a partir do bloqueio da transferência de elétrons e da síntese de ATP mitocondrial (ALMEIDA; BOLANOS, 2001; BROWN, 2010).

Neste sentido, buscamos avaliar os níveis intracelulares de ATP nas fatias de hipocampo submetidas à PGO e verificar se a guanosina apresenta algum efeito sobre este parâmetro.

Os resultados que obtivemos demonstraram que, nas fatias de hipocampo, imediatamente após a PGO, ocorre uma queda significativa dos níveis intracelulares de ATP. Esta diminuição dos níveis de ATP também é observada nas fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO seguida por 120 ou 180 minutos de reoxigenação.

Está bem estabelecido que a PGO diminui os níveis intracelulares de ATP e que a recuperação parcial do conteúdo energético pode ocorrer, mas depende da severidade da lesão isquêmica (GALEFFI et al., 2000).

Iijima et al. (2003) avaliaram os níveis intracelulares de ATP em cultura primária de neurônios hipocâmpais. Seus resultados revelaram uma intensa queda dos níveis de ATP. Estes autores sugerem que, em tais condições, o complexo V da cadeia transportadora de elétrons (F_0-F_1 -ATP sintase) teve sua atividade completamente bloqueada.

Em estudo anterior de nosso grupo, Dal-Cim (2012) observou, em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO seguido por 120 minutos de reoxigenação, uma significativa redução do consumo de oxigênio, uma diminuição da atividade de transferência de elétrons e uma redução da atividade do complexo II (succinato desidrogenase) da cadeia transportada de elétrons, sendo que estes efeitos não foram alterados a partir do tratamento com guanosina.

Neste sentido, podemos sugerir que neste modelo de isquemia cerebral, o aumento da produção de radicais livres, dentre estes, de NO e de ONOO⁻, podem estar causando uma inibição da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, uma despolarização do potencial de membrana mitocondrial, resultando no desacoplamento da fosforilação oxidativa e bloqueando a síntese de ATP.

Ao avaliarmos se a guanosina proporciona neuroproteção, restaurando os níveis intracelulares de ATP nas fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO, observamos que este nucleosídeo não foi capaz de restabelecer os níveis de ATP nas fatias de hipocampo após 120 minutos de reoxigenação. No entanto, nossos resultados

demonstraram uma significativa recuperação dos níveis de ATP nas fatias de hipocampo após 180 minutos de reoxigenação.

Estes resultados demonstram que a guanosina é capaz de proporcionar neuroproteção para a mitocôndria, mesmo que este efeito protetor somente foi observado em fatias de hipocampo que permaneceram incubadas por 180 minutos de reoxigenação.

Em seguida, objetivando compreender os mecanismos energéticos celulares das fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO, buscamos avaliar os níveis extracelulares de lactato e se a guanosina possui alguma atividade sobre este parâmetro metabólico.

A glicose é a principal fonte de energia utilizada pelo cérebro para a manutenção da atividade neuronal. Diversos estudos têm demonstrado que células neuronais podem produzir ATP, tanto a partir da metabolização da glicose, bem como a partir do lactato, a fim de manter a sua atividade sináptica (IZUMI et al., 1997; SCHURR et al., 1999). Ainda, tem sido proposto que neurônios obtêm energia, preferencialmente, a partir do lactato extracelular, disponibilizado por astrócitos (TSACOPOULOS; MAGISTRETTI, 1996). Além disto, durante a privação de energia, a adição de monocarboxilatos tem sido utilizada para restaurar a função sináptica e também como neuroprotetor em fatias de hipocampo de ratos (CATER et al., 2001) e de camundongos (ROUACH et al., 2008).

Nossos resultados demonstraram que imediatamente após a PGO, os níveis extracelulares de lactato sofrem uma acentuada queda, quando comparado com os níveis no meio de incubação das fatias de hipocampo em situação controle. Da mesma forma, ao analisarmos os níveis de lactato do meio de incubação das fatias de hipocampo após 120 ou 180 minutos de reoxigenação, também observamos uma significativa queda.

De acordo com Li et al. (1994), uma das típicas respostas celulares durante um evento isquêmico é o aumento do metabolismo glicolítico e, igualmente, um aumento da produção de lactato.

Neste sentido, Schurr et al. (1997) demonstraram que, após um evento isquêmico, os níveis de lactato sofrem uma acentuada queda e os níveis de glicose um significativo aumento, durante a reoxigenação para a região isquêmica; tal correlação inversa entre os níveis de lactato e glicose, durante a reoxigenação, indicam que o lactato está sendo

utilizado, enquanto que a glicose tende a acumular-se, uma vez que não está sendo metabolizada.

Ao incubarmos as fatias de hipocampo, submetidas ao dano da PGO, com guanosina, observamos que este nucleosídeo somente foi capaz de reverter os níveis de lactato nas fatias de hipocampo que permaneceram incubadas por 180 minutos de reoxigenação.

Schurr e Gozal (2012) sugerem que a redução dos níveis de lactato, no meio de incubação das fatias de hipocampo submetidas ao dano com glutamato, pode refletir a elevada taxa de consumo de lactato por neurônios e não uma redução da produção de lactato.

Desta forma, a partir de nossos resultados, podemos sugerir que, no modelo de isquemia cerebral utilizado neste trabalho, o sistema de transporte de lactato entre astrócitos e neurônios deve estar atuando para prover substrato energético para células neuronais e manter a atividade sináptica destas células, resultando na diminuição dos níveis de lactato no meio de incubação das fatias de hipocampo submetidas ao dano da PGO. Além disto, estes resultados sugerem que o sistema de transporte de lactato entre astrócitos e neurônios começa a exercer sua função imediatamente após um evento isquêmico, impedindo um colapso energético e retardando a morte neuronal.

Nossos resultados também demonstram que a guanosina modula os parâmetros analisados do metabolismo energético, pois, conforme os níveis de ATP foram restabelecidos, entre 120 e 180 minutos do período de reoxigenação, os níveis de lactato no meio de incubação aumentaram, sugerindo que o consumo de lactato pelos neurônios diminuiu e que a guanosina é capaz de fornecer proteção mesmo em longos períodos após um evento isquêmico.

Um estudo anterior de nosso grupo já havia demonstrado que a guanosina proporciona neuroproteção, para fatias de hipocampo, em longos períodos de incubação. Ao avaliarem a viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas ao dano celular induzido por glutamato (incubação com glutamato por 60 minutos, seguido por 360 minutos de incubação em KRB na presença de guanosina), Molz et al. (2011) observaram que a guanosina proporcionou uma recuperação da viabilidade celular, ao longo dos 360 minutos de incubação, para as fatias de hipocampo.

De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a guanosina possui uma grande habilidade neuroprotetora, proporcionando uma recuperação celular para fatias de hipocampo submetidas à PGO, impedindo o desenvolvimento do estresse oxidativo por atenuar a síntese de espécies reativas, principalmente de NO e ONOO⁻, consequentemente prevenindo a despolarização mitocondrial e atuando sobre o metabolismo energético celular. Além disto, demonstramos que neste modelo *in vitro* de isquemia cerebral, a isoforma neuronal da NOS possui um papel importante para o desenvolvimento dos danos celulares, e que o uso de inibidores das enzimas NOS podem fornecer proteção celular contra danos ocasionados por um episódio isquêmico.

Estes resultados também sugerem que a neuroproteção promovida pela guanosina não depende diretamente da atividade das enzimas NOS, no entanto, um dos mecanismos protetores desempenhado por este nucleosídeo, pode ser a diminuição da atividade das isoformas neuronal e induzível das enzimas óxido nítrico síntase. Em relação à expressão destas isoformas, nosso grupo já demonstrou que a guanosina é capaz de reduzir a expressão da iNOS após a PGO (DAL-CIM et al., 2013).

Tais resultados contribuem para avaliar os efeitos da guanosina e das enzimas NOS na isquemia cerebral experimental, visando o melhor entendimento das alterações bioquímicas e celulares ocasionadas durante este evento.

6. CONCLUSÕES

Demonstramos ao longo deste trabalho que o tratamento com guanosina ou com inibidores das enzimas óxido nítrico sintase, exercem efeito neuroprotetor em um modelo *in vitro* de isquemia cerebral.

A inibição das enzimas óxido nítrico sintase previnem os danos celulares causados pela isquemia e não interferem diretamente na atividade protetora da guanosina.

Os efeitos proporcionados pela guanosina foram observados a partir de um conjunto de resultados, dentre eles:

- i) Recuperação da viabilidade celular nas fatias de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio seguida por reoxigenação;
- ii) Prevenção do estresse oxidativo através da redução de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio;
- iii) Redução dos níveis de óxido nítrico e de peroxinitrito, além de uma moderada capacidade para sequestrar moléculas de óxido nítrico;
- iv) Manutenção do potencial de membrana mitocondrial impedindo sua despolarização;
- v) Modulação de parâmetros bioenergéticos, restaurando os níveis de ATP e de lactato em fatias de hipocampo de ratos submetidas ao modelo de isquemia cerebral *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS

ALBRECHT, P.; HENKE, N.; TIEN, M. T.; ISSBERNER, A.; BOUCHACHIA, I.; MAHER, P.; LEWERENZ, J. METHNER, A. Extracellular cyclic GMP and its derivatives GMP and guanosine protect from oxidative glutamate toxicity. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 610-619. 2013.

ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **International Journal of Stroke**, v. 4, p. 461-470. 2009.

ALMEIDA, A.; BOLANOS, J. P. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 77, p. 676-690. 2001.

ALMEIDA, A.; MONCADA, S.; BOLANOS, J. P. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. **Nature Cell Biology**, v. 6, p. 45-51. 2004.

ARRIGONI, O.; TULLIO, M. C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. **Biochimic et Biophysica Acta**, v. 1569, p. 1-9. 2002.

BENFENATI, V.; CAPRINI, M.; NOBILE, M.; RAPISARDA, C.; FERRONI, S. Guanosine promotes the up-regulation of inward rectifier potassium current mediated by Kir4.1 in cultured rat cortical astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, p. 430-445. 2006.

BERGENSEN, L. H. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. **Neuroscience**, v. 145, p. 11-19. 2007.

BOLANOS, J. P.; PEUCHEN, S.; HEALES, S. J.; LAND, J. M.; CLARK, J. B. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial

respiratory chain in cultured astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 63, p. 910-916. 1994.

BOLANOS, J. P.; HEALES, S. J. R. Persistent mitochondrial damage by nitric oxide and its derivatives: neuropathological implications. **Frontiers in Neuroenergetics**, v. 2, p. 1-5. 2010.

BOLANOS, J. P.; MORO, M. A.; LIZASOAIN, I.; ALMEIDA, A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1299-1315. 2009.

BOWERS, K. C.; ALLSHIRE, P.; COBBOLD, P. H. Continuous measurements of cytoplasmic ATP in single cardiomyocytes during simulation of the oxygen paradox. **Cardiovascular Research**, v. 27, p. 1836-1839. 1993.

BRANA, C.; BENHAM, C.; SUNDSTROM, L.A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. **Brain Research Protocols**, v. 10, p. 109-114. 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie/Food Science and Technology**, p. 25-30. 1995.

BRASIL. Luiz Antônio Pinto de Oliveira. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Org.) **Observações sobre a evolução da mortalidade no Brasil: o passado, o presente e perspectivas**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/tabuadevida/2009/notastecnicas.pdf>>. Acesso em 30 jun. 2014.

BROOKES, P. S.; LAND, J. M.; CLARK, J. B.; HEALES, S. J. R. Peroxynitrite and brain mitochondria: evidence for increased proton leak. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, p. 2195-2202. 1998.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological process in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 111, p. 483-495. 2009.

BROWN, G. C. Nitric oxide and neuronal death. **Nitric Oxide**, v. 23, p. 153-165. 2010.

BROWN, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome *c* oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1504, p. 46-57. 2001.

BROWN, L. A.; KEY, B. J.; LOVICK, T. A. Fluorescent imaging of nitric oxide production in neuronal varicosities associated with intraparenchymal arterioles in rat hippocampal slices. **Neuroscience Letters**, v. 294, p. 9-12. 2000.

BROWN, L. A.; KEY, B. J.; LOVICK, T. A. Bio-imaging of nitric oxide-producing neurones in slice of rat brain using 4,5-diaminofluorescein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 92, p. 101-110. 1999.

BUISSON, A.; PLOTKINE, M.; BOULU, R. G. The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia. **British Journal of Pharmacology**, v. 106, p. 766-767. 1992.

CAMACHO, A.; MASSIEU, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. **Archives of Medical Research**, v. 37, p. 11-18. 2006.

CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. **Journal of Pathology**, v. 190, p. 255-266. 2000.

CARDENAS, A.; DE ALBA, J.; MORO, M. A.; LEZA, J. C.; LORENZO, P. LIZASOAIN, I. Protective effect of N-(3-(aminomethyl)benzyl) acetamide, na inducible nitric oxide synthase

inhibitor, in brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation. **European Journal of Pharmacology**, v. 354, p. 161-165. 1998.

CATER, H. L.; BENHAM, C. D.; SUNDSTROM, L. E. Neuroprotective role of monocarboxylate transport during glucose deprivation in slice cultures of rat hippocampus. **The Journal of Physiology**, v. 531, p. 459-466. 2001.

CHAN, P. H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke**, v. 27, p. 1124-1129. 1996.

CHANG, R.; ALGIRD, A.; BAU, C.; RATHBONE, M. P.; JIANG, S. Neuroprotective effects of guanosine on stroke models *in vitro* and *in vivo*. **Neuroscience Letters**, v. 431, p. 101-105. 2008.

CHEN, H.; YOSHIOKA, H.; KIM, G. S.; JUNG, J. E.; OKAMI, N.; SAKATA, H.; MAIER, C. M.; NARASIMHAN, P.; GOEDERS, C. E.; CHAN, P. H. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, p. 1505-1517. 2011.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168. 2002.

CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, v. 8, p. 623-634. 1988.

CIMAROSTI, H.; RODNIGHT, R.; TAVARES, A.; PAIVA, R.; VALENTIM, L.; ROCHA, E.; SALBEGO, C. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience Letters**, v. 315, p. 33-36. 2001.

COLLE, D.; ARANTES, L. P.; GUBERT, P.; LUZ, S. C. A.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T.; SOARES, F. A. A. Antioxidant properties of *Taraxacum officinale* leaf extract are involved in the protective effect against hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, p. 549-556. 2012.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, p. 689-695. 1993.

CRACK, P. J.; TAYLOR, J. M. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 1433-1444. 2005.

DAL-CIM, T. A. **Mecanismos de neuroproteção da guanosina contra a neurotoxicidade induzida por isquemia e dano oxidativo mitocondrial *in vitro***. 182p. Tese (Doutorado em Neurociência). Universidade Federal de Santa Catarina. 2012.

DAL-CIM, T.; LUDKA, F. K.; MARTINS, W. C.; REGINATO, C.; PARADA, E.; EGEA, J.; LOPEZ, M. G.; TASCA, C. I. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, p. 437-450. 2013.

DAL-CIM, T.; MARTINS, W. C.; SANTOS, A. R. S.; TASCA, C. I. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neuroscience**, v. 183, p. 212-220. 2011.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 1-105. 2001.

DATASUS. Ministério da Saúde: Sistema de Informação de Mortalidade. 2009. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c08.def>>. Acesso em 30 jun. 2014.

DONNAN, G. A.; FISHER, M.; MACLEOD, M.; DAVIS, S. M. Stroke.**Lancet**, v. 371, p. 1612-1623. 2008.

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 87, p. 179-197. 2007.

EGEA, J.; ROSA, A. O.; CUADRADO, A.; GARCIA, A. G.; LOPEZ, M. G. Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, p. 1842-1852. 2007.

EHRENBERG, B.; MONTANA, V.; WEI, M. D. WUSKELL, J. P.; LOEW, L. M. Membrane potential can be determined in individual cells from the Nernstian distribution of cationic dyes. **Biophysical Journal**, v. 53, p. 785-794. 1988.

ELIASSON, M. J. L.; HUANG, Z.; FERRANTE, R. J.; SASAMATA, M.; MOLLIVER, M. E.; SNYDER, S. H.; MOSKOWITZ, M. A. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 5910-5918. 1999.

ENDRES, M.; LAUFS, U.; LIAO, J. K.; MOSKOWITZ, M. A. Targeting eNOS for stroke protection. **TRENDS in Neuroscience**, v. 27, p. 283-289. 2004.

ESCOTT, K. J.; BEECH, J. S.; HAGA, K. K.; WILLIAMS, S. C. R.; MELDRUM, B. S.; BATH, P. M. W. Cerebroprotective effect of the nitric oxide synthase inhibitors, 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole and 7-nitro indazole, after transient focal cerebral ischemia in the rat. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 18, p. 281-287. 1998.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Lesão de isquemia e reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 4, n. 66, p. 239-245. 1996.

FEI, Z.; ZHANG, X.; BAI, H.; JIANG, X.; LI, X.; ZHANG, W.; HU, W. Posttraumatic secondary brain insults exacerbates neuronal injury by altering metabotropic glutamate receptors. **BMC Neuroscience**, v. 8, p. 1-9. 2007.

FEKETE, A.; VIZI, E. S.; KOVACS, K. J.; LENDVAI, B.; ZELLES, T. Layer-specific differences in reactive oxygen species levels after oxygen-glucose deprivation in acute hippocampal slices. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 1010-1022. 2008.

FERDINANDY, P.; SCHULZ, R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, p. 532-543. 2003.

FERREIRA, A. G. K.; CUNHA, A. A.; MACHADO, F. R.; PEDERZOLLI, C. D.; DALAZEN, G. R.; ASSIS, A. M.; LAMERS, M. L.; SANTOS, M. F.; DUTRA-FILHO, C. S.; WYSE, A. T. S. Experimental hyperprolinemia induces mild oxidative stress, metabolic changes, and tissue adaptation in rat liver. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, p. 174-183. 2012.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247. 2000.

FOSTER, K. A.; GALEFFI, F.; GERICH, F. J.; TURNER, D. A.; MULLER, M. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 79, p. 136-171. 2006.

FRANTSEVA, M. V.; CARLEN, P. L.; VELAZQUEZ, J. L. P. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during

ischemia in pyramidal neurons. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1216-1227. 2001.

GALEFFI, F.; SINNAR, S.; SCHWARTZ-BLOOM, R. D. Diazepam promotes ATP recovery and prevents cytochrome *c* release in hippocampal slices after in vitro ischemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 1242-1249. 2000.

GARCIA, N. Ministério amplia assistência a pacientes com AVC. **Portal da Saúde, Agência de Saúde, Ministério da Saúde**. 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4790/162/ministerio-da-saudeamplia-assistencia-a-pacientes-com-avc.html>>. Acesso em: 03 jul. 2013.

GO, A. S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V. L.; BENJAMIN, E. J.; BERRY, J. D.; et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 129, p. 28-292. 2014.

GOMES, C. V., M. P. KASTER, A. R. TOME, P. M. AGOSTINHO R. A. CUNHA. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1808, (5): 1380-1399, 2011.

GONG, C. X.; LIDSKY, T.; WEGIEL, J.; GRUNDKE-IQBAL., I.; IQBAL, K. Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. **Brain Research Protocols**, v. 6, p. 134-140. 2001.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138. 1982.

GUNASEKAR, P. G.; KANTHASAMY, A. G.; BOROWITZ, J. L.; ISOM, G. E. Monitoring intracellular nitric oxide formation by

dichlorofluorescein in neuronal cells. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 61, p. 15-21. 1995.

HANSEL, G.; RAMOS, D. B.; DELGADO, C. A.; SOUZA, D. G.; ALMEIDA, R. F.; PORTELA, L. V.; QUINCOZES-SANTOS, A.; SOUZA, D. O. The potential therapeutic effect of guanosine after cortical focal ischemia in rats. **Plos One**, v. 9, p. 1-10. 2014.

HAUSENLOY, D. J.; DUCHEN, M. R.; YELLON, D. M. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 60, p. 617-625. 2003.

HEALES, S. J. R.; BOLANOS, J. P. Impairment of brain mitochondrial function by reactive nitrogen species: the role of glutathione in dictating susceptibility. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 469-474. 2002.

HERNANZ, R.; BRIONES, A. M.; MARTIN, A.; BELTRAN, A. E.; TEJERINA, T.; SALAICES, M.; ALONSO, M. J.. Ouabain treatment increases nitric oxide bioavailability and decreases superoxide anion production in cerebral vessels. **Journal of Hypertension**, v. 26, p. 1944-1954. 2008.

HERTZ, L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 289-309. 2008.

HICKS, C. A.; WARD, M. A.; SWETTEENHAM, J. B.; O'NEILL, J. O. Synergistic neuroprotective effects by combining NMDA or AMPA receptor antagonist with nitric oxide synthase inhibitors in global cerebral ischaemia. **European Journal of Pharmacology**, v. 381, p. 113-119. 1999.

HONG, J. T.; RYU, S. R.; KIM, H. J.; LEE, J. K.; LEE, S. H.; YUN, Y. P.; LEE, B. M.; KIM, P. Y. Protective effect of green tea extract on ischemia/ reperfusion-induced brain injury in Mongolian gerbils. **Brain Research**, v. 888, p. 11–18. 2001.

HOYT, K. R.; SHARMA, T. A.; REYNOLDS, I. J. Trifluoperazine and dibucaine-induced inhibition of glutamate-induced mitochondrial depolarization in rat cultured forebrain neurones. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, p. 803-808. 1997.

HUANG, Z.; HUANG, P. L.; MA, J.; MENG, W.; AYATA, C.; FISHMAN, M. C.; MOSKOWITZ, M. A. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 16, p. 981-987. 1996.

HUANG, Z.; HUANG, P. L.; PANAHIAN, P.; DALKARA, T.; FISHMAN, M. C.; MOSKOWITZ, M. A. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. **Science**, v. 265, p. 1883-1885. 1994.

IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends in Neurosciences**, v. 20, p. 132-139. 1997.

IJIMA, T.; MISHIMA, T.; AKAGAWA, K.; IWAO, Y. Neuroprotective effect of propofol on necrosis and apoptosis following oxygen-glucose deprivation. Relationship between mitochondrial membrane potential and mode of death. **Brain Research**, v. 1099, p. 25-32. 2006.

IJIMA, T.; MISHIMA, T.; TOHYAMA, M.; AKAGAWA, K.; IWAO, Y. Mitochondrial membrane potential and intracellular ATP content after transiente experimental ischemia in the cultured hippocampal neuron. **Neurochemistry International**, v. 43, p. 263-269. 2003.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, p. 496-505. 2006.

IZUMI, Y.; BENZ, A. M.; CLIFFORD, D. B.; ZORUMSKI, C. F. Nitric oxide inhibitors attenuate ischemic degeneration in the CA1

region of rat hippocampal slices. **Neuroscience Letters**, v. 210, p. 157-160. 1996.

IZUMI, Y.; BENZ, A. M.; KATSUKI, H.; ZORUMSKI, C. F. Endogenous monocarboxylates sustain hippocampal synaptic function and morphological integrity during energy deprivation. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 9448-9457. 1997.

KADER, A.; FRAZZINI, V. I.; SOLOMON, R. A.; TRIFILETTI, R. R. Nitric oxide production during focal ischemia in rats. **Stroke**, v. 24, p. 1709-1716. 1993.

KEELAN, J.; VERGUN, O.; DUCHEN, M. R. Excitotoxic mitochondrial depolarization requires both calcium and nitric oxide in rat hippocampal neurons. **Journal of Physiology**, v. 520, p. 797-813. 1999.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **The Biochemical Journal**, v. 298, p. 249-258. 1994.

KOJIMA, H.; HIRATA, M.; KUDO, Y.; KIKUCHI, K.; NAGANO, T. Visualization of oxygen-concentration-dependent production of nitric oxide in rat hippocampal slices during aglycemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, p. 1404-1410. 2001.

KOJIMA, H.; SAKURAI, K.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, p. 373-375. 1998.

KOOY, N. W.; ROYALL, J. A.; ISCHIROPOULOS, H. Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. **Free Radical Research**, v. 27, p. 245-254. 1997.

KOOY, N. W.; ROYALL, J. A.; ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J. S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16, p. 149-156. 1994.

KOVACS, R.; RABANUS, A.; OTAHAL, J.; PATZAK, A.; KARDOS, J.; ALBUS, K.; HEINEMANN, U.; KANN, O. Endogenous nitric oxide is a key promoting factor for initiation of seizure-like events in hippocampal and entorhinal cortex slices. **Neurobiology of Disease**, v. 29, p. 8565-8577. 2009.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 333-343. 2009.

LAAKE, J. H.; HAUG, F. M.; WIELOCH, T.; OTTERSEN, O. P. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. **Brain Research Protocols**, v. 4, p. 173-184. 1999.

LARA, D. R.; SCHMIDT, A. P.; FRIZZO, M. E. S.; BURGOS, J. S.; RAMIREZ, G.; SOUZA, D. O. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. **Brain Research**, v. 912, p. 176-180. 2001.

LEFER, A. M.; LEFER, D. J. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. **Cardiovascular Research**, v. 32, p. 743-751. 1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 5Ed, 1158p. 2008.

LI, P. A.; SHAMLOO, M.; SMITH, M. L.; KATSURA, K.; SIESJO, B. K. The influence of plasma glucose concentrations on ischemic brain damage is a threshold function. **Neuroscience Letters**, v. 177, p. 63-65. 1994.

LIM, C. H.; DEDON, P. C.; DEEN, W. M. Kinetic analysis of intracellular concentrations of reactive nitrogen species. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 2134-2147. 2008.

LIZASOAIN, I.; MORO, M. A.; KNOWLES, R. G.; DARLEY-USMAR, V.; MONCADA, S. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. **The Biochemical Journal**, v. 314, p. 877-880. 1996.

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 88, p. 147-157. 1996.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 1431-1568. 1999.

LORRIO, S.; GOMEZ-RANGEL, V.; NEGREDO, P.; EGEA, J.; LEON, R.; ROMERO, A.; DAL-CIM, T.; VILLARROYA, M.; RODRIGUEZ-FRANCO, M. I.; CONDE, S.; ARCE, M. A.; RODA, J. M.; GARCIA, A. G.; LOPEZ, M. G. Novel multitarget ligand ITH33/IQM9.21 provides neuroprotection in *in vitro* and *in vivo* models related to brain ischemia. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 403-411. 2013.

LOVE, S. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain Pathology**, v. 9, p. 119-131. 1999.

MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L.; ROTHMAN, D. L.; SHULMAN, R. G. Energy on demand. **Science**, v. 283, p. 496-497. 1999.

MAGISTRETTI, P. J.; SORG, O.; YU, N.; MARTIN, J. L.; PELLERIN, L. Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. **Developmental Neuroscience**, v. 15, p. 306-312. 1993.

MALARKEY, E. B.; PARPURA, V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 52, p. 142-154. 2008.

MARGAILL, I.; ALLIX, M.; BOULU, R. G.; PLOTKINE, M. Dose- and time-dependence of L-NAME neuroprotection in transient focal cerebral ischemia in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, p. 160-163. 1997.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1007-1015. 2000.

MESENGE, C.; VERRECCHIA, C.; ALLIX, M.; BOULU, R. R.; PLOTKINE, M. Reduction of the neurological deficit in mice with traumatic brain injury by nitric oxide synthase inhibitors. **Journal of Neurotrauma**, v. 13, p. 209-214. 1996.

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; BUDNI, J.; MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D.; EGEA, J.; ROMERO, A.; BARRIO, L.; RODRIGUES, A. L. S.; LOPEZ, M. G.; TASCA, C. I. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, p. 1400-1408. 2011.

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; DECKER, H.; TASCA, C. I. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. **Brain Research**, v. 22, p. 113-120. 2008.

MORETTO, M. B.; ARTENI, N. S.; LAVINSKY, D.; NETTO, C. A.; ROCHA, J. B. T.; SOUZA, D. O.; WOFCHUCK, S. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. **Experimental Neurology**, v. 195, p. 400-406. 2005.

MORO, M. A.; CARDENAS, A.; HURTADO, O.; LEZA, J. C.; LIZASOAIN, I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. **Cell Calcium**, v. 36, p. 265-275. 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v 65, p. 55-63. 1983.

MURPHY, A. N.; FISKUM, G.; BEAL, M. F. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, p. 231-245. 1999.

MYHRE, O.; ANDERSEN, J. M.; AARNES, H.; FONNUM, F. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminal, and lucigenin as indicators of reactive species formation. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1575-1582. 2003.

NAGAFUJI, T.; SUGIYAMA, M.; MATSUI, T. MUTO, A.; NAITO S. Nitric oxide synthase in cerebral ischemia. **Molecular and Chemical Neuropathology**, v. 26, p. 107-157. 1995.

NANETTI, L.; RAFFAELLI, F.; VIGNINI, A.; PEROZZI, C.; SILVESTRINI, M.; BARTOLINI, M.; PROVINCIALI, L.; MAZZANTI, L. Oxidative stress in ischaemic stroke. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 41, p. 1318-1322. 2011.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 100, p. 656-664. 2012.

NORABERG, J.; KRISTENSEN, B. W.; ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Research Protocols**, v. 3, p. 278-290. 1999.

OHTAKI, H.; DOHI, K.; NAKAMACHI, T.; YOFU, S.; ENDO, S.; KUDO, Y.; SHIODA, S. Evaluation of brain ischemia in mice. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 38, n. 2, p. 99-106, 2005.

OLESKOVICZ, S. P. B.; MARTINS, W. C.; LEAL, R. B.; TASCA, C. I. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. **Neurochemistry International**, v. 52, p. 411-418. 2008.

OLIVEIRA, D. L.; HORN, J. F.; RODRIGUES, J. M.; FRIZZO, M. E. S.; MORIGUCHI, E.; SOUZA, D. O.; WOFCHUK, S. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. **Brain Research**, v. 1018, p. 48-54. 2004.

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. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, p. 335-344. 2002.

OLMEZ, I.; OZYURT, H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. **Neurochemistry International**, v. 60, p. 208-212. 2012.

O'NEILL, M. J.; MURRAY, T. K.; MCCARTY, D. R.; HICKS, C. A.; DELL, C. P.; PATRICK, K. E.; WARD, M. A.; OSBORNE, D. J.; WIERNICKI, T. R.; ROMAN, C. R.; LODGE, D.; FLEISCH, J. H.; SINGH, J. ARL 17477, a selective nitric oxide synthase inhibitor, with neuroprotective effects in animal models of global and focal cerebral ischaemia. **Brain Research**, v. 871, p. 234-244. 2000.

OZAWA, S.; KAMIYA, K.; TSUZUKI, K. Glutamate receptor in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 581-618. 1998.

PERRY, S. W.; NORMAN, J. P.; BARBIERI, J.; BROWN, E. B.; GELBARD, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the

proton gradient: a practical usage guide. **BioTechniques**, v. 50, p. 98-115. 2011.

PETRONILHO, F.; PERICO, S. R.; VUOLO, F.; MINA, F.; CONSTANTINO, L.; COMIM, C. M.; QUEVEDO, J.; SOUZA, D. O.; DAL-PIZZOL, F. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 26, p. 904-910. 2012.

PRINGLE, A. K.; BENHAM, C. D.; SIM, L.; KENNEDY, J.; IANNOTTI, F.; SUNDSTROM, L. E. Selective N-type calcium channel antagonist omega conotoxin MVIIA is neuroprotective against hypoxic neurodegeneration in organotypic hippocampal-slice cultures. **Stroke**, v. 27, p. 2124-2130. 1996.

RADI, R.; RODRIGUEZ, M.; CASTRO, L.; TELLERI, R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, p. 89-95. 1994.

RATHBONE, M.; PILUTTI, L.; CACIAGLI, F.; JIANG, S. Neurotrophic effects of extracellular guanosine. **Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids**, v. 27, p. 666-672. 2008.

RIOBO, N. A.; CLEMENTI, E.; MELANI, M.; BOVERIS, A.; CADENAS, E.; MONCADA, S.; PODEROSO, J. J. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. **The Biochemical Journal**, v. 359, p. 139-145. 2001.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Fundamentos de Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**, 249p. 1992.

ROSS, D. H.; PUNTEL, R. L.; SANTOS, M. M.; SOUZA, D. O. G.; FARINA, M.; NOGUEIRA, W.; ASCHNER, M.; BURGER, M. E.; BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T. Guanosine and synthetic organoselenium compounds modulate methylmercury-induced oxidative

stress in rat brain cortical slices: Involvement of oxidative stress and glutamatergic system. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 302-307. 2009.

ROUACH, N.; KOULAKOFF, A.; ABUDARA, V.; WILLECKE, K.; GIAUME, C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. **Science**, v. 322, p. 1551-1555. 2008.

RUNDEN-PRAN, E.; TANSO, R.; HAUG, F. M.; OTTERSEN, O. P.; RING, A. Neuroprotective effects of inhibiting *N*-methyl-D-aspartate receptors, P2X receptors and the mitogen-activated protein kinase cascade: a quantitative analysis in organotypical hippocampal slice cultures subjected to oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience**, v. 136, p. 795-810. 2005.

SCHMID-ELSAESSER, R.; HUNGERHUBER, E.; ZAUSINGER, S.; BAETHMANN, A.; REULEN, H. J. Neuroprotective efficacy of combination therapy with two different antioxidants in rats subjected to transient focal ischemia. **Brain Research**, v. 816, p. 471-479. 1999.

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 Research**, v. 864, p. 40-43. 2000.

SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; SOUZA, D. O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 116, p. 401-416. 2007.

SCHMIDT, A. P.; TORT, A. B. L.; SILVEIRA, P. P.; BOHMER, A. E.; HANSEL, G.; KNORR, L.; SCHALLENBERGER, C.; DALMAZ, C.; ELISABETSKY, E.; CRESTANA, R. H.; LARA, D. O.; SOUZA, D. O. The NMDA antagonist MK-801 induces hyperalgesia and increases CSF excitatory amino acids in rats: Reversal by guanosine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 91, p. 549-553. 2009.

SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, v. 40, p. 599-636. 1991.

SCHUCHMANN, S.; LUCKERMANN, M.; KULIK, A.; HEINEMANN, U.; BALLANYI, K. Ca²⁺ and metabolism-related changes of mitochondrial potential in voltage-clamped CA1 pyramidal neurons in situ. **Journal of Neurophysiology**, v. 83, p. 1710-1721. 2000.

SCHURR, A.; GOZAL, E. Aerobic production and utilization of lactate satisfy increased energy demands upon neuronal activation in hippocampal slices and provide neuroprotection against oxidative stress. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2, p. 1-15. 2012.

SCHURR, A.; MILLER, J. J.; PAYNE, R. S.; RIGOR, B. M. An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 34-39. 1999.

SCHURR, A.; PAYNE, R. S.; MILLER, J. J.; RIGOR, B. M. Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an in vitro study. **Brain Research**, v. 744, p. 105-111. 1997.

SCHURR, A.; PAYNE, R. S.; MILLER, J. J.; TSENG, M. T.; RIGOR, B. M. Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 895, p. 268-272. 2001.

SHIBATA, S.; YAMAMOTO, Y.; TANAKA, T.; WATANABE, S. N-Nitro-L-arginine protects against hypoxia/hypoglycemia-induced decrease in CA1 presynaptic spikes in rat hippocampal slices. **European Journal of Pharmacology**, v. 273, p. 223-228. 1995.

SILVA Jr, O. C.; CENTURION, S.; PACHECO, E. G.; BRISOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; SASSO, K. D. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, p. 96-100. 2002.

SPINNEWYN, B.; CORNET, S.; AUGUET, M.; CHABRIER, P. E. Synergistic protective effects of antioxidant and nitric oxide synthase inhibitor in transient focal ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, p. 139-143. 1999.

STEVENS, B. Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. **Neuro-Signals**, v. 16, p. 278-288. 2008.

STRASSER, U.; FISCHER, G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 57, p. 177-186. 1995.

SUN, M.; ZHAO, Y.; GU, Y.; XU, C. Inhibition of nNOS reduces ischemic cell death through down-regulating calpain and caspase-3 after experimental stroke. **Neurochemistry International**, v. 54, p. 339-346. 2009.

TANAKA, Y.; TRAN, P. O. T.; HARMON, J.; ROBERTSON, P. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic β cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 12363-12368. 2002.

TANG, F.; LANE, S.; KORSACK, A.; PATON, J. F. R.; GOURINE, A. V.; KASPAROV, S.; TESCHEMACHER, A. G. Lactate-mediated glianeuronal signaling in the mammalian brain. **Nature Communications**, DOI: 10.1038/ncomms4284. 2014.

TAVARES, R. G.; SCHMIDT, A. P.; ABUD, J.; TASCA, C. I.; SOUZA, D. O. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. **Neurochemical Research**, v. 30, p. 439-444. 2005.

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. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 621-627. 2002.

TERPOLILLI, N. A.; MOSKOWITZ, M. A.; PLESNILA, N. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. **Journal of Cerebral Flow & Metabolism**, v. 32, p. 1332-1346. 2012.

THAUERER, B.; ZUR NEDDEN, S.; BAIER-BITTERLICH, G. Purine nucleosides: endogenous neuroprotectants in hypoxic brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 121, p. 329-342. 2012.

THAUERER, B.; ZUR NEDDEN, S.; BAIER-BITTERLICH, G. Vital role of protein kinase C-related kinase in the formation and stability of neurites during hypoxia. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, p. 432-446. 2010.

TROTTI, D.; DANBOLT, N. C.; VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, p. 328-334. 1998.

TROTTI, D.; RIZZINI, B. L.; ROSSI, D.; HUAGETO, O.; RACAGNI, G.; DANBOLT, N. C.; VOLTERRA, A. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, p. 1236-1243. 1997.

TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P. J. Metabolic coupling between glia and neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 877-885. 1996.

VELAZQUEZ, J. L. P.; FRANTSEVA, M. V.; CARLEN, P. L. in vitro ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 9085-9094. 1997.

VINADE, E. R.; SCHMIDT, A. P.; FRIZZO, M. E. S.; ISQUIERDO, I.; ELISABETSKY, E.; SOUZA, D. O. Chronically administered

guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. **Brain Research**, v. 977, p. 97-102. 2003.

VOWELLS, S. J.; SEKHSARIA, S.; MALECH, H. L.; SHALIT, M.; FLEISHER, T. A. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. **Journal of Immunological Methods**, v. 178, p. 89-97. 1995.

YAMAMOTO, F. I. Doenças cerebrovasculares. **Clínica Médica**, v. 6, p. 406-430. 2009.

YANG, Y.; NING, G. M.; KUTOR, J.; HONG, D. H.; ZHANG, M.; ZHENG, X. X. Nitric oxide spatial distribution in single cultured hippocampus neurons: investigation by projection of reconstructed 3-D image and visualization technique. **Cell Biology International**, v. 28, p. 577-583. 2004.

YOSHIDA, T.; LIMMROTH, V.; IRIKURA, K.; MOSKOWITZ, M. A. The NOS inhibitor, 7-nitroindazole, decreases focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 14, p. 924-929. 1994.

WHITE, B. C.; SULLIVAN, J. M.; DEGRACIA, D. J.; O'NEIL, B. J.; NEUMAR, R. W.; GROSSMAN, L. I.; RAFOLS, J. A.; KRAUSE, G. S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 179, p. 1-33. 2000.

ZADORI, D.; KLIVENYI, P.; SZALARDY, L.; FULOP, F.; TOLDI, J.; VECSEI, L. Mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation and kynurenines: novel therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 322, p. 187-191. 2012.

ZHANG, B.; TANAKA, J.; YANG, L.; SAKANAKA, M.; HATA, R.; MAEDA, N.; MITSUDA, N. Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. **Neuroscience**, v.126, p.433-440. 2004.

ZHU, H.; BANNENBERG, G. L.; MOLDEUS, P.; SHERTZER, H. G.
Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein.
Archives of Toxicology, v. 68, p. 582-587. 1994.