

Camila Ângela Zanella

**EFEITOS DA GUANOSINA SOBRE A SUMOILAÇÃO GLOBAL  
DE PROTEÍNAS EM MODELOS DE NEURODEGENERAÇÃO  
*IN VIVO* E *IN VITRO* E INVESTIGAÇÃO DO POSSÍVEL  
MECANISMO DE AÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutora em Farmacologia  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena  
Iturvides Cimarosti  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Inês  
Tasca

Florianópolis  
2019

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

Zanella , Camila Ângela  
Efeitos da guanosina sobre a SUMOilação global de  
proteínas em modelos de neurodegeneração in vivo e in  
vitro e investigação do possível mecanismo de ação /  
Camila Ângela Zanella ; orientador, Helena  
Iturvides Cimarosti, coorientador, Carla Inês  
Tasca, 2019.  
165 p.

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

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. SUMOilação. 3. Guanosina. 4.  
Doença de Alzheimer. 5. Receptores de adenosina. I.  
Cimarosti, Helena Iturvides . II. Tasca, Carla Inês  
. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

"Efeitos da guanosina sobre a SUMOilação global de proteínas em modelos de neurodegeneração *in vivo* e *in vitro* e investigação do possível mecanismo de ação"

Por

**Camila Ângela Zanella**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (015/2019/PPGFMC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



---

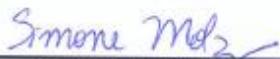
Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



---

Dra. Helena Iturvides Cimarosti (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientadora



---

Dra. Simone Molz (Universidade do Contestado)



---

Dr. Alfeu Zandú Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr. Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 07 de junho de 2019.



Este trabalho é dedicado à minha mãe  
Rosa Maria Zanella.



## AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades.

Às professoras Helena Cimarosti e Carla Tasca pela orientação durante todo o doutorado e nos experimentos realizados na UFSC, por todos os ensinamentos no dia-a-dia e por todas as correções dessa tese. Ao professor Jeremy Henley e ao pós-doc Kevin Wilkinson pela orientação nos experimentos realizados na Universidade de Bristol e também pelas discussões científicas. Aos professores Daniel Mansur, Marcelo Farina, Rui Prediger, Antônio Carobrez, e Jamil Assrey. Aos professores da banca de qualificação Geison de Souza e Juliano Ferreira pelas discussões e sugestões. À professora Joana Gaspar pelo auxílio com as análises de imagens. E a todos os professores do departamento de Farmacologia.

À minha mãe Rosa Zanella, pelos ensinamentos desde criança, por ter me ensinado a ser forte e não desistir, por ter me incentivado todos os dias, pelo apoio emocional e incondicional.

À minha prima Patrícia Zanella, por sempre estar comigo desde a nossa infância, independente da distância. À minha família Marlene, Sérgio, Paulo, Suelen, Paola, Marli Zanella, minha madrinha Miraci Pileti e Nair Zanella. Tio Gerson e tia Carmen.

À minha querida amiga Raquel Tonello, que independente da distância sempre acreditou em mim e me apoiou. À Sandra, por todas as nossas conversas. À Maíra Norões por sua amizade, e parceria nesses 6 anos de jornada acadêmica. Ao meu amigo dj Mendes Jr, às amigas Julia, Andressa, Juliana e Eveline.

Stella Junqueira pela ajuda e amizade, por ter me acolhido em Bristol. Letícia Coelho por suas perguntas, Izi Izumi, Ericks, Lucas Mascarin, Clarissa Barp, Nayara Coelho, Franklin Back, Ana Cristina.

O pessoal do laboratório Neuroquímica 4, Naiani Marques, Gabriela Poluceno, Karen Oliveira, Daniel, Beatriz, Tetsadê, Tharine, Débora, Caio, Luiza, Victor e João.

Pessoal do LEXDON, Andréia Cunha, Samanta, Angela, Gislaíne, Josiel.

Mauricio Cunha, Verônica e Adriane. Aos amigos que conheci em Bristol, Luana, Plínio, Olivia, Barbara, Jacob, Siobian, Kevin, Ruth, Luis e Richard. Meus amigos de faculdade, Claudiele, Daiane e Junior.

Aos meus psicólogos Gustavo e Viviane que me auxiliaram em diferentes momentos ao longo desses 4 anos, e também à Dra Greici.

À todos os funcionários dos LAMEBs, um agradecimento especial à Vanessa e ao Denis. Pessoal do LCME, às técnicas Katina e

Susane pelo auxílio no microscópio confocal da UFSC. Ao professor Boris que permitiu o uso do equipamento de cintilação.

Aos meus primeiros orientadores professores Altemir Mossi, Rogério Cansian e Silvane Roman.

À CAPES e ao Newton Fund pelos auxílios financeiros durante a realização do doutorado sanduíche, ao CNPq que além da bolsa forneceu a taxa de bancada durante todo o doutorado realizado no Brasil, esse auxílio foi imprescindível para a realização desta tese.

A todos que de alguma forma ajudaram direta ou indiretamente para a realização desta tese.

Quem olha para fora sonha, quem olha para dentro  
desperta.

Carl Jung



## RESUMO

O processo de envelhecimento é fisiológico e afeta as funções tanto corporais quanto cognitivas, com concomitante redução das funções biológicas ao longo da vida de um indivíduo. A idade avançada é um dos fatores de risco para o surgimento de doenças neurodegenerativas como, por exemplo, a doença de Alzheimer (DA). Aliado a perda de memória observada nos pacientes, algumas alterações moleculares importantes em seus cérebros acompanham os sintomas da DA, como por exemplo, agregados do peptídeo beta amiloide (A $\beta$ ). A SUMOilação é um exemplo de modificação pós traducional descoberta recentemente onde proteínas denominadas SUMO (do inglês, *small ubiquitin-like modifier*) são adicionadas a proteínas alvo promovendo dessa forma alteração da localização subcelular, modificando a interação com substratos, entre outros efeitos. A SUMOilação já foi demonstrada como neuroprotetora em diferentes modelos. Entre as moléculas endógenas associadas à neuroproteção, o nucleosídeo guanosina, apresenta um importante papel como neuromodulador e neuroprotetor em estudos sobre o envelhecimento e DA. Nesse sentido, o objetivo desta tese foi investigar se a guanosina poderia modular a SUMOilação *in vivo* e promover alterações comportamentais e também foi investigado se a guanosina poderia modular a SUMOilação *in vitro* aliado à investigação do possível mecanismo de ação. Para o estudo *in vivo* foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 de 3 e 24 meses de idade. Os animais foram tratados com guanosina (8 mg/kg intraperitoneal) durante 14 dias, e nos últimos 8 dias submetidos aos testes comportamentais de campo aberto, realocação de objetos, labirinto em Y, borrifada de sacarose, suspensão pela cauda e labirinto aquático de Morris. O tratamento com guanosina nos animais jovens e idosos não alterou *per se* a atividade locomotora dos animais. Nos camundongos jovens o tratamento com guanosina *per se* promoveu uma melhora na memória espacial de curta duração no teste de realocação de objetos. Já nos camundongos idosos a guanosina promoveu a melhora na memória espacial de trabalho no teste de labirinto em Y. Com relação aos comportamentos tipo-depressivos não foram observados efeitos no teste de borrifada de sacarose quanto ao parâmetro de autolimpeza. No teste de suspensão pela cauda a guanosina aumentou o tempo de imobilidade dos animais jovens, sugerindo um efeito no *coping strategy* desses animais. Para memória espacial de longa duração no labirinto aquático de Morris não houve diferenças. Com relação aos níveis de SUMOilação, houve um aumento significativo de SUMO1-ilação global

no hipocampo dos animais jovens e idosos com o tratamento com guanosina. Com a abordagem *in vitro*, foi avaliado se a guanosina promovia modificações na SUMOilação global de proteínas. Para isso astrócitos e neurônios corticais de cultivo primário foram tratados com 1, 10, 100, 300 e 500  $\mu\text{M}$  de guanosina nos tempos de 1, 6, 24 e 48 h. Os resultados obtidos na caracterização *in vitro* mostram que a guanosina aumentou significativamente a SUMO2/3-ilação global tanto em astrócitos quanto em neurônios no tempo de 1 h e nas concentrações acima de 10  $\mu\text{M}$ , e que o aumento em 1 h não é devido ao seu metabólito guanina. Em astrócitos corticais foi verificado se a guanosina previne alterações na captação de glutamato, viabilidade celular, e reatividade astrocitária induzida pelo peptídeo  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Dos parâmetros alterados pelo peptídeo  $\text{A}\beta_{1-42}$  pode-se observar que a guanosina preveniu o fenótipo de reatividade astrocitária. Uma vez identificadas modificações na SUMOilação, os possíveis mecanismos moleculares foram investigados. O bloqueio da internalização da guanosina, com dipiridamol, não alterou o aumento na SUMO2/3-ilação global induzida por guanosina, demonstrando uma ação extracelular da guanosina. O bloqueio dos receptores de adenosina do tipo  $\text{A}_1$  com o antagonista DPCPX, aboliu o efeito da guanosina. O antagonista de receptores  $\text{A}_{2\text{A}}$  de adenosina, ZM241385, aumentou a SUMOilação *per se*. Sugerindo que o receptor  $\text{A}_{2\text{A}}$  também modula a SUMO2/3-ilação. Para verificar o efeito da guanosina na perda de viabilidade mitocondrial, neurônios corticais foram incubados com rotenona. No protocolo empregado a guanosina foi capaz de alterar a incorporação do corante mitocondrial *mitotracker* e aumentar o fator de fissão mitocondrial, contudo para compreender o que esses resultados sugerem, experimentos futuros precisam ser realizados. Esta tese é a primeira a demonstrar que uma molécula endógena, o nucleosídeo guanosina, modulou a SUMOilação.

**Palavras-chave:** Peptídeo  $\beta$ -amiloide. Receptores de adenosina. Sistema purinérgico. SUMO.

## ABSTRACT

The aging process is physiological and affects both body and cognitive functions, with a concomitant decrease in biological functions throughout the individual's life. Aging is one of the risk factors for the development of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). In addition to the memory loss observed in AD patients, some important molecular changes in their brains go along with the symptoms of AD, for example, beta-amyloid (A $\beta$ ) peptide aggregates. SUMOylation is a posttranslational modification recently discovered where proteins called SUMO (small ubiquitin-like modifier) are target to proteins thereby promoting subcellular localization alteration, modifying the interaction with substrates among other functions. SUMOylation shown neuroprotective effects in different models. Among the endogenous molecules associated with neuroprotection, the nucleoside guanosine plays an important role as a neuromodulator and neuroprotectant in studies on aging and AD. In this sense, the objective of this thesis was to investigate if guanosine could modulate SUMOylation *in vivo* and promote behavioral changes, and wheater guanosine cloud modulate SUMOylation *in vitro* with the investigation of the possible mechanisms of action. For the *in vivo* study, C57BL/6 male mice from 3 and 24 month-old were used. The animals received guanosine (8 mg / kg intraperitoneal) for 14 days, and in the last 8 days underwent behavioral tests: open field, object relocation, Y-maze, splash, tail suspension and Morris's water maze. Guanosine treatment in young and aged mice *per se* did not change the locomotor activity. In young mice guanosine treatment improved short-term spatial memory in object relocation test. In aged mice, guanosine improved working-term spatial memory in the Y-maze test. Regarding the depressive-like behaviors, no effects were observed on the splash test on the grooming behavior. In the tail suspension test, guanosine increased the immobility time of young animals, suggesting an effect on coping strategies of these animals. For long-term spatial memory in the Morris water maze no differences were found. Regarding SUMOylation levels, there was a significant increase of global SUMO1-ylation in the hippocampus of young and old mice with guanosine treatment. The *in vitro* approach, it was evaluated in a time / concentration dependent manner if guanosine promoted modifications in the global protein SUMOylation. For this objective, astrocytes and neurons from cortical primary cultures were treated with 1, 10, 100, 300 and 500  $\mu$ M guanosine at times of 1, 6, 24 and 48 h. The results obtained in the *in vitro* characterization showed

that guanosine significantly increased the global SUMO2/3-ylation in both astrocytes and neurons at 1 h and in concentrations above 10  $\mu$ M. The increase observed in 1 h was not due to its metabolite guanine. In cortical astrocytes, it was verified if guanosine would promote changes in glutamate uptake, cell viability, astrocyte reactivity induced by the A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptide. From the parameters altered by the A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptide, guanosine prevented astrocytic reactivity phenotype. Once SUMOylation modifications were identified, the possible molecular mechanisms were investigated. Blockade of guanosine internalization with dipyridamole did not alter guanosine-induced global SUMO2/3-ylation increase, demonstrating an extracellular action of guanosine. Blocking A<sub>1</sub>-adenosine receptors with the DPCPX antagonist, abolished the effect of guanosine. The A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonist, ZM241385, increased SUMOylation *per se*. Suggesting that the A<sub>2A</sub> receptor also modulates SUMO2/3-ylation. To verify the guanosine effect in mitochondria viability, cortical neurons were incubated with rotenone. In the used protocol guanosine was able to alter the incorporation of mitochondrial dye mitotracker and increase mitochondrial fission factor. Although, further experiments are need to understand these results. This thesis is the first to demonstrate that an endogenous molecule, the nucleoside guanosine, modulated SUMOylation.

**Keywords:** Amyloid  $\beta$  peptide. Adenosine receptor. Purinergic system. SUMO.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de SUMOilação de proteínas alvo.....	31
<b>Figura 2:</b> Consequências da SUMOilação em diversas proteínas pré-existentes.....	33
<b>Figura 3:</b> Estruturas químicas da adenina e seus derivados.....	37
<b>Figura 4:</b> Estruturas químicas da guanina e seus derivados.....	38
<b>Figura 5:</b> Sistema purinérgico e seus componentes.....	39
<b>Figura 6:</b> Protocolo experimental utilizado no estudo <i>in vivo</i> .....	45
<b>Figura 7:</b> Peso dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos ao longo do período de tratamento com guanosina.....	51
<b>Figura 8:</b> Efeito da guanosina na atividade locomotora dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos no teste de campo aberto.....	52
<b>Figura 9:</b> Efeito da guanosina na memória espacial de curto prazo dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliada no teste de realocação de objetos.....	53
<b>Figura 10:</b> Efeito da guanosina na memória de trabalho dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliada no labirinto em Y.....	54
<b>Figura 11:</b> Efeito da guanosina no comportamento de autolimpeza dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliado no teste de borrifada de sacarose.....	55
<b>Figura 12:</b> Efeito da guanosina no comportamento de imobilidade dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliado no teste de suspensão pela cauda.....	56
<b>Figura 13:</b> Efeito da guanosina na memória espacial de longa duração dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliada no labirinto aquático de Morris.....	57
<b>Figura 14:</b> Efeito da guanosina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas no hipocampo de camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliado por <i>Western blotting</i> .....	58
<b>Figura 15:</b> Efeito da guanosina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas no córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliado por <i>Western blotting</i> .....	59
<b>Figura 16:</b> Efeito da guanosina na reatividade astrocitária induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	80
<b>Figura 17:</b> Efeito da guanosina no teste de viabilidade celular e expressão de GFAP em astrócitos tratados com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	81

<b>Figura 18:</b> Efeito da guanosina na captação de glutamato em astrócitos tratados com peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	82
<b>Figura 19:</b> Efeitos da guanosina em 1 h e 6 h na SUMO1-ilação global em astrócitos corticais.....	83
<b>Figura 20:</b> Efeito da guanosina em 24 h e 48 h na SUMO1-ilação global em astrócitos corticais.....	84
<b>Figura 21:</b> Efeito da guanosina em 1 h e 6 h na SUMO2/3-ilação global em astrócitos corticais.....	85
<b>Figura 22:</b> Efeito da guanosina em 24 h e 48 h na SUMO2/3-ilação global em astrócitos corticais.....	86
<b>Figura 23:</b> Efeitos da guanina em 1 h, 6 h e 24 h na SUMO2/3-ilação global de proteínas em astrócitos corticais.....	87
<b>Figura 24:</b> Efeito da guanosina em 1 h e 6 h na SUMO1-ilação global de proteínas em neurônios corticais.....	88
<b>Figura 25:</b> Efeito da guanosina em 24 h e 48 h na SUMO1-ilação global de proteínas em neurônios corticais.....	89
<b>Figura 26:</b> Efeito da guanosina em 1 h e 6 h na SUMO2/3-ilação global em neurônios corticais.....	91
<b>Figura 27:</b> Efeito da guanosina em 24 h e 48 h na SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios corticais.....	92
<b>Figura 28:</b> Efeito da guanosina em 1 h, 6 h, e 24 h, nos níveis de SENP3 em neurônios corticais.....	93
<b>Figura 29:</b> Efeitos da guanosina em 1 h na SUMO1-ilação e na SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios corticais tratados com o bloqueador do transporte de nucleosídeos.....	94
<b>Figura 30:</b> Efeito da guanosina em 1 h na SUMO2/3-ilação global em neurônios corticais tratados com antagonista do receptor de adenosina A <sub>1</sub> .....	95
<b>Figura 31:</b> Efeito da guanosina em 1 h na SUMO2/3-ilação global em neurônios corticais tratados com antagonista do receptor de adenosina A <sub>2A</sub> .....	96
<b>Figura 32:</b> Efeito da adenosina em 1 h na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios corticais.....	97
<b>Figura 33:</b> Efeito da guanosina na redução de viabilidade celular e SUMO2/3-ilação global de proteínas causadas pela rotenona, em neurônios corticais.....	113

<b>Figura 34:</b> Efeito da guanosina na SUMO1-ilação global de proteínas em neurônios corticais expostos à rotenona.....	114
<b>Figura 35:</b> Efeitos da guanosina nos níveis de MFF e Drp1 nos neurônios corticais expostos a rotenona.....	115
<b>Figura 36:</b> Efeito da guanosina no aumento de incorporação de <i>mitotracker</i> em neurônios corticais induzido por rotenona.....	116
<b>Figura 37:</b> Fotomicrografias confocais representativas da morfologia mitocondrial com marcação com <i>mitotracker</i> nos neurônios corticais.....	117
<b>Figura 38:</b> Efeito do knockdown de SENP3 na redução de viabilidade celular e SUMO2/3-ilação global de proteínas induzida por rotenona, e nas proteínas mitocondriais MFF e Drp1 em neurônios corticais.....	119
<b>Figura 39:</b> Representação esquemática dos possíveis efeitos da guanosina no protocolo com rotenona.....	126
<b>Figura 40:</b> Resumo dos resultados obtidos na abordagem experimental in vitro relacionados ao aumento na SUMOilação global de proteínas e seu mecanismo de ação.....	128
<b>Figura 41:</b> Confirmação do sitio de injeção i.c.v. com corante azul de Evans.....	153
<b>Figura 42:</b> Gráficos de ocupação obtidos pelo software Anymaze.....	155
<b>Figura 43:</b> Efeito da guanosina na fluorescência de iodeto de propídio em fatias hipocâmpais dos camundongos C57BL/6 que receberam a i.c.v. com peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	156
<b>Figura 44:</b> Efeito da guanosina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação em 48 h nos astrócitos incubados com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	157
<b>Figura 45:</b> Efeitos da guanina na SUMO1-ilação global em astrócitos corticais.....	158
<b>Figura 46:</b> Fotomicrografias representativas da morfologia de neurônios corticais obtidas em microscópio confocal.....	159
<b>Figura 47:</b> Efeito da guanosina na SUMO1-ilação global de proteínas em células HEK em 30 min e 1 h.....	161
<b>Figura 48:</b> Efeito da guanosina na SUMO2/3-ilação global de proteínas em células HEK em 30 min e 1 h.....	162
<b>Figura 49:</b> Efeito da guanosina na SENP3 em células HEK em 30 min e 1 h.....	163



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Isoformas das SENPs e a maturação/desconjugação das isoformas de SUMO.....	32
<b>Tabela 2:</b> Resumo dos efeitos do tratamento com guanosina (8mg/kg i.p.) nos diferentes testes comportamentais nos camundongos C57BL/6 jovens e idosos.....	66
<b>Tabela 3:</b> Resumo dos efeitos da guanosina e da guanina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas em astrócitos corticais.....	103
<b>Tabela 4:</b> Resumo dos efeitos da guanosina e da adenosina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios corticais.....	103
<b>Tabela 5:</b> Comportamentos observados nos camundongos C57BL/6 jovens tratados com guanosina e com a infusão do peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	154
<b>Tabela 6:</b> Lista de anticorpos utilizados para <i>Western Blotting</i> e imunocitoquímica.....	164



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 6-OHDA - 6-Hidroxidopamina
- A<sub>1</sub>R - Receptor de adenosina do tipo 1
- A<sub>2A</sub>R - Receptor de adenosina do tipo 2A
- AKT - Proteína cinase B
- AMPC - Adenosina monofosfato cíclico
- ANOVA - Análise de variância
- APP - Proteína precursora amiloide
- ATP - Adenosina trifosfato
- Aβ<sub>1-42</sub> - Peptídeo β-amiloide 1-42
- B27 - Suplemento para cultivo celular
- BK - Canais de K<sup>+</sup> dependente de Ca<sup>++</sup> de alta condutância
- BSA - Albumina de soro bovino
- Ca<sup>2+</sup> - Íon cálcio
- CNT<sub>1-3</sub> - Transportadores de nucleosídeos concentrativos
- DA - Doença de Alzheimer
- DMEM-F12 - Meio de Dulbecco modificado por Eagle
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DO - Densidade óptica
- DP - Doença de Parkinson
- DPCPX - 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina
- Drp1 - Proteína relacionada a dinamina 1
- E1 - Enzima ativadora (SAE1 e SAE2)
- E2 - Enzima conjugadora
- E3 - Enzima ligadora

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ENT<sub>1-4</sub> - Transportadores de nucleosídeos equilibrativos

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GDP - Guanosina difosfato

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial

GFP - Proteína fluorescente verde

GluR6 - Receptor ionotrópico de glutamate de kainato subunidade 2

GSK-3 $\beta$  - Glicogênio sintase quinase 3 beta

GTP - Guanosina trifosfato

GUA - Guanina

GUO - Guanosina

HBSS - Solução tampão de *Hank*

HGPRT - Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

HCl - Ácido clorídrico

HEK - Célula de rim de embrião humano

HO-1 - Heme-oxigenase 1

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

i.c.v. - Via intracerebroventricular

i.p. - Via intraperitoneal

K<sup>+</sup> - Íon potássio

kDa - Kilodaltons

KREBS - solução de *Henseleit*

LDH - Lactato desidrogenase

LTP - Potencialização de longa duração

MFF - Fator de fissão mitocondrial

MPP<sup>+</sup> - 1-metil-4-fenilpiridinium

MPTs - Modificações pós-traducionais  
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio  
MWM - Labirinto aquático de Morris  
Na<sup>+</sup> - Íon sódio  
NaCl - Cloreto de sódio  
NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida reduzido  
NaOH - Hidróxido de sódio  
NEM - N-etilmaleimida  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
PBS - Tampão salina fosfato  
PH - Potencial hidrogeniônico  
PI3K - Proteína cinase dependente de fosfatidilinositol  
PIAS - *Protein inhibitor of activated STAT*  
PNP - Purina nucleosídeo fosforilase  
PS1 - Presenilina 1  
PVDF - Difluoreto de polivinilideno  
RANGAP1 - *Ran GTPase-activating protein 1*  
SAE1 - *SUMO-activating enzyme subunit 1*  
SAE2 - *SUMO-activating enzyme subunit 2*  
SBF - Soro bovino fetal  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
SENPs - Sentrina proteases  
shRNA - RNA de interferência  
SH-SY5Y - Células de neuroblastoma humano  
SIM - Motivos de interação com a SUMO  
SNC - Sistema Nervoso Central

Src - *Scramble*- vírus controle de transfecção

SUMO - *Small ubiquitin-like modifier*

TBS-T - *Tris-buffered saline - tween 20*

TMRE - Éster etil tetrametilrodamina

UBC9 - Enzima conjugadora da SUMO 9

WB - *Western blotting*

ZM 241385 - 4-(-2-[7-amino-2-{2-furil}{1,2,4}triazol{2,3-a}{1,3,5} triazin-5-il- amino]etil)fenol

## SUMÁRIO

<b>Capítulo I - Avaliação dos efeitos da guanosina na memória e no comportamento tipo-depressivo de camundongos C57BL/6 jovens e idosos e o perfil de SUMOilação global de proteínas.....</b>	<b>26</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>26</b>
1.1 Envelhecimento, Doença de Alzheimer e Depressão.....	26
1.2 SUMOilação.....	29
1.3 SUMOilação e Neuroproteção.....	34
1.4 Sistema Purinérgico.....	37
1.5 Guanosina e Neuroproteção.....	40
1.6 Justificativa.....	42
<b>2 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>43</b>
2.1 Objetivos Específicos.....	43
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
3.1 Considerações Éticas.....	44
3.2 Animais.....	44
3.3 Tratamentos.....	44
3.4 Protocolo Experimental.....	45
3.5 Análises Comportamentais.....	45
3.5.1 Campo Aberto.....	46
3.5.2 Teste de Realocação de Objetos.....	46
3.5.3 Teste de Borrifada de Sacarose.....	47
3.5.4 Labirinto em Y.....	47
3.5.5 Teste de Suspensão pela Cauda.....	47
3.5.6 Labirinto Aquático de Morris.....	48
3.6 Preparo das amostras para <i>Western blotting</i> .....	48
3.7 <i>Western Blotting</i> .....	49
3.8 Análise Estatística.....	50
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1 Comportamentos.....	52
4.2 SUMOilação global de proteínas no hipocampo e córtex pré-frontal.....	57

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>Capítulo II - Caracterização dos efeitos da guanosina como possível modulador da SUMOilação em astrócitos e neurônios corticais, investigação do mecanismo de ação via receptores de adenosina e efeito glioprotetor da guanosina sobre a toxicidade do peptídeo A<math>\beta</math><sub>1-42</sub>.....</b>	<b>67</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>67</b>
1.1 Receptores de Adenosina.....	68
1.2 Justificativa.....	70
<b>2 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>71</b>
2.1 Objetivos Específicos.....	71
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>72</b>
3.1 Considerações Éticas.....	72
3.2 Cultivo Celular, Tratamentos e Protocolos Experimentais .....	72
3.2.1 Cultivo Primário de Astrócitos.....	72
3.2.2 Cultivo Primário de Neurônios.....	73
3.2.3 Tratamentos.....	73
3.2.4 Teste de Viabilidade Celular – MTT.....	75
3.2.5 Captação de Glutamato.....	75
3.2.6 Imunocitoquímica.....	75
3.2.7 Contagem de Astrócitos Apoptóticos e do Número de Processos.....	76
3.2.8 <i>Western Blotting</i> .....	76
3.2.9 Análise Estatística.....	77
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
4.1 Efeito da guanosina na reatividade astrocitária induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	79
4.2 Efeitos da guanosina sobre a SUMOilação global de proteínas em astrócitos.....	82
4.3 Efeitos da guanina no perfil de SUMOilação global de proteínas em astrócitos.....	86
4.4 Efeito da guanosina na SUMOilação global de proteínas em neurônios.....	88
4.5 Efeitos da guanosina na SENP3 em neurônios.....	92

4.6 Efeitos da guanosina na SUMOilação global de proteínas com o bloqueio dos transportadores de nucleosídeos em neurônios.....	93
4.7 Efeitos da guanosina na SUMOilação global de proteínas com o bloqueio dos receptores de adenosina A <sub>1</sub> e A <sub>2A</sub> .....	95
4.8 Efeitos da adenosina na SUMOilação global de proteínas em neurônios....	96
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
5.1 Efeito da guanosina no fenótipo de ativação astrocitária.....	98
5.2 Efeitos da guanosina na SUMOilação global de proteínas em astrócitos e neurônios.....	99
<b>Capítulo III - Avaliação dos efeitos da guanosina na disfunção mitocondrial.....</b>	<b>105</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>105</b>
1.1 Disfunção Mitocondrial.....	105
1.2 Justificativa.....	107
<b>2 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>108</b>
2.1 Objetivos Específicos.....	108
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>109</b>
3.1 Cultivo Primário de Neurônios.....	109
3.2 Tratamentos.....	109
3.3 Teste de Viabilidade Celular – MTT.....	109
3.4 Preparo das amostras para <i>Western blotting</i> .....	109
3.5 <i>Western Blotting</i> .....	110
3.6 Imunocitoquímica.....	110
3.7 Infecção Neuronal com Lentivírus.....	110
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>112</b>
4.1 Efeitos da guanosina sobre a diminuição da viabilidade celular e de SUMO2/3-ilação induzida por rotenona em neurônios corticais.....	112
4.2 Efeitos do <i>knockdown</i> da enzima SENP3 sobre a redução de viabilidade celular e SUMO2/3-ilação global de proteínas induzida por rotenona em neurônios corticais.....	118
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>119</b>

DISCUSSÃO GERAL.....	126
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>129</b>
REFERÊNCIAS.....	130
<b>APÊNDICE A</b> – Injeção i.c.v. de peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> nos camundongos C57BL/6 jovens e os respectivos comportamentos nos diferentes testes avaliados.....	153
<b>APÊNDICE B</b> – Efeito da guanosina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas nos astrócitos corticais incubados com peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	157
<b>APÊNDICE C</b> – Efeito da guanina nos níveis globais de SUMO1-ilação em astrócitos corticais.....	158
<b>APÊNDICE D</b> – Fotomicrografias representativas das culturas de neurônios.....	159
<b>APÊNDICE E</b> – Efeitos da guanosina em células HEK 293.....	160
<b>ANEXO A</b> – Lista dos anticorpos usados na presente tese.....	164
<b>ANEXO B</b> – Capítulo de livro: SUMOylation in Neurodegenerative diseases.....	164

## Organização e apresentação da tese

Essa tese foi dividida em três objetivos principais organizados em três capítulos.

No capítulo I são apresentados os efeitos da guanosina em camundongos C57BL/6 jovens e idosos em diferentes testes comportamentais com uma concomitante investigação do perfil de SUMOilação no córtex pré-frontal e hipocampo.

No capítulo II são apresentados os resultados de uma caracterização *in vitro* para os efeitos da guanosina na SUMOilação de proteínas em culturas de astrócitos e neurônios corticais. Nesse mesmo capítulo são apresentados os resultados obtidos no que tange a investigação dos mecanismos de ação da guanosina quanto à modulação da SUMOilação e o mecanismo de glioproteção da guanosina frente a reatividade astrocitária induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

No capítulo III são apresentados os resultados de uma investigação *in vitro* para os efeitos neuroprotetores da guanosina na disfunção mitocondrial que está presente em inúmeras doenças neurodegenerativas.

Quando houver a necessidade de adição de um novo tópico, para melhor compreensão, além do apresentado na introdução desse trabalho, em cada um dos capítulos é apresentado um aprofundamento teórico. Os objetivos específicos e os materiais e métodos de cada tópico estudado encontram-se descritos em seus respectivos capítulos.

## **Capítulo I - Avaliação dos efeitos da guanosina na memória e no comportamento tipo-depressivo de camundongos C57BL/6 jovens e idosos e o perfil de SUMOilação global de proteínas**

---

Esse capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Neuroquímica no Departamento de Farmacologia da UFSC, coordenado pela professora Dr<sup>a</sup>. Helena Cimarosti, e no Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas no Departamento de Farmacologia da UFSC, coordenado pelo professor Dr. Rui Prediger.

### **1 INTRODUÇÃO**

#### **1.1 Envelhecimento, Doença de Alzheimer e Depressão**

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2060, 1 em cada 4 brasileiros terá mais de 65 anos. A projeção para a expectativa de vida do brasileiro ao nascer – segundo essa mesma pesquisa – será alcançar 77,9 anos para homens e 84,2 anos para mulheres, ou seja, teremos um predomínio da população idosa no Brasil, fato esse que já acontece em outros países do mundo (ALVARENGA; BRITO, 2018; IBGE, 2018).

Por definição, o envelhecimento é uma redução das funções biológicas ao longo do tempo de vida de um indivíduo (SINGER, 2016). O processo de envelhecer é fisiológico, e afeta as funções tanto corporais quanto cognitivas. Vários são os fatores que se somam e afetam o funcionamento e o envelhecimento do cérebro, por exemplo, dietas altamente calóricas, baixa escolaridade, as próprias replicações celulares, os níveis de neurotransmissores, a idade avançada, entre outros (MATTSON, 2003; PETERS, 2006; GUEST, 2019).

Com o aumento na expectativa de vida observado nos últimos anos também é de se esperar um aumento no índice de doenças neurodegenerativas como, por exemplo, a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) (KARRAN; MERCKEN; DE STROOPER, 2011). A DA é a doença neurodegenerativa mais comum e acomete cerca de 35,6 milhões de pessoas no mundo sendo a maior causa de demência em idosos (MAZUREK, 2000). Estima-se que, em 2050, 100 milhões de pessoas terão a DA no mundo (KARRAN; MERCKEN; DE STROOPER, 2011). A DA é caracterizada por uma neurodegeneração irreversível, levando à uma série de sintomas iniciais e intermediários. Esses sintomas incluem perda progressiva da memória e do desempenho cognitivo, confusão com tempo e espaço, isolamento social, mudanças

de personalidade e no humor. Já os sintomas tardios incluem dificuldade de comunicação, mudanças de comportamento e desorientação (MATTSON, 2004; GALTS et al., 2019).

Segundo a *Alzheimer Association* (2018), cerca de 40% dos indivíduos diagnosticados com a DA também apresentam quadros de depressão que ocorre principalmente nos estágios iniciais e intermediários da DA. A depressão já foi considerada como um pré-sintoma, ou seja, antecede os sintomas característicos da DA. A depressão consiste de um distúrbio psiquiátrico sendo uma das maiores causas de incapacidade e afastamento de atividades. Acomete pessoas de todas as idades e no mundo todo, além disso, a depressão é um componente muito presente em doenças neurodegenerativas (GALTS et al., 2019).

Muito do conhecimento sobre a DA e a depressão vêm do estudo em diferentes modelos animais, embora alguns dos sintomas acima citados, tanto para a DA quanto para a depressão, sejam características puramente humanas, ou seja, não acontecem naturalmente em outras espécies tais como ratos, camundongos e primatas. Contudo, vários aspectos do aprendizado e memória bem como comportamentos tipo-depressivos podem muito bem ser explorados em modelos animais utilizando animais idosos, administração de drogas que promovam alterações no comportamento, intervenção cirúrgica, entre outros (HELLWEG et al., 2007; KRISHNAN; NESTLER, 2011; QUILLFELDT, 2015; SCHAMNE, et al., 2018).

De uma maneira didática, existem classificações para o estudo das memórias. É possível separá-las de acordo com a duração, onde uma memória de curta duração pode ser testada dentro de minutos ou horas ou uma memória de longa duração que pode ser testada em até dias ou meses. As memórias podem ser classificadas de acordo com o seu conteúdo, por exemplo, em humanos, memórias declarativas que envolvem a memória de fatos e eventos, ou de procedimentos como andar de bicicleta. Ainda, as memórias podem ser associativas ou não associativas, ou seja, uma tarefa que envolva a associação com um estímulo. As memórias ainda passam por um processo de formação dividido em aquisição, consolidação e evocação (para revisão ver SQUIRE, 1987; SQUIRE; KNOWLTON; MUSE, 1993, MCGAUGH, 2000; IZQUIERDO, 2002, QUILLFELDT, 2015).

Da mesma forma que o estudo das memórias, os comportamentos tipo-depressivos podem ser avaliados em diferentes testes validados na literatura. Por exemplo, o teste de borrifada de

sacarose pelo qual é possível avaliar algumas características tipo-depressivas através da redução/aumento no comportamento de autolimpeza, podendo ser interpretado como auto cuidado, motivação, anedonia. E o teste de suspensão pela cauda que, através dos parâmetros redução/aumento no tempo de imobilidade, avalia questões de desamparo comportamental uma vez que o animal, por não conseguir escapar da tarefa exibe a postura de imobilidade (para revisão ver CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; KRISHNAN; NESTLER, 2011; GALTS et al., 2019).

A perda de memória é uma característica observada na DA e em outros tipos de demência e tem relação com a morte neuronal nas áreas cerebrais afetadas, tais como hipocampo, amígdala e córtex, as quais se relacionam com a formação de memórias (CASELLI et al., 2006; JELLINGER et al., 2006). Além dos sintomas característicos da DA, existe uma série de alterações patofisiológicas que são multifatoriais mas podem ser classificadas de diferentes formas para permitir analisar e investigar as mudanças cerebrais que ocorrem na doença. Alterações macroscópicas cerebrais como, por exemplo, o encolhimento do cérebro são bem características na DA. Existem ainda mudanças microscópicas, tais como morte neuronal e alterações nos astrócitos (ROSSNER et al., 2005).

Outra característica bem evidente na DA seriam as mudanças moleculares como alterações em proteínas que são marcos patológicos da doença, como por exemplo, a hiperfosforilação da proteína tau e os depósitos extracelulares do peptídeo beta-amiloide ( $A\beta$ ) que formam as placas amiloides (MASTERS et al., 1985; GOEDERT et al., 1988; D'ANDREA et al., 2001; SELKOE, 2003; PARAMESHWARAN; DHANASEKARAN; SUPPIRAMANIAM, 2008; BALLARD et al., 2011; SERRANO-POZO et al., 2011). A formação das placas amiloides nos pacientes com DA é proveniente de uma clivagem diferencial da proteína precursora amiloide (*amyloid precursor protein*, APP). A APP é clivada por  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases, originando um peptídeo insolúvel capaz de agregar-se e causar neurotoxicidade.

Em indivíduos saudáveis, a clivagem da APP é efetuada pelas enzimas  $\alpha$ -secretase seguida pela  $\gamma$ -secretase, originando um peptídeo solúvel que não se acumula (para revisão ver CHOW et al., 2010). Após sua clivagem o peptídeo  $A\beta$  pode ter diferente número de aminoácidos, geralmente entre 38 e 43 (a nomenclatura utilizada demonstra esse número:  $A\beta_{1-40}$  - 40 aminoácidos, e  $A\beta_{1-42}$  - 42 aminoácidos). Estudos prévios já mostraram que o  $A\beta_{1-42}$  é mais insolúvel e mais abundante nas

placas amiloides do que o A $\beta$ <sub>1-40</sub> (SKOVRONSKY; DOMS; LEE, 1998; IWATSUBO et al., 1994).

Além dos processos de clivagem, uma vez sintetizadas, as proteínas podem passar por diferentes processos de regulação. Nesse contexto, tanto o dobramento proteico correto, quanto os processos de degradação e agregação de proteínas são mecanismos chave e regulados por um sistema denominado modificações pós-traducionais (MPTs) (HARTL, 2017). As MPTs são capazes de controlar a atividade de proteínas pré-existentes de uma forma a responder rapidamente às mudanças no meio intra e extracelular sem a necessidade de síntese de novo, mas promovendo alterações tanto na localização dessas proteínas alvo, quanto aspectos funcionais como a interação com outras proteínas, e ajustar os processos de agregação e degradação citados anteriormente (KHOURY; BALIBAN; FLOUDAS, 2011). Os exemplos de MPTs mais estudadas são fosforilação, acetilação, ubiquitinação, metilação, nedição e SUMOilação (FICULLE et al., 2018).

## 1.2 SUMOilação

O processo de SUMOilação já foi demonstrado como um importante regulador de proteínas envolvidas no envelhecimento celular, na DA e em inúmeras outras doenças do SNC, como isquemia, Parkinson, Huntington, entre outras (para revisão ver SILVEIRINHA; STEPHENS; CIMAROSTI, 2013; ANDERSON et al., 2017). Para entender de que forma um único fenômeno, a SUMOilação, pode acarretar modificações de inúmeras proteínas em tantas doenças distintas, é preciso entender primeiro o que é e como ocorre o processo de SUMOilação.

A SUMOilação é um fenômeno reversível e fisiológico, onde ocorre a ligação covalente de uma proteína de 101 aminoácidos chamada SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) em proteínas pré-existentes na célula. A SUMO liga-se covalentemente nas regiões consenso que contém o aminoácido lisina (Figura 1), modulando a atividade, estabilidade e localização subcelular da proteína pré-existente (HAY, 2005; GEISS-FRIEDLANDER; MELCHIOR, 2007; HENLEY et al., 2014). Atualmente são descritas 5 isoformas da proteína SUMO em mamíferos, denominadas SUMO1, SUMO2, SUMO3, SUMO4 e SUMO5. Compartilhando 50% de homologia com a isoforma SUMO1, existem as isoformas SUMO2 e SUMO3 (diferem por apenas 3 resíduos entre si) sendo assim denominada SUMO2/3. A SUMO2/3 possui uma lisina (11° resíduo) que lhe confere a capacidade de formar cadeias de

poli-SUMOilação. Essas caudas são estendidas até o momento que a isoforma SUMO1 é recrutada, pois, essa isoforma não pode ser auto-SUMOilada (TATHAM et al., 2001; BENCATH et al., 2002; BYLEBYL et al., 2003; GEISS-FRIEDLANDER; MELCHIOR, 2007; YEY, 2009; HENLEY et al., 2014; LIANG et al., 2016).

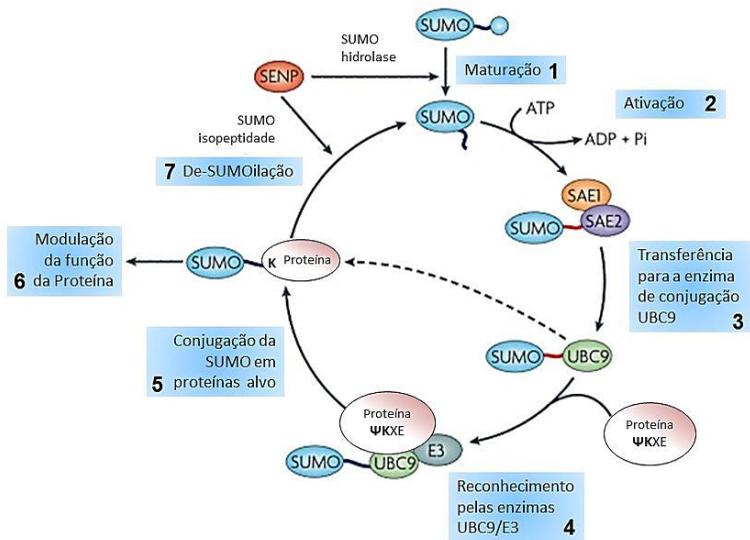
A SUMO4 foi descoberta em 2004, mas ainda não é claro se essa isoforma comporta-se como as demais conjugando-se a proteínas alvo. Sabe-se que ela é expressa em baixos níveis e pode ter sua expressão aumentada em períodos de estresse celular exacerbado, bem como é mais expressa no baço, linfonodos e rins, sendo implicada em disfunções como, por exemplo, diabetes (BOHREN et al., 2004; GUO et al., 2004; WEI et al., 2008). A isoforma SUMO5, descrita mais recentemente, em 2016, é tecido específica, podendo ser encontrada nos pulmões, baço e sangue periférico (LIANG et al., 2016).

As proteínas alvo podem ser SUMOiladas e deSUMOiladas devido ao ciclo de SUMOilação (Figura 1). A primeira etapa desse ciclo consiste na maturação da SUMO, com uma clivagem enzimática para expor a região di-glicina COOH-terminal pelas enzimas sentrina proteases (SENPs). Estão descritas seis SENPs em humanos SENP1-3 e SENP5-7 (HICKEY et al., 2012; HENLEY et al., 2014). Depois desse processo de maturação, um motivo di-glicina é exposto na SUMO, e a SUMO pode então ser ligada à região consenso nas proteínas alvo. Após a maturação, duas formas de ligar a SUMO às proteínas alvo são possíveis. Uma destas formas é de modo covalente, ou seja, o processo de SUMOilação propriamente dito, onde a região COOH-terminal do fragmento SUMO se liga em uma região consenso  $\Psi$ -K-x-D/E (onde  $\Psi$  é resíduo hidrofóbico, K-lisina, x um resíduo qualquer, D/E um resíduo ácido) na proteína alvo. Contudo, também está descrito na literatura que a SUMO pode vir a interagir com outras proteínas de forma não covalente, nas regiões chamadas SIM (*SUMO interacting motif*), esse processo não é denominado SUMOilação, mas sim interação com SUMO e requer diferentes regiões consenso da proteína alvo (HECKER et al., 2006; KERSCHER, 2007).

Seguindo a etapa de maturação da SUMO, a enzima E1 (heterodímero formado pelas subunidades SAE1 e SAE2), numa reação que requer o consumo de adenosina trifosfato (ATP), transfere a SUMO para a única enzima de conjugação E2 identificada até o momento, a UBC9. Cada vez mais, vêm sendo descritas enzimas E3 que atuam retirando a SUMO da enzima UBC9 e fazendo a transferência para a proteína alvo, sendo importantes para a SUMOilação de algumas proteínas. No entanto, apenas algumas proteínas precisam das enzimas

E3. Quando este é o caso, as enzimas E3 auxiliam na entrega da SUMO da UBC9 para a proteína alvo, um exemplo de enzimas E3 são uma família de proteínas denominadas PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*) (DESTERRO et al., 1997; GONG et al., 1997; JOHNSON; BLOBEL, 1997; LEE et al., 1998; SCHWARZ et al., 1998; GONG et al., 1999; SHARROCKS, 2006; DROESCHER et al., 2013; HENLEY et al., 2014). Sabe-se que a SUMOilação pode regular o seu próprio ciclo por meio da SUMOilação das enzimas envolvidas, a própria enzima de conjugação da SUMO, UBC9, pode ser SUMOilada (KNIPSCHEER et al., 2008), bem como a enzima de desconjugação SENP1 (BAILEY; O'HARE, 2004).

**Figura 1:** Ciclo de SUMOilação de proteínas alvo.



Uma descrição completa do ciclo pode ser encontrada no corpo do texto. Heterodímeros SAE1 e SAE2 formam a enzima E1 que transferem a SUMO para a enzima UBC9 (*SUMO conjugating enzyme 9*). Para algumas proteínas pode haver a necessidade de uma enzima E3. As proteínas SUMOiladas podem ser deSUMOiladas através das SENPs (*sentrin isopeptidases*). K: lisina; ΨKXE: região consenso para SUMOilação (adaptado de MARTIN et al., 2007).

Apesar de a SUMOilação ser uma modificação covalente, ela apresenta elevada reversibilidade, contribuindo para a plasticidade que as células possuem para responderem rapidamente às diferentes

exigências ambientais. Desta forma, além da maturação, as SENPs, também são responsáveis por remover o fragmento SUMO da proteína alvo e finalizar o ciclo de SUMOilação. Essas enzimas podem estar distribuídas de forma diferente na célula, e ainda, podem ter diferentes preferências pelas isoformas da SUMO (MUKHOPADHYAY; DASSO, 2007; YEH, 2009).

Como exemplificado na Tabela 1, sabe-se que a SENP1 e a SENP2 têm ampla especificidade por SUMO1 e SUMO2/3 e funcionam ambas na maturação e desconjugação dessas proteínas. SENP3 e SENP5 preferem a isoforma SUMO2/3 e funcionam removendo essa isoforma das proteínas alvo. SENP6 e SENP7 parecem agir preferencialmente na desconjugação das cadeias de poli-SUMO2/3, porém parecem incapazes de promover a maturação da SUMO2/3. SENP3 e SENP5 removem SUMO2/3 monomérica dos substratos e SENP6 e SENP7 removem as cadeias de SUMO2/3 dos substratos (HICKEY et al., 2012).

**Tabela 1:** Isoformas das SENPs e a maturação/desconjugação das isoformas de SUMO.

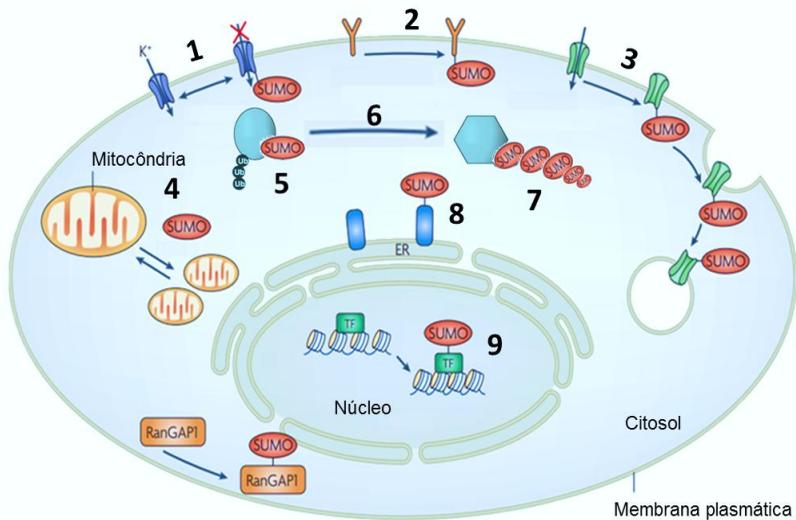
Nome	Isoforma	Maturação	Desconjugação
SENP1	SUMO1 e SUMO2/3	Sim	Sim
SENP2	SUMO2/3 e SUMO1	Sim	Sim
SENP3	SUMO2/3	ND*	Sim
SENP5	SUMO2/3	Não	Sim
SENP6	SUMO2/3	Não	Sim
SENP7	SUMO2-3	Não	Sim

\* ND: Não descoberto; Informações adaptadas de HICKEY et al., 2012; Fonte: o autor.

Os primeiros estudos sobre a SUMOilação sugeriam que se tratava de um fenômeno nuclear (KAMITANI; NGUYEN; YEH, 1997; SCHESCHONKA et al., 2007). Posteriormente, foram descobertas cada vez mais proteínas alvo da SUMOilação que estavam fora do núcleo (para revisão ver SCHESCHONKA et al., 2007; HENLEY et al., 2018). Apesar de tratar-se de um tópico de pesquisa relativamente novo, a importância do processo de SUMOilação tem sido muito bem demonstrada. Isso fica evidente em alguns estudos de manipulação genética onde ocorre a redução de proteínas da via de SUMOilação (*knockdown*) ou sua retirada (*knockout*). A UBC9 é necessária para a viabilidade celular, pois, sua deleção promove tanto anormalidades na

segregação de cromossomos quanto a morte do embrião de camundongos logo após a implantação (NACERDDINE et al., 2005). Também já foi observado que deletar a UBC9 leva a apoptose em células da linhagem DT40 (HAYASHI, 2002). Com relação a manipulações genéticas das isoformas da SUMO, um grupo mostrou que camundongos *knockout* para SUMO1 seriam viáveis, justificando que a SUMO2/3 poderia compensar a falta de SUMO1 (EVDOKIMOV et al., 2008; ZHANG et al., 2008). Em leveduras, retirar o único gene responsável pela expressão da proteína homóloga da SUMO1, as leveduras ainda permanecem viáveis, porém, crescem mais lentamente (TANAKA et al., 1999).

**Figura 2:** Consequências da SUMOilação em diversas proteínas pré-existentes.



Dentre as consequências da SUMOilação estão: (1) modular a abertura e o fechamento de canais iônicos, (2) interagir com receptores já inseridos na membrana, (3) promover a internalização de receptores alterando consequentemente a localização celular dos mesmos, (4) influenciar a dinâmica mitocondrial, em processos de fissão e fusão, (5) promover ou competir com outras MPTs como, por exemplo, caudas de poli-ubiquitina, (6) promover mudança conformacional, (7) poli-SUMOilação (SUMO2/3) de proteínas, (8) modular a atividade de uma proteína em diferentes compartimentos celulares, (9) atuar em fatores de transcrição nucleares, em proteínas de reparo do DNA e condensação de cromatina (adaptado de GEISS-FRIEDLANDER; MELCHIOR, 2007).

Pode-se observar na Figura 2 as inúmeras consequências que o processo de SUMOilação pode desencadear em uma proteína alvo, como por exemplo, desde a internalização de receptores de glutamato do tipo GluR6 (exemplo 3, na Figura 2) até o recrutamento de fatores inibitórios para a região promotora de um gene, modificando o estado da cromatina e impedindo a transcrição de um gene (exemplo 9, na Figura 2) (VERGER et al., 2003; GILL, 2005; ULRICH, 2005, GEISS-FRIEDLANDER, MELCHIOR, 2007; GEOFFROY, HAY, 2009; HENLEY et al., 2014).

Após essa breve revisão da literatura aqui apresentada, com uma descrição de como ocorre o processo de SUMOilação é possível perceber que qualquer proteína na célula com uma região consenso poderá ser SUMOilada. Recentemente foram descritas mais de 1600 proteínas que podem ser alvo da SUMO em mais de 4000 sítios de SUMOilação (HENDRIKS et al., 2014). Uma vez apresentado quais as consequências celulares e moleculares que a SUMOilação promove, é possível entender porque ela já foi implicada em inúmeras doenças neurodegenerativas (para revisão ver ANDERSON et al., 2017).

### 1.3 SUMOilação e Neuroproteção

A SUMOilação chamou muito a atenção de pesquisadores quando foi observado que ela estava dramaticamente aumentada em esquilos durante a hibernação, o que desde então levou à hipótese de que a SUMO poderia proteger as células quando as mesmas encontram-se em um ambiente de baixos níveis de oxigênio e glicose (LEE et al., 2007). A SUMOilação desde então tem sido implicada em diferentes doenças do SNC como, por exemplo, na isquemia. Neurônios hipocámpais expostos à privação de oxigênio e glicose (POG), um modelo de isquemia *in vitro*, apresentam elevada SUMOilação global de proteínas e a super-expressão de SENPs (enzimas desconjugantes) aumentam a morte neuronal (CIMAROSTI et al., 2012). Este entre outros estudos vêm acrescentando evidências sugerindo que a SUMOilação interfere com o destino de neurônios após um evento isquêmico, tendo potencial para induzir neuroproteção (CIMAROSTI et al., 2008; LEE et al., 2009; DATWYLER et al., 2011).

Em um curto espaço de tempo, grupos independentes mostraram que a SUMOilação estava implicada na disfunção sináptica e morte neuronal que ocorrem na DA, onde a APP e as  $\beta$ -secretases foram descritas como alvos da SUMO (DORVAL; FRASER, 2006; ZHANG; SARGE, 2008; YUN et al., 2013; MARTINS; TASCA; CIMAROSTI

2016). Em camundongos transgênicos para a DA (Tg2576, que super-expressam a APP mutada) análises de SUMOilação em bandas específicas mostraram-se significativamente diferentes no hipocampo e no córtex (MCMILLAN et al., 2011).

Já foi demonstrado que a ativação neuronal normal promoveu aumento da SUMOilação. Em animais transgênicos para DA, bem como em amostras de hipocampo de pacientes confirmados com a DA houve uma redução de SUMO2/3-ilação principalmente em proteínas de alto peso molecular. A SUMO2/3-ilação também mostrou-se diminuída no hipocampo dos animais transgênicos Tg2576 em 8, 14 e 26 meses de idade. Neste mesmo estudo Lee e colaboradores (2014) mostraram que o prejuízo cognitivo causado pelo A $\beta$  foi revertido pelo aumento da enzima de conjugação da SUMO, UBC9, recuperando os déficits na potencialização de longo prazo (LTP) e memória (LEE et al., 2014). Também já foi demonstrado que a enzima histona deacetilase pode ser SUMOilada, e esse mecanismo atuaria como protetor em animais transgênicos para a DA (APP/PS1, mutantes para proteína precursora amiloide e presenilina 1) (ZHANG et al., 2012; TAO et al., 2017; ZUSSO et al., 2018).

Por outro lado, Cho e colaboradores (2015), ao investigar os níveis de SUMO1 no plasma de pacientes, observaram um aumento significativo dessa isoforma nos pacientes com DA comparado com indivíduos idosos controle (CHO et al., 2015). Marcelli e colaboradores (2016) sugeriram que a SUMOilação poderia ser um alvo farmacológico na disfunção sináptica que ocorre na DA, uma vez que um aumento nos níveis de SUMO1-ilação foi observado no córtex de pacientes com DA.

Em 2014 Wang e colaboradores sugeriram que a SUMOilação é essencial para formação de memórias aversivas, após realizarem experimentos em camundongos com *knockdown* das três isoformas SUMO1-3. A diminuição das isoformas afetou mais áreas como hipocampo, amígdala e a camada cinco do córtex. Os animais com menos SUMOilação demonstraram prejuízo na memória de medo e respostas com características ansiogênicas, além de uma diminuição de densidade de espinhas dendríticas. Contrário a estes achados Matsuzaki e colaboradores (2015) observaram que camundongos transgênicos que super-expressavam SUMO1 em áreas como o hipocampo, córtex, cerebelo e bulbo apresentavam diminuição da transmissão sináptica basal, prejuízo pré-sináptico, perda de espinhas dendríticas, juntamente com um prejuízo na formação de memória de medo contextual. Esses resultados controversos podem ser atribuídos a diferenças no modelo experimental empregado e ainda na diferente manipulação genética,

pois, um estudo retirou as três isoformas ao passo que no outro houve a super-expressão de apenas SUMO1.

Com relação ao envelhecimento, um estudo realizado em tecido de murinos e humanos comparando jovens e idosos mostrou um aumento de SUMOilação global de proteínas nos indivíduos idosos, sugerindo que a SUMOilação teria um papel importante no processo de envelhecimento (ANDREOU; TAVERNARAKIS, 2010). Nesse mesmo contexto, já foi demonstrado que a UBC9 influencia no retardo da senescência celular (MCMANUS et al., 2018). Em um estudo sobre o perfil ontogenético da SUMOilação global em camundongos, foi observado que ocorreu um pico na conjugação de SUMO1 e SUMO2/3 aos 6 meses (camundongos adultos), enquanto que aos 18 meses (camundongos idosos) ocorreu uma redução de ambas isoformas (FICULLE et al., 2018).

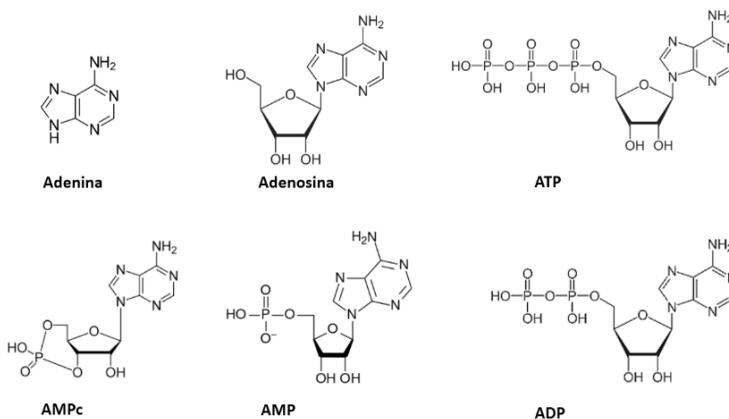
Considerando a quantidade de proteínas alvos da SUMOilação, e o impacto celular que ela causa, surgiu nos últimos anos o grande interesse em promover sua modulação. Até 2009, não haviam sido descritas moléculas químicas que pudessem modular a SUMOilação. Entretanto, hoje em dia está crescendo cada vez mais o número de trabalhos que buscam moléculas capazes de modular esta importante maquinaria celular. Um dos trabalhos pioneiros na busca de moduladores da SUMOilação avaliou uma biblioteca de compostos botânicos, e descreveu que o ácido gincólico (presente na planta *Ginkgo biloba*) inibiu a SUMOilação global de proteínas (SUMO1) na concentração de 100 µg/mL, o mesmo efeito foi observado com seu análogo ácido araquidônico, ambos diminuíram a SUMOilação sem afetar a ubiquitinação, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (FUKUDA et al., 2009). Desde então, antibióticos, flavonóides, polifenóis entre outros compostos biológicos e sintéticos foram identificados como moduladores da SUMOilação (SUZAWA et al., 2015).

Nos últimos anos os efeitos neuroprotetores de uma molécula endógena do sistema purinérgico, a guanosina, vêm sendo investigados em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (LANZNASTER, et al., 2016a; TASCA, et al., 2018). Estudos já demonstraram tanto um potencial efeito anti-envelhecimento da guanosina em células gliais (SOUZA et al., 2016), quanto neuroproteção contra a exposição ao peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> *in vivo* (LANZNASTER, et al., 2017) e *in vitro* (PETTIFER et al., 2004), sugerindo que a guanosina pode ser um importante neuromodulador do SNC.

## 1.4 Sistema Purinérico

O sistema purinérico possui inúmeras enzimas, moléculas e receptores já descritos e identificados. Essas moléculas compreendem os derivados da guanina e da adenina, que constituem o grande grupo das purinas. Os primeiros estudos dessa área inicialmente caracterizaram esses componentes como sinalizadores intercelulares. Os derivados da adenina até o momento foram mais estudados e apresentam um volume maior de dados na literatura, eles compreendem a adenosina, ATP, adenosina-5'-difosfato (ADP), adenosina-5'-monofosfato (AMP) e a adenosina-5'-monofosfato cíclica (AMPC) (Figura 3) (para revisão ver SCHIMIDT, LARA; SOUZA, et al., 2007; LANZMASTER, et al 2016a).

**Figura 3:** Estruturas químicas da adenina e seus derivados.

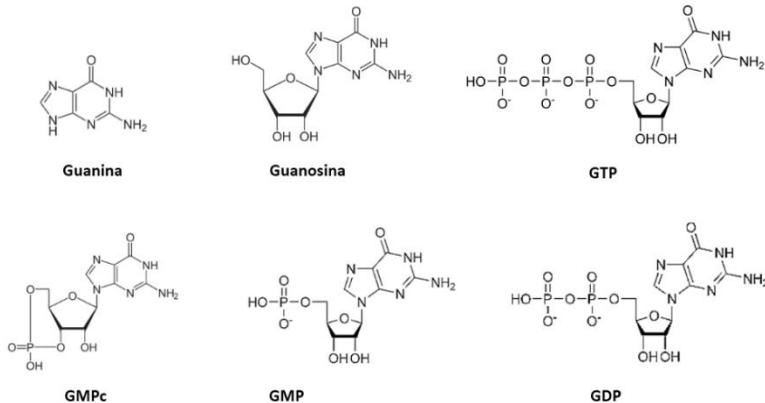


ATP: Adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; AMP: adenosina monofosfato; AMPC: adenosina monofosfato cíclica. Fonte: o Autor.

Os derivados da guanina por sua vez, compreendem a guanosina, guanosina-5'-trifosfato (GTP), guanosina-5'-difosfato (GDP), guanosina-5'-monofosfato (GMP) e a guanosina-5'-monofosfato cíclica (GMPC) (Figura 4). Inicialmente os derivados da guanina foram descritos como moduladores de processos intracelulares relacionados com as proteínas G, que participam como efetoras na transdução de sinal intracelular, uma vez que a atividade dessas proteínas requer a hidrólise de GTP (estado ativo) para GDP (estado inativo) (para revisão ver

SCHIMIDT; LARA; SOUZA, et al., 2007; LANZNASTER, et al 2016a).

**Figura 4:** Estruturas químicas da guanina e seus derivados.

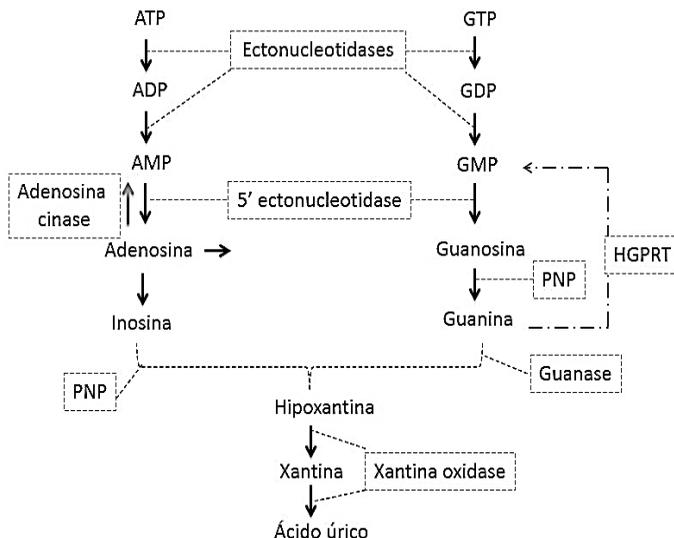


GTP: guanosina trifosfato; GDP: guanosina difosfato; GMP: guanosina monofosfato; GMPC: guanosina monofosfato cíclica. Fonte: o Autor.

Na Figura 5 pode-se observar os componentes do sistema purinérgico e algumas enzimas que participam de sua regulação. As ectonucleotidases são as enzimas responsáveis por clivar o ATP e o GTP até AMP e GMP, a partir desse passo as 5'-ectonucleotidases formam adenosina e guanosina, respectivamente. Na reação seguinte, a adenosina é degradada à inosina e a guanosina é degradada à guanina. Finalmente, essas duas moléculas são metabolizadas à hipoxantina, xantina, ácido úrico e podem ser eliminadas do organismo (para revisão ver SCHIMIDT; LARA; SOUZA, et al., 2007; LANZNASTER, et al 2016a).

Uma vez identificado os efeitos intracelulares, os efeitos extracelulares das purinas começaram a ganhar atenção de pesquisadores de diferentes áreas e inúmeras implicações foram atribuídas a elas como será descrito a seguir. A literatura sugere que o metabolismo das purinas *per se* está alterado nos estágios iniciais da DA, com redução significativa nos níveis de adenosina e guanosina em estruturas como o córtex pré-frontal (ALONSO-ANDRÉS et al., 2018).

**Figura 5:** Sistema purinérgico e seus componentes.



PNP: Purina nucleosídeo fosforilase; HGPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase; ATP: Adenosina trifosfato; ADP: Adenosina difosfato; AMP: Adenosina monofosfato; GTP: Guanosina trifosfato; GDP: Guanosina difosfato; GMP: Guanosina monofosfato; Fonte: o Autor.

Estratégias terapêuticas como o uso de inibidores das enzimas que degradam AMPc e GMPc (fosfodiesterases), componentes importantes do sistema purinérgico, já mostraram efeito em relação à melhora de memória tanto de animais idosos quando em modelos da DA, sendo sugeridas pelos autores como uma alternativa farmacológica para o tratamento da DA (HECKMAN; WOUTERS; PRICKAERTS, 2015).

O sistema purinérgico da adenina é melhor caracterizado comparado com os dos derivados da guanina (LANZNASTER et al., 2016a). Existem evidências de que o GTP pode ser armazenado e liberado de vesículas sinápticas, sugerindo que os derivados da guanina podem atuar como neurotransmissores (SANTOS; SOUZA; TASCA, 2006). As enzimas extracelulares que hidrolisam os nucleotídeos da adenina também o fazem com os da guanina (ZIMMERMANN, 1996). Apesar de a guanosina ser produzida no meio extracelular (CICCARELLI, 2001), ainda não foram identificados receptores para guanosina, embora seu efeito neuroprotetor já tenha sido descrito em

diversos modelos de degeneração neural, *in vivo* e *in vitro* (para revisão ver SCHIMIDT, LARA; SOUZA et al., 2007; LANZNASTER, et al 2016a, BETTIO; GIL-MOHAPEL; RODRIGUES 2016; TASCA et al 2018; DI LIBERTO et al 2016).

### 1.5 Guanosina e Neuroproteção

Em modelos *in vitro*, a guanosina protegeu células de neuroblastoma (SH-SY5Y) contra apoptose induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> (PETTIFER et al., 2004). Em um estudo posterior Tarozzi e colaboradores (2010) também observaram efeito protetor da guanosina em células SH-SY5Y contra a toxicidade do peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>, mas apenas quando ambos (guanosina e A $\beta$ <sub>1-42</sub>) são adicionados concomitantemente. Já mudanças relacionadas com o processo de envelhecimento de astrócitos, como redução na captação de glutamato e na atividade da enzima glutamina sintetase, bem como alterações em mediadores inflamatórios, foram prevenidas pela guanosina (SOUZA et al., 2016). Além disso, a guanosina protegeu fatias de estriado submetidas ao modelo *in vitro* da DP que utiliza 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma toxina que bloqueia o complexo I mitocondrial, aumenta os radicais livres e promove disfunção mitocondrial com depleção dos níveis de ATP (MARQUES; MASSARI; TASCA, 2019). A guanosina também já protegeu contra disfunção mitocondrial induzida por um modelo de desbalanço de Ca<sup>2+</sup> reduzindo espécies reativas de oxigênio (COURTES et al., 2019).

Sabe-se que em abordagens *in vivo* para investigação da DA muitos estudos utilizam como modelo experimental uma única administração do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> e/ou A $\beta$ <sub>1-42</sub> para mimetizar algumas alterações relacionadas aos estágios iniciais da DA (PREDIGER et al., 2007; MARTINS et al., 2015; BICCA et al., 2015). Nesse contexto, Lanznaster e colaboradores (2017) avaliaram o efeito do tratamento crônico com guanosina (8 mg/kg, i.p.) por 14 dias consecutivos em camundongos *Swiss* submetidos à infusão intracerebroventricular com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> e observaram que a guanosina preveniu os déficits de memória e o comportamento anedônico causado pelo A $\beta$ <sub>1-40</sub> (LANZNASTER, et al., 2017).

Já foi observado que a guanosina aumenta fisiologicamente após duas horas em um evento isquêmico e se mantém em níveis elevados até 7 dias (UEMURA et al., 1991). Em astrócitos, a exposição à hipoglicemia e hipóxia aumenta os níveis extracelulares dos derivados da adenina em 2,5 vezes e os derivados da guanina em 3,5 vezes

(CICCARELLI et al., 1999). Esse aumento na liberação endógena de guanósina já foi demonstrado ser protetor em modelos de isquemia (OLESKOVICZ et al., 2008; DAL-CIM et al., 2011). O efeito protetor se estende a resultados *in vivo* em que ratos que receberam a guanósina tiveram prevenção no prejuízo comportamental e cerebral após evento isquêmico (RAMOS et al., 2016). Quando administrada de forma aguda (8 mg/kg) depois da oclusão da artéria cerebral, a guanósina, foi capaz de prevenir o prejuízo cognitivo, diminuir o volume de infarto celular e atenuar a inflamação (RATHBONE et al., 2011; HANSEL et al., 2015).

Em camundongos adultos a guanósina administrada previamente a indução do modelo de convulsão induzida por ácido quinolínico, preveniu as crises convulsivas (DE OLIVEIRA et al., 2004). Em sinaptossomas de ratos *Wistar* a guanósina também foi capaz de prevenir a liberação de glutamato causada pelo ácido quinolínico, sugerindo que a guanósina pode atuar no sistema glutamatérgico (TAVARES et al., 2005). A guanósina já apresentou efeitos tipo-ansiolíticos que parecem envolver os sistemas glutamatérgicos e adenosinérgicos (ALMEIDA et al., 2017). Já foi demonstrado no traumatismo craniano que a administração aguda de guanósina promove neuroproteção via sistema adenosinérgico, melhora dano mitocondrial e recupera os níveis de transportadores de glutamato gliais (GERBATIN et al., 2016; DOBRACHINSKI et al., 2017; GERBATIN, et al., 2019).

Já foi demonstrado que camundongos *Swiss* tratados com guanósina (5 mg/kg/dia, via oral) por 21 dias apresentaram um aumento no número de neurônios imaturos no giro denteado do hipocampo mostrando um potencial neurogênico acompanhado de um efeito tipo antidepressivo avaliado no teste de suspensão pela cauda (BETTIO et al., 2016). Cabe salientar que dentro da revisão da literatura aqui apresentada, não foram encontrados estudos publicados que avaliaram os efeitos da guanósina no SNC utilizando camundongos C57BL/6 como modelo animal, apenas camundongos *Swiss* e ratos *Wistar*.

Dentro dos mecanismos de ação já propostos para a guanósina, evidências apontam que a guanósina atue em vias de sinalização intracelular que incluam a enzima glicogênio sintase cinase  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ), essa serina/treonina cinase é importante em uma série de eventos biológicos como metabolismo e morte celular e é um componente da via de sinalização da PI3K/AKT. Diferentes trabalhos, utilizando diferentes modelos experimentais, demonstraram que a guanósina promoveu a fosforilação das enzimas GSK3 $\beta$ , AKT, em fatias hipocámpais (MOLZ et al., 2011), em células SH-SY5Y (DAL CIM et al., 2012), e em astrócitos corticais (DI IORIO et al., 2004). Também já

foi demonstrado que a guanosina aumenta a fosforilação da proteína *cAMP response element binding* (CREB, um fator de transcrição celular) em células tronco neuronais (SU et al., 2013). Esses resultados sugerem que a guanosina pode atuar em MPTs, uma vez que ela aumentou a fosforilação das proteínas acima mencionadas. Entretanto, até o presente momento ainda não existem trabalhos publicados que mostrem que a guanosina também possui um efeito na SUMOilação de proteínas.

Com base no exposto acima a hipótese do presente trabalho é de que a guanosina possui um novo mecanismo de ação ainda não descrito na literatura, onde é capaz de modular a SUMOilação global de proteínas, *in vivo* e *in vitro*, e um dos mecanismos de ação possíveis para esse efeito é via modulação dos receptores de adenosina.

## 1.6 Justificativa

Como apresentado na introdução do presente trabalho a guanosina possui inúmeros efeitos protetores *in vivo*. Muitos dos trabalhos avaliaram os efeitos da guanosina em ratos *Wistar* e em camundongo *Swiss*, entretanto não foram encontrados trabalhos publicados que avaliassem os efeitos da guanosina na linhagem C57BL/6. Por esses motivos foi avaliado se a guanosina promoveria melhora cognitiva e seu potencial efeito antidepressivo em camundongos C57BL/6 jovens e idosos. Em razão de os mecanismos de ação da guanosina ainda não estarem totalmente elucidados, mas por ela apresentar uma capacidade de modular MPTs, foi analisado se a guanosina modularia o perfil de SUMOilação no hipocampo e no córtex pré-frontal desses animais.

## 2 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito *in vivo* da guanosina na memória e no comportamento tipo-depressivo de camundongos C57BL/6 jovens (3 meses) e idosos (24 meses) e determinar os níveis de SUMOilação global nas principais estruturas cerebrais envolvidas nestes processos.

### Objetivos Específicos

- 1- Analisar o efeito da guanosina na memória e no comportamento tipo-depressivo de camundongos C57BL/6 jovens e idosos tratados com guanosina por 14 dias.
- 2- Determinar o efeito da guanosina nos níveis de SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 jovens e idosos tratados com guanosina por 14 dias.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Considerações Éticas

Todos os procedimentos utilizados neste trabalho estão de acordo com os padrões éticos e cuidado animal do comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram seguidas as recomendações éticas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 1454270417.

#### 3.2 Animais

Foram utilizados 53 camundongos jovens (3 meses) e 20 camundongos idosos (24 meses) da linhagem C57BL/6, pesando entre 28-35 g. Os animais foram mantidos em grupos de 4 ou 5, em caixas de polipropileno. A temperatura do biotério e da sala de experimentos foi mantida em  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . O ciclo de luz (12 /12 h) foi controlado, as luzes acendiam as 7 h da manhã, os animais tiveram livre acesso à água e comida. Antes de todos os experimentos os animais eram ambientados na sala de experimentação por pelo menos 20 min. Os animais foram pesados em dias intercalados para acompanhar possíveis alterações devido ao tratamento intraperitoneal (i.p.) se estender por 14 dias.

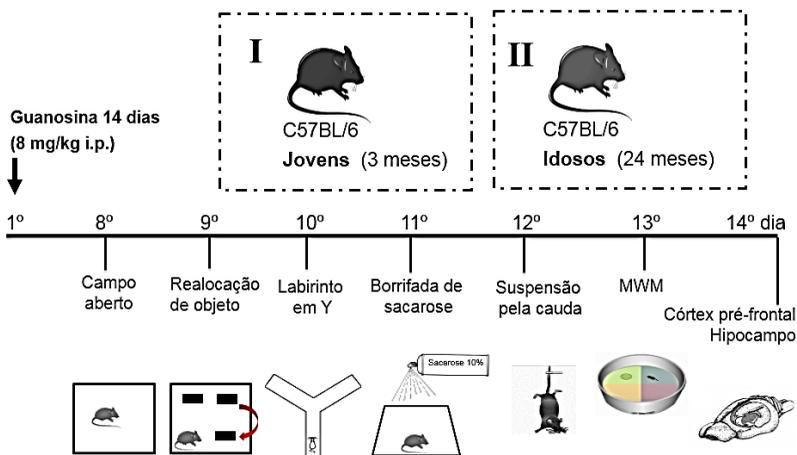
#### 3.3 Tratamentos

A guanosina (nº de catálogo E6752 – Sigma-Aldrich) foi diluída em solução salina, e a dose utilizada de 8 mg/kg (i.p.) foi retirada de trabalhos prévios (LANZNASTER et al., 2017). Os animais controle receberam o mesmo volume de solução salina (10 mL/kg, i.p.). No presente estudo, foi avaliado o comportamento dos animais durante o período de administração de guanosina e não após como em estudos anteriores (LANZNASTER et al., 2017). Os tratamentos foram realizados sempre no período da manhã e os testes comportamentais no período da tarde para evitar resultados devido ao efeito agudo da guanosina. Dos animais jovens utilizados nesse estudo, 25 receberam injeções intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo  $A\beta_{1-42}$  (400 pmol), no terceiro ventrículo. Como não foram observadas alterações comportamentais os resultados obtidos com esses animais encontram-se no apêndice A.

### 3.4 Protocolo Experimental

Todos os animais passaram pela mesma bateria de testes comportamentais como exemplificado na Figura 6. Contudo, os animais jovens e idosos passaram pelo protocolo experimental em dias independentes, por esse motivo o efeito do fator idade não foi avaliado. As idades escolhidas de 3 e 24 meses estão de acordo com trabalhos da literatura onde os animais são considerados adultos e idosos respectivamente (FLURKEY; CURRER; HARRISON, 2007; THE JACKSON LABORATORY, 2019).

**Figura 6:** Protocolo experimental utilizado no estudo *in vivo*.



No primeiro dia, os camundongos da linhagem C57BL/6, jovens e idosos, em experimentos independentes, receberam o primeiro tratamento com guanosina ou salina pela via intraperitoneal. Os testes comportamentais começaram a partir do 8º dia, na seguinte ordem: campo aberto, realocação de objetos, labirinto em Y, borrifada de sacarose, teste de suspensão pela cauda, treino e teste no labirinto aquático de Morris (MWM). No 14º dia após o teste no MWM os animais foram eutanasiados e o hipocampo e o córtex pré-frontal foram coletados para as análises de SUMOilação.

### 3.5 Análises Comportamentais

Com o intuito de eticamente diminuir o uso de animais, os camundongos utilizados nesse estudo foram submetidos a uma bateria

de testes comportamentais, seguindo uma ordem onde o teste considerado menos aversivo foi realizado primeiro e o mais aversivo por último. O primeiro teste realizado foi o do campo aberto, seguido pelos testes de reconhecimento de objetos, labirinto em Y, borrifada de sacarose, suspensão pela cauda e labirinto aquático de Morris (MWM) (Figura 6). Os animais foram submetidos a apenas um dos testes por dia e todos os testes foram realizados em salas com baixa luminosidade. Pistas visuais foram fixadas nas paredes da sala de experimentação nos testes de campo aberto, realocação de objetos, labirinto em Y e MWM. Os aparatos foram limpos com álcool 10% entre cada animal. Os comportamentos foram filmados e gravados para análise posterior.

### 3.5.1 Campo Aberto

O campo aberto consiste em uma arena quadrangular (40 x 40 x 40 cm) e a habituação dos animais a este ambiente foi analisada. Os animais foram expostos ao campo aberto durante 10 min e foram avaliados distância total percorrida, tempo de permanência no centro do aparato e número de entradas na área central do aparato (VINADÉ et al., 2005; RIAL et al., 2014). A primeira exposição ao campo aberto foi considerada como uma familiarização à caixa experimental para a realização do teste de realocação no dia seguinte.

### 3.5.2 Teste de Realocação de Objetos

O teste de realocação de objetos consistiu em duas sessões de 5 min cada. Na primeira sessão (treino), dois objetos idênticos (peças Lego® medindo 3 x 5 x 4 cm) foram colocados no aparato, afastados 8 cm das paredes do aparato. Após 90 min, os animais foram re-expostos à caixa (sessão teste), porém o objeto da direita foi deslocado 45 graus mantendo o afastamento de 8 cm das paredes do aparato. Foram analisados o tempo total de exploração dos objetos no treino e no teste. Foi considerado exploração do objeto o tempo em que o animal cheirou ou moveu suas vibrissas a 1 cm dos mesmos. O índice de discriminação foi obtido pela divisão entre o tempo ( $T$ ) de exploração do objeto deslocado vezes 100, dividido pelo tempo de exploração do objeto deslocado somado com o tempo de exploração do objeto não deslocado (objeto familiar), de acordo com a seguinte fórmula  $T_{\text{deslocado}} \times 100 / T_{\text{deslocado}} + T_{\text{familiar}}$ .

### 3.5.3 Teste de Borrifada de Sacarose

No teste de borrifada de sacarose é avaliado o comportamento de autolimpeza, o qual é geralmente interpretado na literatura como auto-cuidado (TAKSANDE et al., 2013). Os animais foram colocados em funis de vidro transparente (25 x 10 cm de diâmetro) para ambientação durante 5 min antes do início do teste. O teste consistiu em borrifar uma solução contendo sacarose 10% no dorso do animal, onde são contabilizados o tempo total de autolimpeza (seja da face, focinho, cabeça ou corpo inteiro) e a latência do animal em iniciar a primeira autolimpeza, esse teste teve duração de 5 min (MORETTI et al., 2012).

### 3.5.4 Labirinto em Y

Esse teste permite avaliação da memória espacial de trabalho, que pode ser avaliada pela quantidade de alternâncias corretas entre os braços do labirinto. Os animais foram colocados no centro do labirinto em Y. Cada um dos três braços (45 cm de comprimento x 5 cm de largura), espaçados em 120°, foram identificados como A, B ou C. O teste tem duração de 5 min. Cada entrada foi contabilizada apenas quando o animal entrou com as quatro patas em um dos braços. Considerou-se uma alternância correta quando três braços diferentes foram visitados em sequência sem repetir o braço anterior (ABC, BCA, CBA, CAB, ACB) e a quantidade máxima de alternâncias espontâneas foi quantificada como o número total de entradas nos braços do labirinto menos dois. Assim, a porcentagem de alternâncias corretas foi calculada pela fórmula  $[(\text{alternâncias realizadas}/\text{número máximo de alternâncias}) \times 100]$  (ONAOLAPO; ONAOLAPO, 2013; LANZMASTER et al., 2017).

### 3.5.5 Teste de Suspensão pela Cauda

Para avaliar o comportamento tipo-depressivo foi utilizado o teste de suspensão pela cauda, do tipo validade preditiva uma vez que antidepressivos clássicos diminuem o tempo de imobilidade (STERU et al., 1985). Os animais foram suspensos 50 cm acima do chão e presos pela extremidade da cauda por fita adesiva (aproximadamente 2 cm da ponta da cauda). Para evitar o comportamento de escalada na própria cauda foi utilizado um cilindro transparente de 4 cm e o tempo de imobilidade foi avaliado durante 6 min (LANZMASTER et al., 2017).

### 3.5.6 Labirinto Aquático de Morris

Para o estudo da memória espacial de longa duração foi utilizada uma versão modificada do labirinto aquático desenvolvido por Morris e colaboradores em 1982. O aparato experimental consistiu de um tanque de 1 m de diâmetro, completo com água em uma profundidade suficiente para cobrir uma plataforma submersa. O protocolo experimental, nessa versão modificada é feito em 2 dias. Foi adicionado na água, tinta guache branca para deixar a água turva, facilitando o contraste entre a cor do animal e a cor da água, o que é necessário para análise no *software Anymaze* e também para impedir que o animal veja a plataforma submersa.

No dia do treino, uma plataforma (10 x 10 cm), foi submersa 1-1,5 cm, no centro de um dos 4 quadrantes. Em cada parede da sala do MWM foram adicionadas pistas visuais (50 x 50 cm) posicionadas 30 cm acima da piscina. Cada camundongo foi colocado cuidadosamente na piscina virado para a parede e nadou por 60 s, o animal foi treinado a encontrar a plataforma submersa sendo colocado em todos os quadrantes do tanque. Após 60 s de cada treino se o animal não encontrasse a plataforma era colocado na mesma onde permanecia por 10 s. Neste protocolo, esse procedimento foi repetido 10 vezes (foi adotado um intervalo entre os treinos, antes de recolocar o mesmo camundongo no tanque). Os tempos que cada animal levou para encontrar a plataforma no dia do treino também foram registrados para analisar uma curva de aprendizagem. No segundo dia foi realizado o teste: a plataforma foi removida e o tempo que o animal levou para atingir o local onde a plataforma estava e também o número de cruzamentos nessa região e o tempo em cada quadrante foram avaliados. Tanto os treinos quanto o teste (duração 60 s) foram gravados com auxílio de câmera de monitoramento instalada acima do tanque.

### 3.6 Preparo das amostras para *Western blotting*

Após as análises comportamentais, os animais foram eutanasiados e as estruturas, hipocampo e córtex pré-frontal, foram dissecadas em papéis filtros umedecidos com tampão salina fosfato (PBS 1X, nº de catálogo: 590338 Laborclin) sobre gelo, foram pesadas e colocadas em nitrogênio líquido, e armazenadas a -80°C até o uso. O descongelamento das amostras foi realizado em 300 µL (hipocampo) e 400 µL (córtex pré-frontal) de tampão de lise (Tris (pH 7,4) 50 mM, NaCl 150 mM, Triton-X 100 0,1%, SDS 20 mM, coquetel inibidor de

proteases 1% e N-etilmaleimida (NEM, nº de catálogo: E3876 Sigma-Aldrich) 20 mM, para inibir as SENPs e prevenir deSUMOilação), seguido de homogeneização. As amostras foram centrifugadas (10.000 g, 10 min, 4°C), uma alíquota foi retirada para dosagem de proteína pelo método de *Bradford* (segundo as instruções do fabricante) e no restante da amostra foi adicionado tampão azul 1X (azul de bromofenol, Tris (pH 6,8) 100 mM, glicerol 20%, EDTA 4 mM, SDS 8% e  $\beta$ -mercaptoetanol 8%), uma vez no tampão azul as amostras foram mantidas a -20°C (SILVA, 2018).

### 3.7 Western Blotting

Após a dosagem de proteínas as amostras obtidas foram pipetadas na concentração de 80 $\mu$ g e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 12% para o gel de separação e 5% para o gel de entrada. A eletroforese foi realizada com corrente entre 90 e 130 volts durante aproximadamente 2 h. Após o termino da corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência por 1 h e 30 min, onde as proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de PVDF (*Amersham Hybond GE*, nº de catálogo: 10600023, 0,45  $\mu$ m). Após, as membranas foram bloqueadas por 1 h com leite desnatado ou em albumina de soro bovino (BSA) 5% diluído em *Tris-buffered saline tween20* (TBS-T). Em seguida foram lavadas com TBS-T por três vezes de 5 min (SILVA, 2018).

As membranas foram coradas com uma solução de *Ponceau S* 0,1% em 5% de ácido acético (Sigma-Aldrich, nº de catálogo: P7170) e posteriormente incubadas com os anticorpos contra SUMO1 (1:1000), SUMO2/3 (1:1000), GAPDH (1:10000), beta-tubulina (1:5000) *overnight* sob agitação a 4°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário específico *anti-rabbit* ou *anti-mouse* (1:5000) em temperatura ambiente sob agitação. Após três lavagens em TBS-T por 5 min, foram reveladas no equipamento Chemidoc® Biorad (LAMEB- UFSC), sempre com a adição de revelador quimioluminescente (ECL) na membrana (Kit ECL ThermoScientific, nº de catálogo: 34096). As bandas obtidas foram analisadas pelo *software* ImageLab e os valores obtidos de densidade óptica foram divididos por um dos controles de carregamento respectivos de cada membrana: *Ponceau* (ROMERO-CALVO, et al, 2010), GAPDH (WU et al., 2012) ou beta-tubulina (LI; SHEN, 2013) (uma tabela com os respectivos fabricantes dos anticorpos encontra-se no Anexo A).

### 3.8 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a um teste de normalidade, *Kolmogorov-Smirnov*, e testados para a presença de *outliers* no QuickCalcs disponível em <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>. Uma vez confirmado que os dados apresentavam uma distribuição normal foi realizado teste T não pareado para os dados referentes aos comportamentos e *Western blotting*. Foi escolhido o teste T uma vez que foram realizados experimentos independentes, dessa forma os comportamentos são avaliados dentro do seu respectivo grupo experimental (controle e guanosina).

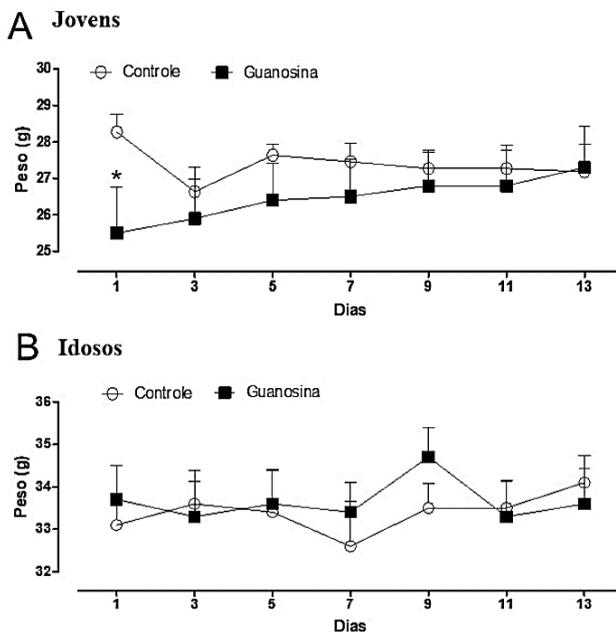
Existe uma diferença no número de animais em cada um dos testes, essas diferenças são atribuídas em parte ao fato de que todos os comportamentos foram filmados e as análises foram realizadas a posterior. O motivo pelo qual existe uma variação no número de animais em cada teste é porque houve problemas com as câmeras da sala de experimentação (vídeos cortados), ou com o *software Anymaze* (ex. não localizar o animal no aparato corretamente), ou ainda por se tratar de um *outlier* significativo, do contrário, todos os animais foram incluídos nos dados aqui apresentados. Foram excluídos do experimento 3 animais que apresentavam malformações físicas.

Os resultados estão apresentados como média + erro padrão da média, ou como média  $\pm$  erro padrão da média, conforme indicado em cada gráfico. A diferença estatística com relação ao grupo controle foi indicada com asteriscos, onde \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ . O símbolo  $\text{¥}$  foi utilizado quando  $p \leq 0,05$  em comparações a um valor hipotético de 50%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Statistica (versão 7, Statsoft, EUA) ou Prisma 5.0 (GraphPad Prism, EUA), e os gráficos confeccionados no programa Prisma 5.0.

## 4 RESULTADOS

Por se tratar de um protocolo de administração de guanosina por 14 dias, o peso dos animais foi avaliado ao longo dos dias de tratamento (com pesagem realizada nos dias ímpares). Como pode-se observar na Figura 7, o peso dos animais jovens do grupo controle  $28,27 \pm 0,48$  g diferiu significativamente no 1º dia, no início das administrações comparado com o peso dos animais jovens do grupo guanosina,  $25,5 \pm 1,25$  g (teste T,  $p=0,0465$ ;  $t=2.130$   $df=19$ ). No 7º dia, um dia antes do início dos testes comportamentais ambos os grupos já apresentaram um peso sem diferenças significativas (teste T,  $p=0,4054$ ;  $t=0.8510$   $df= 19$ ).

**Figura 7:** Peso dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos ao longo do período de tratamento com guanosina.



**A.** Peso dos camundongos C57BL/6 jovens controle ( $n=11$ ) e tratados com guanosina ( $n=10$ ) e **B.** Peso dos camundongos C57BL/6 idosos controle ( $n=10$ ) e tratados com guanosina ( $n=10$ ).

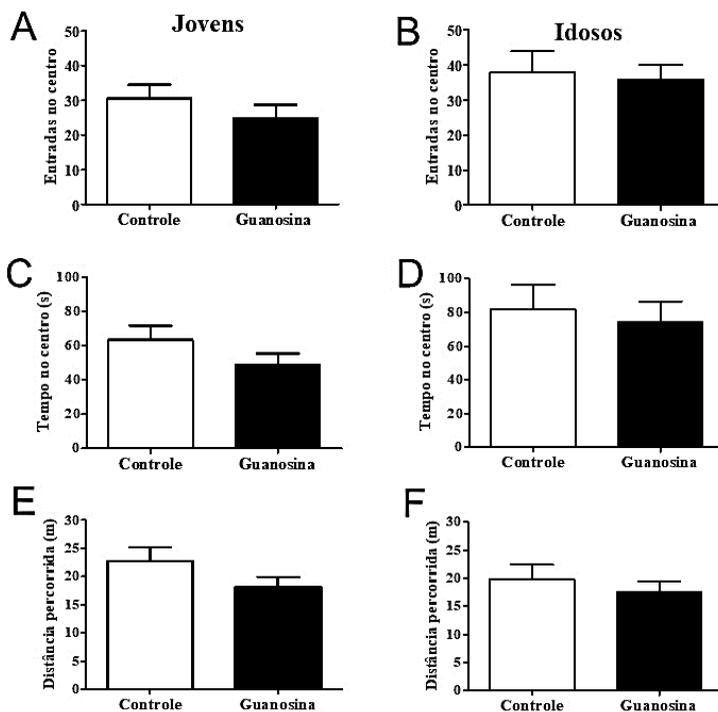
Com relação ao peso dos animais idosos no 1º dia não houve diferenças significativas (teste T,  $p=0,5624$ ;  $t=0.5902$   $df=18$ ) entre os

grupos controle ( $33,10 \pm 0,62$  g) e guanosina ( $33,70 \pm 2,54$  g), nem no 7º dia (teste T,  $p=0,5362$ ;  $t=0,6307$   $df=18$ ). Com relação aos outros dias, não foram observadas diferenças no peso dos animais controle comparado com os animais tratados com guanosina nem para os animais jovens nem para os animais idosos.

#### 4.1 Comportamentos

Os animais foram tratados com guanosina por 14 dias, e as avaliações comportamentais começaram no 8º dia após o início do tratamento. A primeira avaliação realizada foi no campo aberto. Com relação à atividade locomotora dos animais o tratamento com guanosina não alterou os parâmetros de número de entradas no centro, tempo de permanência no centro do aparato e nem a distância percorrida (Figura 8).

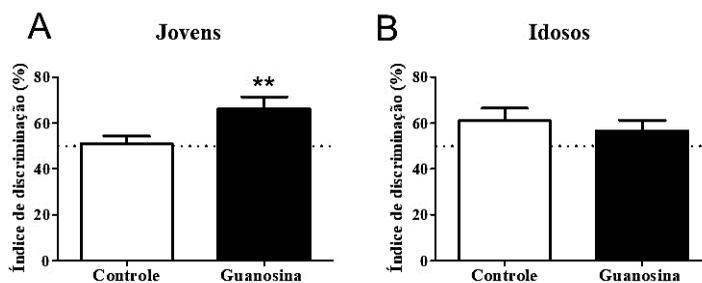
**Figura 8:** Efeito da guanosina na atividade locomotora dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos no teste de campo aberto.



Número de entradas no centro do campo aberto para **A.** camundongos C57BL/6 jovens controle (n=9) e tratados com guanosina (n=9) e **B.** para camundongos C57BL/6 idosos controle (n=8) e tratados com guanosina (n=9). Tempo despendido no centro do campo aberto expresso em segundos (s) para **C.** camundongos C57BL/6 jovens controle (n=8) e tratados com guanosina (n=8) e **D.** camundongos C57BL/6 idosos controle (n=8) e tratados com guanosina (n=9). Distância percorrida no aparato expresso em metros (m) para **E.** camundongos C57BL/6 jovens controle (n=9) e tratados com guanosina (n=9) e **F.** camundongos C57BL/6 idosos controle (n=8) e tratados com guanosina (n=9). Resultados expressos como média + erro padrão. A análise estatística teste T não detectou diferença entre os tratamentos. n: número de animais.

Após 24 h da exposição ao campo aberto os animais foram reexpostos ao mesmo aparato do campo aberto, porém, com a adição de dois objetos. Nesse teste foi avaliada a memória espacial de curto prazo, uma vez que os objetos são realocados na sessão teste. Pode-se observar na Figura 9 o índice de discriminação obtido tanto para os animais jovens quanto para os animais idosos. A guanosina aumentou significativamente o índice de discriminação dos animais jovens (teste T,  $p=0,01$ ;  $t=2.584$   $df=19$ ) e esse efeito não foi observado nos animais idosos (teste T,  $p=0,54$ ;  $t=0.6233$   $df=17$ ).

**Figura 9:** Efeito da guanosina na memória espacial de curto prazo dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliada no teste de realocação de objetos.

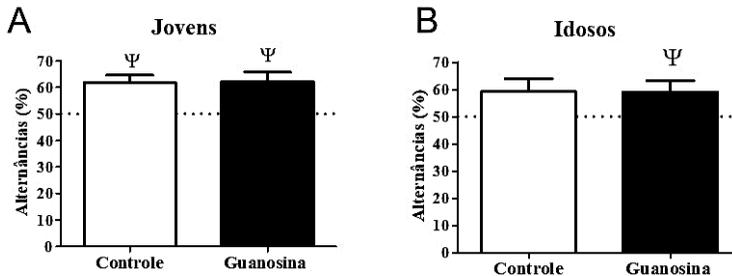


Índice de discriminação para **A.** camundongos C57BL/6 jovens controle (n=10) e tratados com guanosina (n=11) e **B.** camundongos C57BL/6 idosos controle (n=10) e tratados com guanosina (n=9). Resultados expressos como média + erro padrão. A análise estatística teste T. \*\*  $p \leq 0,01$  com relação ao grupo controle. n: número de animais.

A memória espacial de trabalho dos animais foi avaliada no 9º dia, nesse teste os animais podem explorar livremente os três braços do labirinto e são contabilizadas as alternâncias corretas. Pode-se observar na Figura 10A que os animais jovens de ambos os grupos controle (teste T para uma amostra,  $p=0,0020$ ;  $t=4.153$   $df=10$ ) e guanosina (teste T para uma amostra,  $p=0,0118$ ;  $t=3.148$   $df=9$ ) foram capazes de explorar o labirinto de forma esperada, ou seja, ao sair de um braço não retornam ao mesmo, uma vez que ambos os grupos apresentam diferenças significativas comparados com 50% (valor médio esperado de exploração quando há reconhecimento adequado do aparato).

Pode-se observar na Figura 10B que os animais idosos tratados com guanosina conseguem explorar o labirinto de forma adequada, apresentando diferença significativa com relação ao valor hipotético de 50% (teste T para uma amostra,  $p=0,0563$ ;  $t=2.189$   $df=9$ ), diferente do grupo controle que não apresenta diferença com o valor hipotético de 50% (teste T para uma amostra,  $p=0,0802$ ;  $t=1.971$   $df=9$ ).

**Figura 10:** Efeito da guanosina na memória de trabalho dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliada no labirinto em Y.

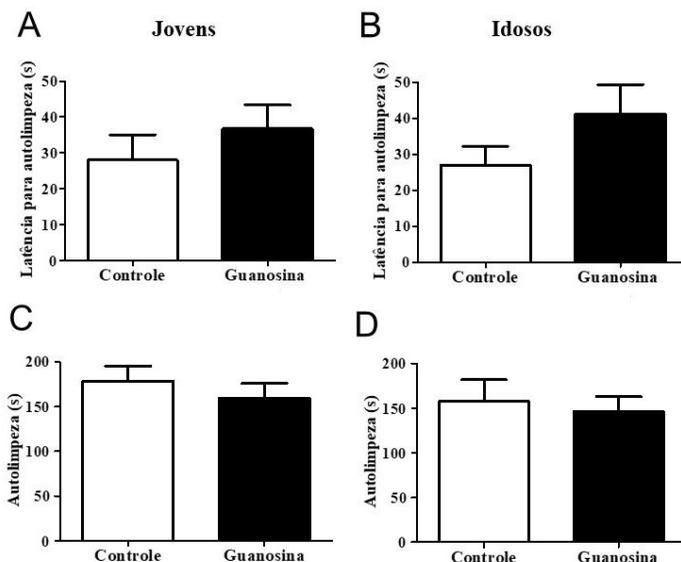


Percentagem de alternâncias corretas para **A.** camundongos C57BL/6 jovens controle ( $n=11$ ) e tratados com guanosina ( $n=10$ ) e **B.** camundongos C57BL/6 idosos controle ( $n=10$ ) e tratados com guanosina ( $n=10$ ). Resultados expressos como média + erro padrão. A análise estatística teste T para uma amostra.  $\forall p \leq 0,05$  com relação ao valor hipotético de 50% linha pontilhada.  $n$ : número de animais.

Com relação ao teste de borrifada da sacarose, não houve diferenças na latência para a primeira autolimpeza nos animais jovens (Figura 11A, teste T,  $p=0,3878$ ;  $t=0.8936$   $df=13$ ) nem para os animais idosos (Figura 11B, teste T,  $p=0,1497$ ;  $t=1.509$   $df=17$ ). Quanto ao tempo total de autolimpeza, não foram observadas diferenças entre os grupos

nos animais jovens (Figura 11C, teste T,  $p=0,4355$ ;  $t=0.8047$   $df=13$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos nos animais idosos (Figura 11D, teste T,  $p=0,7192$ ;  $t=0.3652$   $df=18$ ).

**Figura 11:** Efeito da guanosina no comportamento de autolimpeza dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliado no teste de borrifada de sacarose.

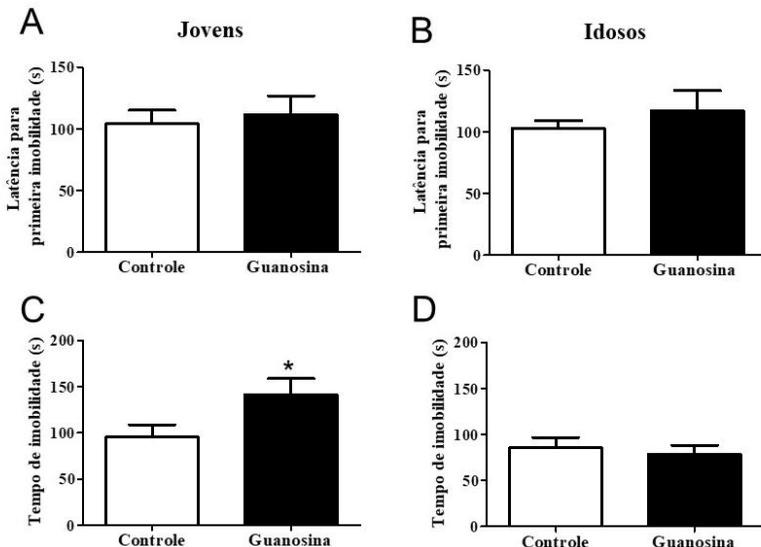


Latência para a primeira autolimpeza expressa em segundos (s) para **A.** camundongos C57BL/6 jovens controle ( $n=8$ ) e tratados com guanosina ( $n=7$ ) e **B.** camundongos C57BL/6 idosos controle ( $n=10$ ) e tratados com guanosina ( $n=9$ ). Tempo total de autolimpeza para **C.** camundongos C57BL/6 jovens controle ( $n=8$ ) e tratados com guanosina ( $n=7$ ) em **D.** camundongos C57BL/6 idosos controle ( $n=10$ ) e tratados com guanosina ( $n=9$ ). Resultados expressos como média + erro padrão. A análise estatística teste T não detectou diferença entre os tratamentos. n: número de animais.

Com relação ao tempo de imobilidade dos animais, avaliado no teste de suspensão pela cauda, pode-se observar na Figura 12A que não houve diferença entre os tratamentos na latência para a primeira imobilidade nos animais jovens (teste T,  $p=0,6892$ ;  $t=0.4069$   $df=17$ ), nem nos animais idosos (teste T,  $p=0,4005$ ;  $t=0.8624$   $df=17$ ). Entretanto, houve um aumento significativo no tempo de imobilidade total dos animais jovens tratados com guanosina (teste T,  $p=0,0477$ ;  $t=2.134$

df=17), sendo que tal efeito não foi observado nos camundongos idosos (teste T,  $p=0,6892$ ;  $t=0.4069$  df=17).

**Figura 12:** Efeito da guanosina no comportamento de imobilidade dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliado no teste de suspensão pela cauda.

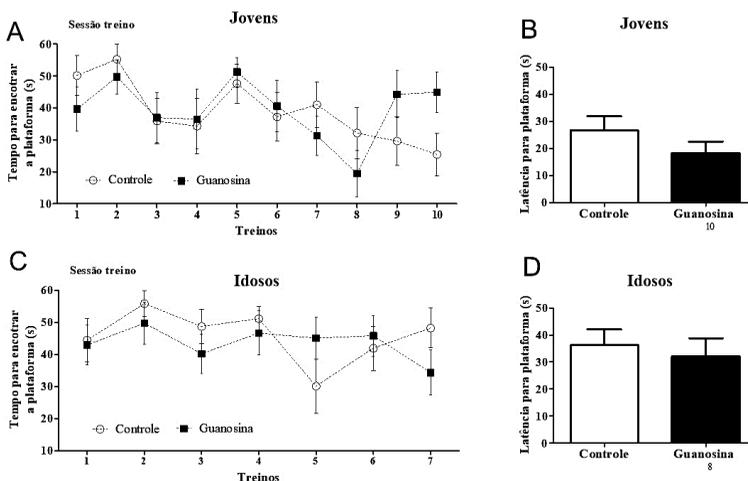


Latência para primeira imobilidade expressa em segundos (s) para **A.** camundongos C57BL/6 jovens controle (n=10) e tratados com guanosina (n=9) e **B.** camundongos C57BL/6 idosos controle (n=10) e tratados com guanosina (n=9). Tempo total de imobilidade para **C.** camundongos C57BL/6 jovens controle (n=10) e tratados com guanosina (n=9) e **D.** camundongos C57BL/6 idosos controle (n=10) e tratados com guanosina (n=9). Resultados expressos como média + erro padrão. A análise estatística teste T onde \*  $p \leq 0,05$ . n: número de animais.

A memória espacial de longo prazo foi avaliada no MWM. Na Figura 13A pode-se observar a curva de aprendizado dos animais jovens tratados com guanosina ao longo dos 10 *trials* no dia de treino. Na Figura 13B pode-se observar a latência para encontrar a plataforma no dia de teste: o grupo controle levou 26 s para encontrar a plataforma e o grupo guanosina 18 s, porém esse efeito não foi significativo (teste T,  $p=0,2260$ ;  $t=1.254$  df=18). Na Figura 13C pode-se observar o tempo que os animais idosos levaram para encontrar a plataforma na sessão de

treino. Foram realizados apenas 7 treinos uma vez que os animais não conseguiram nadar por 10 treinos como os animais jovens. Na Figura 13D pode ser observada a latência para plataforma na sessão teste e não houve diferença entre os tratamentos uma vez que o grupo controle levou 36 s e o grupo guanosina 32 s para encontrar o local onde estava a plataforma no dia do teste (teste T,  $p=0,6467$ ;  $t=0.4671$   $df=16$ ).

**Figura 13:** Efeito da guanosina na memória espacial de longa duração dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliada no labirinto aquático de Morris.



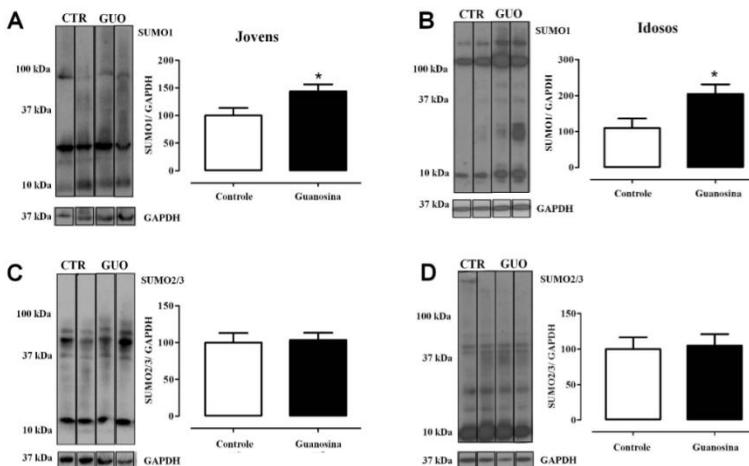
Latência para encontrar a plataforma na sessão treino expressa em segundos (s) para **A.** camundongos C57BL/6 jovens controle ( $n=10$ ) e tratados com guanosina ( $n=10$ ) e **C.** camundongos C57BL/6 idosos controle ( $n=10$ ) e tratados com guanosina ( $n=8$ ), resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Latência para encontrar a plataforma na sessão teste expressa em segundos para **B.** camundongos C57BL/6 jovens controle ( $n=10$ ) e tratados com guanosina ( $n=9$ ) e **D.** camundongos C57BL/6 idosos controle ( $n=8$ ) e tratados com guanosina ( $n=10$ ), resultados expressos como média + erro padrão. A análise estatística teste T não detectou diferença entre os grupos. n: número de animais.

#### 4.2 SUMOilação global de proteínas no hipocampo e córtex pré-frontal

No 14º dia de tratamento com a guanosina, após o teste no MWM, os animais foram eutanasiados e o hipocampo e o córtex pré-frontal foram utilizados para as análises dos níveis de SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas nos camundongos jovens e idosos.

Pode-se observar na Figura 14A que o tratamento com guanosina aumentou significativamente a SUMO1-ilação global de proteínas no hipocampo dos animais jovens (variâncias não seguiram distribuição normal, teste não paramétrico de Mann Whitney,  $p=0,0464$ ;  $U=15$ ). O mesmo efeito pôde ser observado no hipocampo dos animais idosos na Figura 14B (teste T,  $p=0,0306$ ;  $t= 2.517$   $df=10$ ). Entretanto, a SUMO2/3-ilação global de proteínas no hipocampo não foi alterada pelo tratamento com a guanosina nos animais jovens nem nos animais idosos (Figura 14 C e D respectivamente, (jovens: teste T,  $p=0,8443$ ;  $t=0.2003$   $df=13$  idosos teste T,  $p=0,8301$ ;  $t=0.2177$   $df=18$ ).

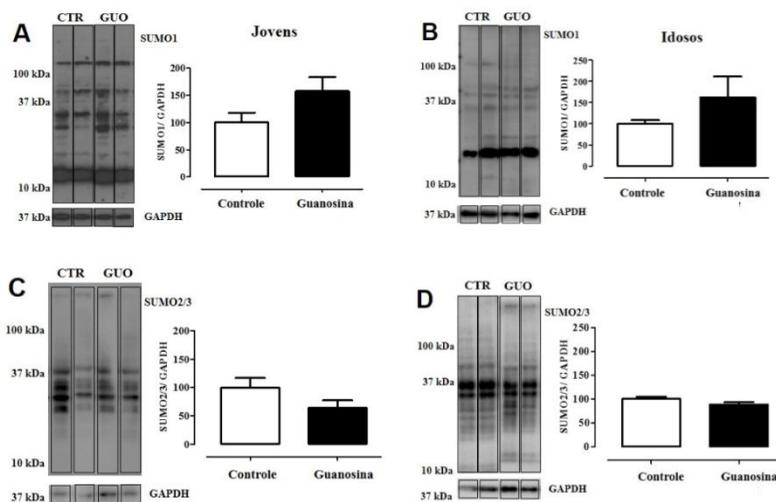
**Figura 14:** Efeito da guanosina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas no hipocampo de camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliado por *Western blotting*.



*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de **A.** SUMO1-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH no hipocampo dos animais jovens controle ( $n=9$ ) e tratados com guanosina ( $n=8$ ). **B.** SUMO1-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH no hipocampo dos animais idosos controle ( $n=6$ ) e tratados com guanosina ( $n=6$ ). **C.** SUMO2/3-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH no hipocampo dos animais jovens controle ( $n=8$ ) e tratados com guanosina ( $n=7$ ). **D.** SUMO2/3-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH no hipocampo dos animais idosos controle ( $n=10$ ) e tratados com guanosina ( $n=10$ ). Análise estatística Mann Whitney em **A.** e Teste T em **B.** \*  $p\leq 0,05$ . **C.** e **D.** Teste T não detectou diferença. CTR: Controle; GUO: Guanosina (8 mg/kg i.p.). n: número de animais.

O tratamento com guanosina não aumentou a SUMO1-ilação global de proteínas no córtex pré-frontal dos animais jovens (Figura 15A, teste T,  $p=0,0854$ ;  $t=1.842$   $df=15$ ), nem dos animais idosos (Figura 15B, teste T,  $p=0,2113$ ;  $t=1.315$   $df=13$ ). De forma semelhante, a SUMO2/3-ilação global de proteínas no córtex pré-frontal também não foi alterada pelo tratamento com a guanosina nos animais jovens (Figura 15C, teste T,  $p=0,1162$ ;  $t=1.705$   $df=11$ ), nem nos animais idosos (Figura 15D, teste T,  $p=0,1434$ ;  $t=1.622$   $df=8$ ).

**Figura 15:** Efeito da guanosina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas no córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 jovens e idosos avaliado por *Western blotting*.



*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de **A.** SUMO1-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH no hipocampo dos animais jovens controle ( $n=9$ ) e tratados com guanosina ( $n=8$ ). **B.** SUMO1-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH no hipocampo dos animais idosos controle ( $n=8$ ) e tratados com guanosina ( $n=7$ ). **C.** SUMO2/3-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH no hipocampo dos animais jovens controle ( $n=6$ ) e tratados com guanosina ( $n=7$ ). **D.** SUMO2/3-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH no hipocampo dos animais idosos controle ( $n=5$ ) e tratados com guanosina ( $n=5$ ). Análise estatística Teste T  $*p \leq 0,05$ . CTR: Controle; GUO: Guanosina (8 mg/kg i.p.). n: número de animais.

## 5 DISCUSSÃO

Já foram descritos na literatura diferentes efeitos protetores para a guanosina *in vivo*. Em diversos modelos para DA, DP, isquemia cerebral, encefalopatia hepática, sepse, efeitos na ansiedade e depressão, esquizofrenia, crises epiléticas e ainda efeitos neurogênicos (para revisão ver SCHIMIDT; LARA e SOUZA, 2007; LANZMASTER et al., 2016a). Para explicar seus efeitos em nível de SNC quando administrada sistemicamente, já foi demonstrado que a guanosina atravessa a barreira hemato-encefálica após uma administração i.p., sendo necessários 15 min para que ela atinja o cérebro (GIULIANI et al., 2012a).

O peso dos animais foi acompanhado ao longo de todo o experimento e a guanosina não foi capaz de alterar esse parâmetro ao longo do tratamento. A diferença de peso observada no primeiro dia, pode ser atribuída ao fato de os animais terem sido escolhidos randomicamente uma vez que os animais ainda não haviam sido tratados. Pode-se observar que os animais idosos apresentaram um peso maior do que o peso basal observado para os camundongos jovens. Esta característica já foi observada na literatura, onde camundongos C57BL/6 idosos (18 meses) apresentaram um peso significativamente maior que o peso de camundongos jovens (3 meses) e essa é uma alteração relacionada com o envelhecimento (BARRETO, HUANG, GIFFARD, 2010).

No teste de campo aberto, a guanosina não alterou a atividade locomotora dos animais, achado este que corrobora com Lanzmaster e colaboradores (2017). Na literatura outros testes que avaliam atividade locomotora, como o teste de rotarod, já demonstraram diferenças na locomoção relacionada com a idade em camundongos C57BL/6 (BARRETO, HUANG, GIFFARD, 2010).

O papel do hipocampo na formação de memórias vem sendo elegantemente demonstrado na literatura desde a década de 50, onde uma cirurgia realizada para tratar a epilepsia de um paciente removeu parte do lobo temporal, o que acarretou em amnésia severa (SCOVILLE; MILNER, 1957). Desde então estudos em modelos animais vêm explorando e demonstrando a importância dessa estrutura para a formação de memórias (para revisão ver SQUIRE, 1992; BIRD; BURGESS, 2008; LESZCZYNSKI, 2011)

No presente trabalho foi observado que o tratamento com a guanosina promoveu *per se* uma melhora na memória espacial de curta duração no teste de realocação de objetos nos camundongos jovens e uma melhora na memória espacial de trabalho avaliada pelo labirinto em

Y nos camundongos idosos. Nessas tarefas o hipocampo é uma estrutura chave responsável pela formação de memórias espaciais (ROSSATO et al., 2007; ASSINI; DUZZIONI; TAKAHASHI, 2009).

De maneira interessante, concomitantemente com a melhora comportamental foi observado nesses animais um aumento na SUMO1-ilação global de proteínas no hipocampo dos camundongos C57BL/6 jovens e idosos tratados com guanosina 8 mg/kg por 14 dias. A literatura traz muitos dados que mostram que a SUMOilação está envolvida com diferentes características da memória e plasticidade sináptica, porém, ainda não existe resposta para perguntas do tipo: qual é o papel exato da SUMOilação na expressão de uma resposta comportamental? Até mesmo por se tratar de uma MPT ela pode estar alterando a localização, solubilidade e destino de uma série de proteínas dentro da célula. Uma vez que todo comportamento expresso por um animal requer um orquestramento do cérebro entre uma liberação adequada de neurotransmissores, ativação de segundos mensageiros, efetores moleculares e uma comunicação adequada entre diferentes estruturas cerebrais, muitos estudos ainda são necessários para que se possa entender de que forma e por quais vias esse aumento na SUMO1-ilação global de proteínas possa estar relacionado com a melhora cognitiva.

Yoo e colaboradores (2017) administraram em camundongos C57BL/6 jovens (7 semanas) SUMO1 purificada e viram um efeito oposto aos nossos achados. Na tarefa de reconhecimento de objetos, a administração i.p. de SUMO1 (4 mg/kg por 3 semanas) significativamente diminuiu a investigação do objeto novo. Ainda nesses mesmos animais houve uma redução na proliferação de células no giro dentado do hipocampo. Apesar de os autores terem administrado SUMO1, nesse mesmo artigo eles não mostraram os níveis de SUMO1-ilação, nem os níveis de SUMO1 livre por *Western blotting* em nenhuma estrutura cerebral.

Stankova e colaboradores (2018) observaram em camundongos, o perfil de SUMO1-ilação com relação ao envelhecimento. Os autores observaram que a SUMO1-ilação estava aumentada no hipocampo e no córtex em camundongos selvagens de 4 meses comparado com animais de 2, 3, 6 e 9 meses de idade. Entretanto em camundongos transgênicos da DA, 5XFAD (expressam 5 mutações da proteína precursora amiloide e Presenilina1), nenhuma alteração nos níveis de SUMO1-ilação foi observada nessas idades. Por outro lado, camundongos Tg 2576 aos 6 meses de idade mostraram um aumento de SUMO1-ilação que retorna aos níveis do controle aos 20 meses. Achados prévios demonstraram que

o aumento da SUMOilação na pré-sinapse pode interferir com a liberação de glutamato (FELIGIONI; NISHIMUNE; HENLEY, 2009).

Foi observado um aumento de SUMO1 no hipocampo dos animais idosos, porém, no teste de realocação de objetos não foi observado um efeito da guanosina na melhora da memória espacial de curta duração desses animais. Considerando as alterações que são dependentes da idade, provavelmente o tratamento de 14 dias com guanosina não foi suficiente para promover melhora cognitiva nesse tipo de memória. Inclusive, isso pode estar ligado com o fato de que muitas proteínas mudam seus níveis de expressão em função do envelhecimento, ou seja, mesmo havendo aumento da SUMOilação global, algumas proteínas importantes podem não estar mais presentes no cérebro para serem moduladas pela SUMOilação. Nesse sentido, talvez um tratamento mais prolongado pudesse promover tal efeito. Entretanto um efeito foi observado na memória de trabalho avaliada no labirinto em Y, onde os animais idosos que receberam guanosina foram capazes de atingir uma percentagem de alternâncias corretas comparado com os animais idosos do grupo controle.

Já foi observado na literatura que os níveis do RNA mensageiro de SUMO1 e da UBC9 em C57BL/6 encontram-se diminuídos significativamente aos 15 meses de idade comparado com 3 meses de idade (AKAR; FEINSTEIN, 2009). Nesse contexto a guanosina poderia ser utilizada como ferramenta farmacológica para restaurar os níveis de SUMOilação que caem com a idade.

Na literatura já foi demonstrado que a guanosina tem propriedades anticonvulsivantes e ansiolíticas (VINADÉ et al., 2003). Por esse motivo a guanosina poderia promover efeitos amnésicos observados em tarefas que relacionam a formação de memórias aversivas. Esse efeito amnésico foi observado após administração pré-treino (7,5 mg/kg i.p.) em ratos, na tarefa de esQUIVA inibitória. Esse efeito não permaneceu após uma semana uma vez que os mesmos animais mostraram capacidade de aprendizado normal uma semana depois. Os autores sugerem que esse efeito agudo tenha relação com a capacidade da guanosina em modular o sistema glutamatérgico (ROESLER et al., 2000, VINADÉ et al., 2004; VINADÉ et al., 2005).

Com relação a esses achados da literatura e aos nossos achados comportamentais, fica limitada uma discussão por se tratarem de espécies diferentes, tipos de memórias diferentes, que envolvem estruturas cerebrais distintas, e ainda uma dose de guanosina diferente. Entretanto, cabe citar que para linhagem C57BL/6 utilizada no presente estudo, já foram demonstradas uma maior capacidade de proliferação

celular no hipocampo, sendo uma espécie utilizada por muitos autores para o estudo da neurogênese hipocampal (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1997). Considerando que a guanosina pode influenciar processos de neurogênese no hipocampo (BETTIO et al., 2016; SANTOS, 2017; e trabalhos não publicados do nosso grupo), o fato de termos utilizado esses animais pode explicar o efeito observado na memória de curta duração hipocampo-dependente.

Apesar de a literatura sugerir um efeito amnésico, o tratamento com a guanosina por 14 dias nos nossos animais pode ter promovido uma plasticidade sináptica em termos de adaptações nas cascatas de sinalização que a guanosina pode atuar, mostrando dessa forma que nessas condições experimentais o efeito amnésico não foi observado. O presente trabalho não é o pioneiro em mostrar que a guanosina pode de fato não ser amnésica, uma vez que Lanznaster e colaboradores (2017), também não observaram déficits cognitivos com administração crônica de guanosina na mesma dose.

É importante ressaltar também que como são realizados mais de um teste comportamental com os mesmos animais e em dias subsequentes, o efeito observado no 8º dia pode ser diferente do efeito observado no 14º dia. Uma vez que no 14º dia os animais receberam mais administrações de guanosina e também eles passaram pelos testes prévios, o que modifica a experiência prévia do animal bem como sua resposta comportamental ao teste seguinte.

Muito ainda precisa ser entendido com relação aos mecanismos de ação da guanosina, mas o que se sabe até o presente momento é que o sistema purinérgico pode ter implicações no comportamento. Já foi observado que após 60 min de uma sessão teste no campo aberto, ocorre um aumento de 5'-ectonucleotidases no hipocampo, por essa enzima clivar tanto AMP quanto GMP espera-se um aumento nos níveis de adenosina e guanosina (PEDRAZZA et al., 2007).

Após administrada pela via i.p. a guanosina é rapidamente convertida a guanina devido a presença da enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP), solúvel no plasma. Estudos já observaram que a guanina consegue prevenir os déficits de memória causados pelo composto (N-omega nitro-L-arginina metil éster) L-NAME, inibidor não-seletivo das óxido nítrico sintases (GIULIANI et al., 2012a; GIULIANI et al., 2012b; ZUCCARINI et al., 2018).

No presente trabalho, os camundongos jovens e idosos receberam a administração de guanosina no período da manhã e os testes comportamentais foram realizados no período da tarde, ou seja, os animais foram testados 6 h após a administração de guanosina. Desta

forma, é possível que os efeitos observados de melhora na memória sejam consequências da guanina, nesse caso estudos que inibam a enzima conversora de guanosina a guanina precisariam ser realizados para confirmar essa possibilidade.

Com relação ao teste de borrifada de sacarose, não foram observadas diferenças no tratamento com a guanosina nos animais jovens nem nos animais idosos. Os camundongos jovens C57BL/6 apresentaram uma resposta a esse teste similar ao observado em camundongos *Swiss* onde a guanosina *per se* não alterou o comportamento de autolimpeza (LANZMASTER et al., 2017).

No teste de suspensão pela cauda, a guanosina *per se* aumentou o tempo de imobilidade total nos animais jovens, fato esse que não foi observado nos animais idosos. Em camundongos *Swiss* tratados com guanosina na mesma dose e que passaram por esse teste comportamental não foram observadas diferenças no tempo total de imobilidade com o tratamento com a guanosina (LANZMASTER et al., 2017). O resultado obtido de aumento no tempo de imobilidade dos animais após a administração com a guanosina é o contrário do demonstrado na literatura onde a guanosina apresentou efeito tipo antidepressivo em camundongos *Swiss* tratados com a concentração de 5 mg/kg/dia, via oral por 21 dias (BETTIO et al., 2016). No único trabalho, ainda não publicado, encontrado na literatura que utilizou guanosina em camundongos C57BL/6, o autor observou que ao tratar os animais por 25 dias a guanosina diminui o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (SANTOS, 2017) um achado diferente do presente trabalho.

Existem diferentes vertentes na literatura que explicam quais as interpretações cabíveis para a postura de imobilidade. Por um lado, a imobilidade pode ser interpretada como “desamparo comportamental” onde o animal perderia a “esperança” de escapar, por outro lado alguns pesquisadores interpretam a imobilidade como uma estratégia comportamental, denominada *coping strategy*, ou seja, em uma visão evolutiva, esse comportamento teria uma função de adaptação à situação estressante (THIERRY et al., 1984; CRYAN; MOMBÉREAU, 2004).

O teste de suspensão pela cauda é um dos testes mais utilizados na literatura para *screening* de drogas antidepressivas, uma vez que todos os fármacos antidepressivos utilizados na clínica em humanos, conseguem de forma eficaz alterar o comportamento de imobilidade nos animais, reduzindo-o. Baseado nisso, alguns autores discutem o que de fato significa essa redução na imobilidade observada com administração aguda de fármacos antidepressivos. Pois, esses mesmos fármacos em

humanos precisam de 4 semanas para promover melhora dos sintomas relacionados à depressão (para revisão ver CRYAN; MOMBÉREAU, 2004; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; KRISHNAN; NESTLER, 2011; GALTS et al., 2019). Com base nisso, é interessante discutir que a guanosina promoveu redução no tempo de imobilidade em tempos prolongados de administração (BETIO et al., 2006; SANTOS, 2017), mas que em tempos menores de administração ela aumentou o tempo de imobilidade o que no início de um tratamento poderia representar uma estratégia evolutiva adequada como exemplificado no parágrafo anterior.

Portanto, como pode ser observado na tabela 2, foi observado nesse trabalho que o tratamento com guanosina por 14 dias não alterou o peso dos animais jovens nem idosos. Não houve alterações nos parâmetros locomotores no teste de campo aberto para ambas as idades. O tratamento com guanosina promoveu uma melhora na memória espacial de curta duração no teste de realocação de objetos nos animais jovens, porém, não alterou a memória nos animais idosos nesse teste. A guanosina não alterou a memória espacial de trabalho dos animais jovens, mas promoveu uma melhora desse tipo de memória nos animais idosos, no teste de labirinto em Y. Com relação ao teste de borrifada de sacarose não foram observadas diferenças com o tratamento de guanosina nem nos animais jovens nem nos animais idosos. No teste de suspensão pela cauda foi observado um aumento na imobilidade dos animais jovens tratados com guanosina, esse efeito não foi observado nos animais idosos. No MWM não foi observada diferença com o tratamento com guanosina nos animais jovens nem nos animais idosos. Com relação ao perfil de SUMOilação foi observado que o tratamento com guanosina foi capaz de aumentar SUMO1-ilação global de proteínas no hipocampo tanto dos animais jovens quanto dos animais idosos.

**Tabela 2:** Resumo dos efeitos do tratamento com guanosina (8mg/kg i.p.) nos diferentes testes comportamentais nos camundongos C57BL/6 jovens e idosos.

Teste comportamental \ Idade	Jovens (3 meses)	Idosos (24 meses)
<b>Peso dos animais</b>	NA	NA
<b>Campo aberto</b>	NA	NA
<b>Realocação de objetos</b>	Aumento no índice de discriminação	NA
<b>Labirinto em Y</b>	NA	Aumento nas alternâncias corretas
<b>Borrifada de sacarose</b>	NA	NA
<b>Teste de suspensão pela cauda</b>	Aumento na imobilidade total	NA
<b>Labirinto aquático de Morris</b>	NA	NA

NA: Nenhuma alteração. Fonte: o autor.

## **Capítulo II - Caracterização dos efeitos da guanosina como possível modulador da SUMOilação em astrócitos e neurônios corticais, investigação do mecanismo de ação via receptores de adenosina e efeito glioprotetor da guanosina sobre a toxicidade do peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>**

---

Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Neuroquímica 4, no Departamento de Bioquímica da UFSC, coordenado pela professora Dr<sup>a</sup>. Carla Tasca, no Laboratório de Investigação Neuroquímica, coordenado pela professora Dr<sup>a</sup>. Helena Cimarosti, e no laboratório coordenado pelo professor Dr. Jeremy Henley na *School of Biochemistry, Centre for Synaptic Plasticity*, Universidade de Bristol, Reino Unido (doutorado sanduíche financiado pelos programas PDSE-CAPE e Newton Fund).

### **1 INTRODUÇÃO**

Como foi descrito na introdução do capítulo I desta tese, inúmeros são os efeitos protetores promovidos pela guanosina. Esses efeitos já foram atribuídos à ativação de diferentes vias intracelulares e também à ativação dos receptores de adenosina, uma vez que o uso de antagonistas do receptores de adenosina previne o efeito protetor da guanosina. Também já foi observado que a guanosina pode modular a atividade dos canais de K<sup>+</sup> dependente de Ca<sup>2+</sup> de alta condutância (BK) (OLESKOVICZ et al., 2008; DAL-CIM et al., 2011; TASCA et al., 2010; POLUCENO, 2019).

Ao se revisar a literatura trabalhos que expliquem os efeitos da guanosina via um receptor próprio são mais escassos. Nesse contexto, a guanosina ainda é considerada uma molécula órfã de receptor (DI LIBERTO et al., 2016). Apenas um estudo sugere que a guanosina e seu derivado 6-tioguanosina podem interagir com um receptor acoplado a proteína G diferente dos receptores da adenosina (VOLPINI et al., 2011). Os receptores acoplados a proteínas G exercem uma gama de efeitos biológicos na transdução de sinal, sendo excelentes alvos de estudo uma vez que a maioria dos fármacos age via esses receptores e muitos outros receptores ainda podem ser descobertos (HILL, 2006).

Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa sugerem que a guanosina deslocaria a união de adenosina aos seus receptores. Nesse cenário, sabe-se que alguns dos efeitos protetores da guanosina são reduzidos com o uso de antagonistas dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> (DAL-CIM et al., 2012; ALMEIDA et al., 2017; GERBATIN et al., 2019). No contexto celular, a guanosina agindo via receptor de adenosina poderia ser justificado de duas formas: ela poderia modular

alostéricamente os receptores (efeito ainda não demonstrado na literatura) ou modular os níveis extracelulares de adenosina (JACKSON et al., 2013).

### 1.1 Receptores de Adenosina

Os receptores de adenosina são receptores acoplados a proteína G, expressos em diferentes tipos celulares e bem caracterizados (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; BOREA et al., 2018). Farmacologicamente os receptores de adenosina são classificados em quatro subtipos ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ ) encontrados em astrócitos, micróglia e neurônios (BJORKLUND et al., 2008; HAMMARBERG; SCHULTE; FREDHOLM, 2003). Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  são acoplados a proteínas G inibitórias ( $G_{i/0}$ ), modulando negativamente a adenilato ciclase e reduzindo os níveis de AMPc intracelular. Já os receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  estão acoplados a proteínas G estimulatórias ( $G_s$ ), modulando positivamente a adenilato ciclase e aumentando os níveis de AMPc intracelular (DUNWIDDIE; FREDHOLM, 1989; FREDHOLM et al., 2001).

A adenosina é o agonista endógeno dos quatro subtipos de receptores, tendo uma meia vida muito curta, e sua ação através dos seus receptores leva à liberação de neurotransmissores no SNC (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009). Assim como a guanosina, a adenosina já foi considerada um importante neuromodulador (FREDHOLM et al., 2005; BOREA et al., 2018). Não se pode deixar de mencionar que além dos efeitos no SNC a adenosina tem inúmeras implicações fisiológicas relevantes, como por exemplo na isquemia cerebral (MELANI; PUGLIESE; PEDATA, 2014) e no sistema cardiovascular (REISS et al., 2019). Devido ao seu potencial efeito protetor, existem hoje muitas drogas em desenvolvimento que buscam modular os receptores de adenosina e muitas encontram-se em ensaios clínicos (FREDHOLM et al., 2011).

Tanto a adenosina quanto a guanosina tem suas concentrações fisiológicas extracelulares mantidas com o auxílio de transportadores de nucleosídeos presentes nas membranas celulares, os quais promovem a liberação das purinas para o meio extracelular. Ainda, a guanosina pode existir no meio extracelular, quando o GTP presente no espaço extracelular é clivado através da ação de ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 1996). Existem dois tipos de transportadores de nucleosídeos descritos, os equilibrativos, ( $ENT_1$  –  $ENT_4$ ), e os

concentrativos (CNT<sub>1</sub> - CNT<sub>3</sub>) ambos já foram descritos tanto em astrócitos quanto em neurônios (PENG et al., 2005; LI et al., 2013).

Os receptores de adenosina podem responder à modulação no estado isolado, um receptor, ou atuar através da formação de oligômeros com os próprios receptores de adenosina (A<sub>1</sub>-A<sub>1</sub>; A<sub>2A</sub>-A<sub>2A</sub>), heterômeros de receptores de adenosina (A<sub>1A</sub>-A<sub>2A</sub>), ou ainda formar heterômeros com receptores de outros neurotransmissores, como por exemplo, com o receptor de dopamina (A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>). Essas interações podem disparar diferentes vias de sinalização intracelulares promovendo diferentes efeitos biológicos (AGNATI et al., 2005; FRANCO et al., 2005).

Os receptores A<sub>1</sub> estão amplamente distribuídos no cérebro humano principalmente no estriado e na região CA1 do hipocampo (SVENNINGSSON et al., 1997). Sua localização em neurônios pode ser tanto nas membranas pré- quanto pós-sinápticas (OCHIISHI et al., 1999). Os receptores A<sub>1</sub> modulam correntes iônicas de Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup> e reduzem a liberação pré-sináptica de neurotransmissores (HAAS; SELBACH, 2000). O receptor A<sub>1</sub> exerce efeitos neuromodulatórios sobre as sinapses glutamatérgicas, onde inibe a liberação de glutamato, essa modulação já foi mostrada benéfica na isquemia (BOECK et al., 2004; CONSTANTINO et al., 2015). Além disso, já foi demonstrado que o efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico com doses subletais de NMDA (ácido N-Metil-D-aspartico) pode ser abolido pelo bloqueio de receptores A<sub>1</sub>, sugerindo uma possível relação entre o receptor A<sub>1</sub> e o receptor NMDA (CONSTANTINO et al., 2015). Pelo fato de os receptores A<sub>1</sub> apresentarem ampla distribuição e uma variada gama de efeitos fisiológicos, sua modulação pode ter como consequência efeitos colaterais, sendo que uma alternativa para evitar tais efeitos seria a modulação alostérica desses receptores (ROMAGNOLI et al., 2010; BOREA et al., 2018).

Os receptores A<sub>2A</sub> são amplamente distribuídos no cérebro humano (SVENNINGSSON et al., 1997), com grande expressão no estriado (para revisão ver BOREA et al., 2018). Estes receptores estão localizados em neurônios pós-sinápticos, astrócitos e micróglia, onde coordenam uma série de funções relacionadas à reatividade glial e liberação de glutamato (DE LERA RUIZ; LIM; ZHENG, 2014). Também já foram demonstrados em terminais pré-sinápticos glutamatérgicos modulando a neurotransmissão córtex - estriado (QUIROZ et al., 2009). Os receptores A<sub>2A</sub> também apresentam um efeito na plasticidade sináptica (GOMES et al., 2011). Já foi demonstrado em humanos com a DA que os níveis do receptor A<sub>2A</sub> encontram-se aumentados em astrócitos e a retirada genética desses

receptores pode melhorar a memória de camundongos jovens e adultos (ORR et al., 2015).

## 1.2 Justificativa

Uma vez que já foi demonstrado que os efeitos protetores da guanosina depende dos receptores de adenosina (DAL-CIM 2012) e com base nos resultados apresentados no Capítulo I, nos quais a guanosina modulou a SUMOilação *in vivo*, decidimos caracterizar os efeitos da guanosina sobre o perfil de SUMOilação *in vitro* e investigar seu possível mecanismo de ação, bem como se a guanosina teria um papel protetor contra o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> em astrócitos de cultivo primário.

## 2 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da guanosina sobre a SUMOilação *in vitro* em astrócitos e neurônios, o possível mecanismo de ação e seu papel glioprotetor.

### 2.1 Objetivos Específicos

1- Investigar o efeito protetor da guanosina na reatividade astrocitária induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>, nos níveis de GFAP e na viabilidade celular;

2- Avaliar o efeito da guanosina na captação de glutamato em astrócitos incubados com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>;

3- Analisar se a guanosina modula a SUMO1-ilação e a SUMO2/3-ilação global de proteínas em astrócitos;

4- Determinar se a guanina apresenta efeito na SUMO2/3-ilação global de proteínas em astrócitos;

5- Analisar se a guanosina modula a SUMO1-ilação e a SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios;

6- Determinar se o efeito da guanosina na SUMOilação em neurônios é dependente da internalização de guanosina;

7- Determinar se a guanosina modula a SUMOilação via receptores adenosinérgicos em neurônios;

8- Analisar se a adenosina modula a SUMO1-ilação e a SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Considerações Éticas

Todas as culturas primárias realizadas na UFSC seguiram os padrões éticos e cuidado animal do comitê de ética da UFSC e as recomendações éticas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Os procedimentos foram previamente aprovados pela CEUA sob número 955, da mesma forma para as culturas neuronais realizadas na Universidade de Bristol (*approval reference number* UIN UB/18/004).

#### 3.2 Cultivo Celular, Tratamentos e Protocolos Experimentais

Foram utilizadas culturas primárias de astrócitos e neurônios preparadas conforme será descrito abaixo. Todas as células foram mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub>. Todas as placas de plástico utilizadas nos cultivos primários foram tratadas com poli-l-lisina (10 µg/mL - nº de catálogo P1524 Sigma-Aldrich) *overnight* e mantidas em incubadora. Antes do plaqueamento das células as placas foram lavadas 3 vezes com água destilada ou PBS (1X pH 7,4).

##### 3.2.1 Cultivo Primário de Astrócitos

As culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir do córtex de ratos *Wistar* neonatos (0-2 dias de vida), conforme descrito previamente (MENDES-DE-AGUIAR et al., 2008). Em cada preparação, o córtex foi dissecado com auxílio de um estereomicroscópio, em placas de Petri, contendo solução salina tamponada por fosfato com 33 mM de glicose (PBS-glicose). Após a dissociação mecânica com pipeta Pasteur, as células foram centrifugadas, ressuspendidas em Meio de Dulbecco modificado por Eagle F12 (DMEM-F12, nº de catálogo: 12500-039 Gibco), contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na densidade de 7,5 x 10<sup>5</sup> células/poço (placas de 6 poços) ou 3,5 x 10<sup>5</sup> (placas de 24 poços). As células foram cultivadas por 14 dias *in vitro* (d.i.v.) em meio DMEM-F12 com 10% de soro bovino fetal (SBF, nº de catálogo: 12657-029, Gibco), suplementado com L-glutamina (0,5 mM), bicarbonato de sódio (0,03 mM) e antibiótico/antimicótico (10 mL para cada 1 L de meio) (nº de catálogo: 15240, Gibco). Após 24 h, as células foram lavadas com

PBS (1X pH 7,4) e o meio reposto. Para a manutenção das células o meio foi trocado a cada 2 dias. Fotos representativas dos astrócitos encontram-se na página 80.

### 3.2.2 Cultivo Primário de Neurônios

As culturas neuronais foram preparadas de acordo com protocolo padrão do laboratório do professor Jeremy Henley, na Universidade de Bristol, a partir do córtex de ratos *Wistar* no período embrionário E18 (GUO et al., 2013). A dissecação foi feita, com auxílio de um estereomicroscópio, em placas de petry contendo Solução tampão de *Hank* (HBSS) e o córtex foi tripsinizado durante 15 min em banho a 37°C. Após sucessivas lavagens as células com HBSS, foi realizada a dissociação mecânica com pipetador. Após, as células foram filtradas em malha de nylon (*cell strainer*, 70 microns). As células foram contadas, em câmara de Neubauer, plaqueadas na densidade de  $5,5 \times 10^5$  células/poço (placas de 6 poços). As células foram cultivadas por 14 d.i.v. em meio Neurobasal (nº de catálogo: 12348017, Thermo Fisher Scientific). Apenas uma troca de meio foi realizada, do meio Neurobasal de plaqueamento (contendo soro de cavalo 10%) para meio de manutenção (sem soro de cavalo) ambos suplementados com B27 (Gibco), 2 mM glutamina e antibiótico (penicilina/estreptomicina, nº de catálogo: 15140122, Gibco). No apêndice B fotos representativas das culturas de neurônios.

### 3.2.3 Tratamentos

Os fármacos utilizadas neste estudo foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich. Guanosina (nº de catálogo: G6752), adenosina (nº de catálogo: A9251), guanina (nº de catálogo: G11950), dipiridamol (nº de catálogo: D9766), DPCPX (nº de catálogo: C101), ZM 241385 (4-(-2-[7-amino-2-{2-furil}{1,2,4}triazol{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-il-amino]etil)fenol, nº de catálogo: Z0153), MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio, nº de catálogo: M2128).

A guanosina e a adenosina foram diluídas diretamente em meio de cultivo, dos astrócitos (DMEM F12) ou em meio de cultivo dos neurônios (Neurobasal). A guanosina e a adenosina foram sempre pesadas no dia para uma solução-mãe de 2 mM e 10 mM, respectivamente. A guanina foi pesada e diluída em 1 mL de solução-mãe de NaOH 0,1 M com adição de 100 µL de HCl 5% para ajuste de pH 7,2, resultando em uma solução-mãe de 2,35 mM. Ao dipiridamol,

foi adicionado 1,98 mL de dimetilsulfóxido (DMSO-100%) ao frasco original contendo 10 mg, resultando em uma concentração de 10 mM, para posterior diluição de 10  $\mu$ M nas células.

Para o preparo do DPCPX foram adicionados 10 mL de DMSO ao frasco original contendo 25 mg, resultando em uma concentração de 8,2 mM, dessa primeira diluição foi preparada uma solução-mãe em meio Neurobasal de 100  $\mu$ M, para posterior diluição de 100 nM nas células. Para o ZM 241385 foi adicionado 1 mL de DMSO ao frasco original contendo 5 mg, resultando em uma concentração de 14,8 mM, dessa primeira diluição foi preparada uma solução-mãe em meio Neurobasal de 100  $\mu$ M, para posterior diluição de 50 nM nas células.

Para o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Bachem, n<sup>o</sup> de catálogo: 4014447.1000) foi adicionado 1 mL de água milliQ estéril contendo 0,2% de NH<sub>4</sub>OH ao frasco original contendo 1 mg, resultando na concentração de 221,5  $\mu$ M. Em seguida o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> foi agregado em alíquotas através de incubação a 37°C por 4 dias. Uma vez prontas as alíquotas foram estocadas em freezer -80°C (HOPPE et al., 2013), essa foi considerada a solução-mãe e foi diluído até a concentração de 2  $\mu$ M em PBS para adição nas células. O MTT foi diluído em água milliQ formando uma solução-mãe de 5 mg/mL e diluído em PBS para 2 mg/mL para a incubação nas células.

Para o tratamento dos astrócitos o soro sempre foi retirado do meio de cultivo para diminuir a proliferação dos mesmos nos tratamentos acima de 6 h. O peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> após agregado foi mantido nos astrócitos por 48 h sem troca do meio (HOPPE et al., 2013), nesse experimento para verificar a glioproteção da guanosina, foi escolhida a concentração de 100  $\mu$ M, baseada em trabalhos da literatura que demonstraram essa sendo uma concentração protetora (DAL-CIM et al., 2011; THOMAZ et al., 2016). A guanosina foi adicionada junto com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

Nos experimentos de curva concentração resposta, a guanosina foi adicionada nos astrócitos e nos neurônios por 1 h, 6 h, 24 h e 48 h. A guanina foi adicionada nos astrócitos por 1 h, 6 h e 24 h e a adenosina foi adicionada nos neurônios por 1 h. Uma vez adicionadas não houveram trocas de meio. Para os experimentos de investigação no perfil de SUMOilação, uma vez não havendo trabalhos prévios que investiguem esse efeito, foram escolhidas as concentrações de 1, 10, 100, 300 e 500  $\mu$ M baseado em estudos publicados com relação aos efeitos protetores já observados para guanosina (LITSKY et al., 1999; DAL-CIM et al., 2011; DAL-CIM 2012; THOMAZ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

### 3.2.4 Teste de Viabilidade Celular – MTT

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do sal MTT (MOSMANN, 1983), que é convertido em um formazam de coloração arroxeada pela clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases celulares (JACOBSSON; FOWLER, 1999). Após os respectivos tratamentos as células foram incubadas com o MTT (0,2 mg/mL) diluído em PBS e mantidas a 37°C por 2 h. O MTT foi então removido e foi adicionado nas células DMSO (100%) em quantidade suficiente para cobrir o fundo da placa. A absorbância utilizada para leitura foi de 540 nm e foi determinada em um leitor de Elisa.

### 3.2.5 Captação de Glutamato

No ensaio de captação de glutamato foi avaliado tanto a captação dependente quanto a independente de Na<sup>+</sup> (substituindo o NaCl pelo cloreto de colina) no tampão HBSS. A captação de glutamato dependente de Na<sup>+</sup> foi obtida subtraindo-se a captação independente de Na<sup>+</sup> da captação total. Após o tratamento dos astrócitos corticais com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> e guanosina por 48 h, o meio de cultivo foi retirado e os astrócitos foram incubados com 300  $\mu$ L de HBSS por 15 min a 37°C. Em seguida, foi adicionado 20  $\mu$ L de L-[3H] glutamato radioativo (0,33  $\mu$ Ci/mL) mais glutamato não-marcado (100  $\mu$ M). Após 7 min a solução contendo L-[3H] glutamato foi retirada para interromper a captação e foram efetuadas 2 lavagens com 1 mL de HBSS (Na<sup>+</sup> ou colina) gelado. Em seguida os astrócitos foram solubilizados em 300  $\mu$ L de 0,1% NaOH / 0,01% SDS em cada poço e as placas permaneceram *overnight* à temperatura ambiente (POLUCENO, 2019).

O conteúdo de cada poço foi transferido para *eppendorfs*, foram retiradas alíquotas para dosagem de proteínas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977) e ao restante foi adicionado líquido de cintilação para a determinação do conteúdo intracelular de L-[3H] glutamato utilizando-se um detector de cintilação líquida. As amostras foram lidas no equipamento TriCarb 3180 (Perkin Elmer) no laboratório do professor Dr Boris Juan Stambuk. Os resultados foram expressos em nmol de L-[3H] glutamato captado / mg de proteína / min.

### 3.2.6 Imunocitoquímica

Os astrócitos foram plaqueados (1 x 10<sup>5</sup> células/poço) em lamínulas de vidro previamente tratadas em ácido nítrico fumegante e

poli-l-lisina (0,1 mg/mL). Após 14 d.i.v., as células foram tratadas de acordo com cada protocolo experimental, lavadas com PBS 1X e fixadas em paraformaldeído 1% durante 20 min. Após 3 lavagens com PBS 1X, as células foram permeabilizadas com PBS / Triton 0,2% durante 10 min e lavadas novamente. O bloqueio foi realizado com solução PBS / BSA 5% durante 60 min, após as células foram lavadas com PBS / Triton 0,2% durante 10 min. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários anti-GFAP (1:100; Sigma-Aldrich) e anti-A $\beta$  (1:100, Cell signaling) e com o corante *Hoechst* 33342 (DAPI) diluídos em PBS / Triton 0,2% por aproximadamente 2 h (temperatura ambiente), lavadas com PBS / Triton 0,2%, e incubadas com anticorpos secundários fluorescentes (1:100) durante 1 h a temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas sobre lâminas utilizando meio de montagem para fluorescência (nº de catálogo: S3023, Dako) e as imagens adquiridas em microscópio confocal (Leica- LCME- UFSC) (protocolo adaptado de DAL-CIM, 2012).

### 3.2.7 Contagem de Astrócitos Apoptóticos e do Número de Processos

O corante *Hoeschst* (DAPI), utilizado como marcador nuclear, permite analisar modificações na cromatina das células marcadas e a contagem do número total de células. As células foram contadas em 3 campos diferentes para cada lamínula em 3 experimentos independentes (no aumento de 63 x) e foram determinados dentro desses campos o número de células com núcleo picnótico, sendo este parâmetro utilizado para quantificar as células com características apoptóticas (NEGRI et al., 1997; BELICZA, 2009). O número de processos foi contado toda vez que um astrócito com morfologia reativa foi observado, ou seja, quando havia emissão de prolongamentos bem definidos saindo do corpo celular (HOPPE et al., 2013).

### 3.2.8 *Western Blotting*

Todos os experimentos foram realizados em placas de 6 poços para que houvesse quantidade suficiente de proteína. Após cada protocolo de tratamento, o meio de cultivo foi removido e foi adicionado em cada poço 250  $\mu$ L de tampão azul 1X (azul de bromofenol, Tris 100 mM pH 6,8, glicerol 20%, EDTA 4 mM, SDS 8% e  $\beta$ -mercaptoetanol 8%). Em seguida, o lisado celular foi transferido para *eppendorf* e fervido a 95°C por 5-10 min. Foram utilizados sempre 25  $\mu$ L de cada amostra, sem realizar dosagem de proteínas, uma vez que em cada poço

as células foram previamente contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas no mesmo número. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 12% para o gel de separação e de 5% para o gel de entrada. A eletroforese foi realizada com corrente entre 90 e 130 V durante aproximadamente 2 h. Após o término da corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência por 1 h e 30 min, onde as proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de PVDF (0,45 µm). Após as membranas foram bloqueadas por 1 h com leite desnatado ou BSA 5% em TBS-T. Em seguida foram lavadas com TBS-T por três vezes de 5 min (FLETCHER-JONES et al., 2019).

As membranas foram coradas com *Ponceanu S* 0,1% em 5% de ácido acético e posteriormente incubadas com os anticorpos contra SUMO1 (1:1000), SUMO2/3 (1:1000), SENP3 (1:1000), GFAP (1:50000), GAPDH (1:10000), beta-tubulina (1:5000) *overnight* sob agitação a 4°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário específico *anti-rabbit* ou *anti-mouse* (1:5000) em temperatura ambiente sob agitação. Após 3 lavagens em TBS-T por 5 min, as membranas foram reveladas no equipamento Quemidoc® Biorad (LAMEB-UFSC) ou em filmes (Universidade de Bristol), sempre com a adição de ECL na membrana (Kit ECL ThermoScientific®). As bandas obtidas foram analisadas pelo *software* ImageLab ou ImageJ (NIH) e os valores obtidos de densidade óptica (DO) foram divididos por um dos controles de carregamento respectivos de cada membrana (como *Ponceanu* (ROMERO-CALVO, et al, 2010), GAPDH (WU, et al., 2012) ou beta-tubulina (LI; SHEN, 2013) (uma tabela com os respectivos fabricantes dos anticorpos encontra-se no Anexo A).

### 3.2.9 Análise Estatística

Para os resultados de *Western blotting*, as densidades ópticas das proteínas de interesse foram divididas pelos seus controles de carregamento sempre na mesma membrana. Devido a variações encontradas na incubação de membranas no protocolo de *Western blotting* das amostras *in vitro*, este trabalho usou uma nova abordagem de análise. Após calculada todas as médias de todos os grupos, essas foram somadas e consideradas como 100% de sinal daquele experimento. Após calcular o sinal total da membrana como 100%, todos os grupos presentes naquela membrana foram calculados em relação ao sinal total obtido e não com relação ao controle somente.

Desta forma, diminui-se o erro em relação à intensidade de sinal que pode variar muito devido a fatores experimentais como, por exemplo, tempo de incubação diferente entre membranas de experimentos diferentes e a reutilização de anticorpos primários e secundários. Sempre foi tomado o devido cuidado de na mesma membrana ter todos os grupos (controle e tratamentos) dos diferentes experimentos. Essa análise de dados foi adotada com base na análise dos dados já feita no laboratório do Prof. Jeremy Henley (GURUNG et al., 2018; FLETCHER-JONES et al., 2019).

Os dados foram submetidos a um teste de normalidade, *Kolmogorov-Smirnov* e testados para a presença de *outliers* no QuickCalcs (disponível em <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Uma vez confirmado que os dados apresentavam uma distribuição normal foi realizado uma análise de variância (ANOVA) de uma via para todos os resultados de *Western blotting*. Quando a ANOVA detectou diferença, o teste de *post hoc Newman-Keuls* foi aplicado para verificar onde se encontravam as diferenças entre os tratamentos.

Os resultados são apresentados como média + erro padrão da média e a diferença estatística é indicada como \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  e \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . As análises foram realizadas e os gráficos foram confeccionados utilizando os programa Prisma 5.0 (GraphPad Prism, EUA).

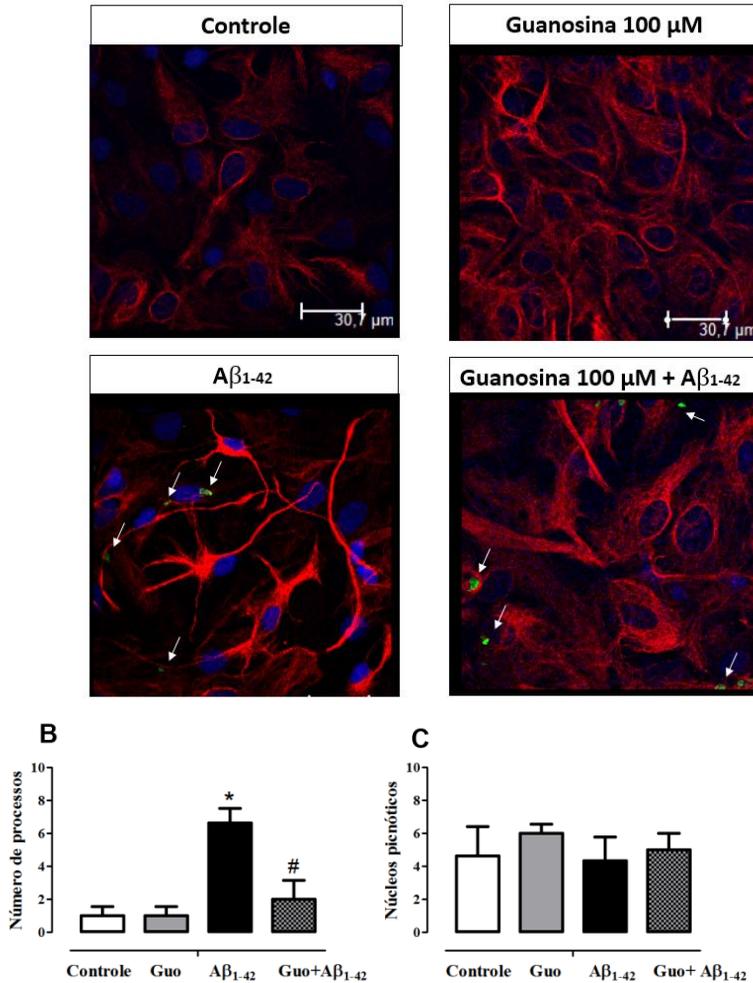
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito da guanosina na reatividade astrocitária induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>

Como citado na introdução desta tese, a guanosina apresentou um potencial glioprotetor (SOUZA et al., 2016), protegeu contra toxicidade do peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> (PETTIFER et al., 2004) e A $\beta$ <sub>1-42</sub> (TAROZZI et al., 2010) ambos em células SH-SY5Y. Entretanto, não existem na literatura investigações do efeito protetor da guanosina contra a toxicidade do peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> em astrócitos. Nesse contexto, foi investigado o efeito protetor da guanosina na reatividade astrocitária induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>, a viabilidade celular, a expressão da proteína GFAP e possíveis alterações na captação de glutamato. O protocolo de incubação foi baseado no estudo prévio de HOPPE e colaboradores (2013).

Pode ser observado na Figura 16<sup>a</sup>, que a incubação por 48 h com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> (2  $\mu$ M) alterou a morfologia das células, promovendo um fenótipo de reatividade astrocitária. A partir das observações desse fenótipo dos astrócitos, os mesmos foram quantificados quanto ao número de processos emitidos (HOPPE et al., 2013). Pode-se observar na Figura 16B um aumento significativo no número de processos causado pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> (ANOVA de uma via, F=10,56; p=0,0037), e que na presença de guanosina, o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> não foi capaz de induzir um aumento significativo no número de processos (p>0,05 ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls).

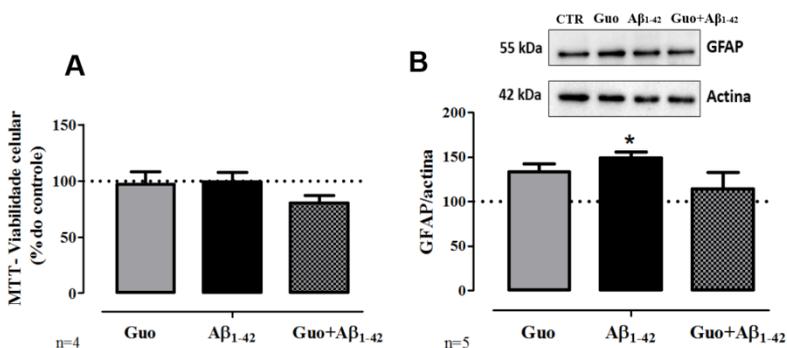
**Figura 16:** Efeito da guanosina na reatividade astrocitária induzida pelo peptídeo A $\beta$ 1-42.



**A.** Fotomicrografias confocais representativas de astrócitos e os respectivos tratamentos por 48 h. **B.** Dados quantitativos do número de processos astrocitários. **C.** Número de núcleos picnóticos. As setas indicam marcação para A $\beta$ 1-42 (verde). Marcação para GFAP em vermelho e para DAPI (núcleo) em azul. Guo: guanosina (100  $\mu$ M); A $\beta$ 1-42 (2  $\mu$ M); Aumento de 63 x. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas onde \* $p \leq 0,05$  com relação ao grupo controle # $p \leq 0,05$  com relação ao grupo A $\beta$ 1-42; n: 3 experimentos independentes.

Com relação ao número de células apoptóticas contadas através dos núcleos picnóticos, não houve diferenças (ANOVA de uma via,  $F=0,3164$ ;  $p=0,8134$ , Figura 16C). Foi confirmado através de *Western blotting* um aumento significativo no imunoc conteúdo da proteína GFAP nas células tratadas com o peptídeo  $A\beta_{1-42}$  (ANOVA de uma via,  $F=3,587$ ;  $p=0,0342$ ). Entretanto, com a co-incubação de guanosina e o peptídeo  $A\beta_{1-42}$  o aumento nos níveis de GFAP não foi observado (Figura 17B).

**Figura 17:** Efeito da guanosina no teste de viabilidade celular e expressão de GFAP em astrócitos tratados com o peptídeo  $A\beta_{1-42}$ .

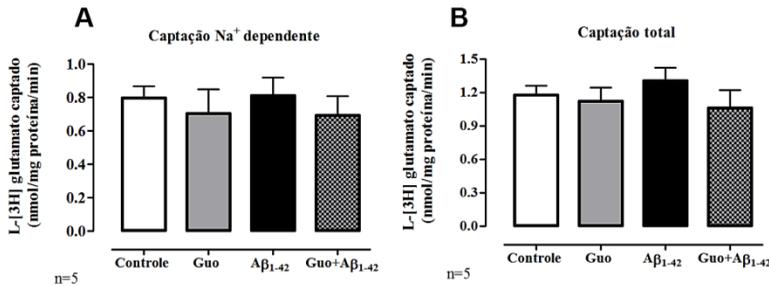


**A.** Ensaio de viabilidade celular MTT. **B.** *Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de GFAP dividida pelo controle de carregamento actina. Guo: guanosina (100  $\mu$ M);  $A\beta_{1-42}$  (2  $\mu$ M); ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas onde  $*p \leq 0,05$  com relação ao grupo controle. n: número de experimentos independentes.

Com relação ao ensaio de viabilidade celular (MTT) não foram observadas diferenças entre os grupos, como se pode observar na Figura 17A (ANOVA de uma via,  $F=1,487$ ;  $p=0,2679$ ). No ensaio de captação de glutamato (Figura 18A e B) não foram observadas diferenças quanto à captação dependente de  $Na^+$  (ANOVA de uma via,  $F=0,3213$ ;  $p=0,8099$ ), nem quanto à captação total (ANOVA de uma via,  $F=0,6889$ ;  $p=0,5719$ ).

Com relação ao perfil de SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas nos astrócitos incubados com o peptídeo  $A\beta_{1-42}$ , não foram observadas diferenças significativas e os resultados encontram-se no apêndice B.

**Figura 18:** Efeito da guanosina na captação de glutamato em astrócitos tratados com peptídeo  $A\beta_{1-42}$ .



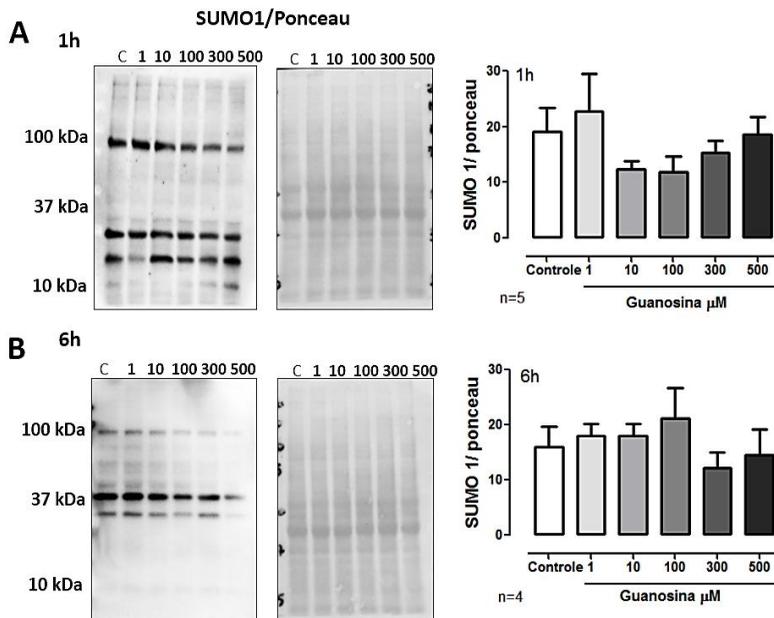
Ensaio de captação de glutamato L-[ $^3H$ ] glutamato em astrócitos incubados com peptídeo  $A\beta_{1-42}$  por 48 h. **A.** Captação  $Na^+$  dependente **B.** Captação total. ANOVA de uma via não detectou diferença entre os tratamentos. Guo: guanosina (100  $\mu M$ );  $A\beta_{1-42}$ : (2  $\mu M$ ). n: número de experimentos independentes.

#### 4.2 Efeitos da guanosina sobre a SUMOilação global de proteínas em astrócitos

Além de ser o tipo celular mais abundante no SNC, os astrócitos contribuem para a homeostase e manutenção do cérebro auxiliando na função neuronal, dando suporte físico e nutrindo os neurônios. Cada vez mais estudos relatam o papel dos astrócitos em diferentes doenças do SNC (VERKHRATSKY; PARPURA, 2016; MATIAS; MORGADO; GOMES, 2019). Considerando a grande importância desse tipo celular, a primeira caracterização dos efeitos da guanosina sobre a SUMOilação foi feita utilizando astrócitos corticais.

Com relação ao perfil de SUMO1-ilação global de proteínas nos astrócitos, pode-se observar na Figura 19 que após 1 h e 6 h de incubação com guanosina, não foram detectadas diferenças significativas comparando as diferentes concentrações de guanosina com o grupo controle (ANOVA de uma via, 1 h,  $F=1,214$ ;  $p=0,333$ ; 6 h,  $F=0,696$ ;  $p=0,633$ ).

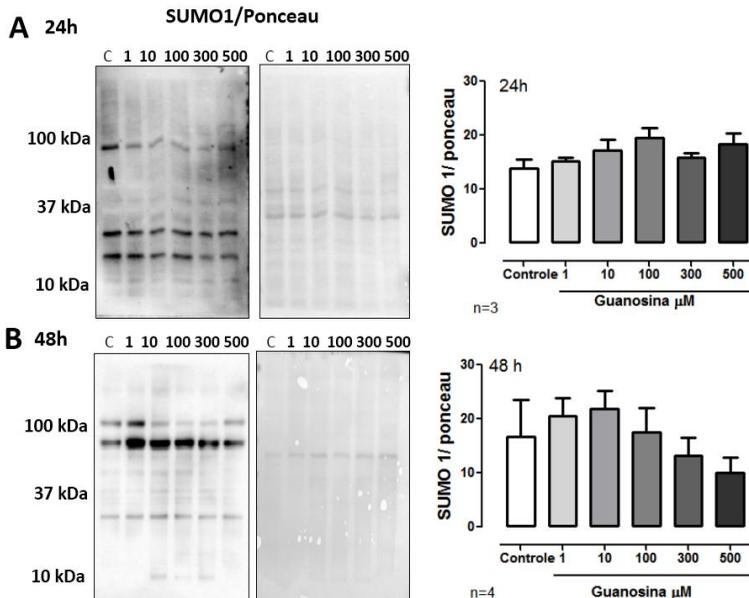
**Figura 19:** Efeitos da guanosina em 1 h e 6 h na SUMO1-ilação global em astrócitos corticais.



*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO1-ilação global dividida pelo controle de carregamento *Ponceau*, com as respectivas concentrações de guanosina em **A.** 1 h e em **B.** 6 h. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via não detectou diferença entre os grupos. kDa: kilodaltons; C: Controle; n: número de experimentos independentes.

Com relação ao perfil de SUMO1-ilação global de proteínas, nos tempos de 24 h (Figura 20A) e 48 h (Figura 20B) nos astrócitos, não foram detectadas diferenças significativas comparando as diferentes concentrações de guanosina com o grupo controle (ANOVA de uma via, 24 h,  $F=1,710$ ;  $p=0,183$ ; 48 h,  $F=1,102$ ;  $p=0,393$ ).

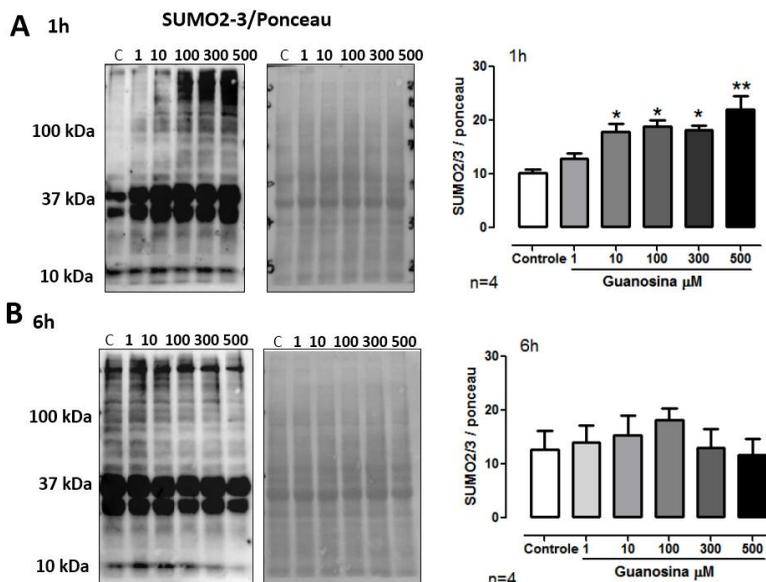
**Figura 20:** Efeito da guanosina em 24 h e 48 h na SUMO1-ilação global em astrócitos corticais.



*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO1-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento *Poncaeu*, com as respectivas concentrações de guanosina em **A**. 24 h e em **B**. 48 h. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via não detectou diferença entre os grupos. kDa: kilodaltons; C: Controle; n: número de experimentos independentes.

Um aumento significativo na SUMO2/3-ilação global de proteínas nos astrócitos tratados por 1 h com concentrações de guanosina acima de 10  $\mu\text{M}$  pode ser observada na Figura 21A (ANOVA de uma via,  $F=9,025$ ;  $p=0,0002$ ). Para as análises quantitativas de *Western blotting* foi observado um aumento na densidade óptica de SUMO-2/3 de  $10,27 \pm 0,53$  do grupo controle, para  $17,80 \pm 1,57$  com 10  $\mu\text{M}$  de guanosina, para  $18,88 \pm 1,19$  com 100  $\mu\text{M}$  de guanosina, para  $18,23 \pm$  com 300  $\mu\text{M}$  de guanosina e para  $21,99 \pm 2,53$  com 500  $\mu\text{M}$  de guanosina. A concentração de 1  $\mu\text{M}$  não foi diferente do grupo controle com uma densidade óptica de  $12,83 \pm 1,03$ .

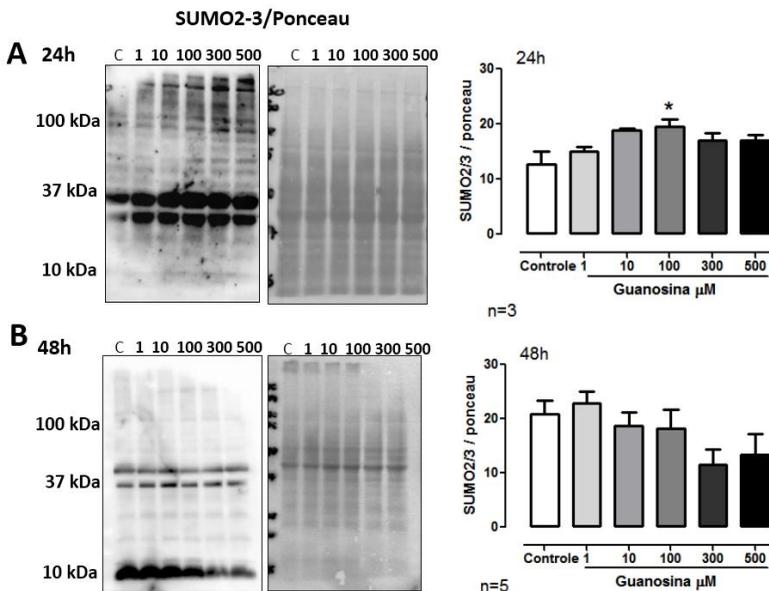
**Figura 21:** Efeito da guanosina em 1 h e 6 h na SUMO2/3-ilação global em astrócitos corticais.



Western blotting representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO2/3-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento *Ponceau*, com as respectivas concentrações de guanosina em **A**. 1 h e em **B**. 6 h. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas onde \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$  com relação ao grupo controle. kDa: kilodaltons; C: Controle; n: número de experimentos independentes.

Em 6 h de tratamento as diferentes concentrações de guanosina não alteraram o perfil de SUMO2/3-ilação global de proteínas (ANOVA de uma via,  $F=0,447$ ;  $p=0,814$ ; Figura 21B). Em 24 h foi observado um aumento (ANOVA de uma via,  $F=3,392$ ;  $p=0,038$ ) na SUMO2/3-ilação global de proteínas na concentração de 100  $\mu\text{M}$  de guanosina ( $19,52 \pm 1,37$  DO) com relação ao grupo controle ( $12,70 \pm 2,28$  DO) (Figura 22A). Já em 48 h (Figura 22B) não foram observados efeitos significativos na SUMO2/3-ilação global de proteínas entre as diferentes concentrações de guanosina e o grupo controle (ANOVA de uma via,  $F=2,296$ ;  $p=0,07$ ).

**Figura 22:** Efeito da guanosina em 24 h e 48 h na SUMO2/3-ilação global em astrócitos corticais.



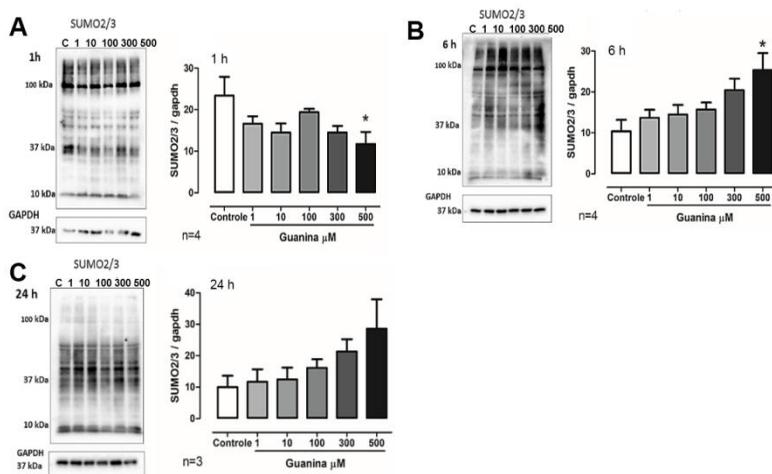
*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO2/3-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento *Ponceau*, com as respectivas concentrações de guanosina em **A**. 24 h e em **B**. 48 h. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas onde  $*p \leq 0,05$  com relação ao grupo controle. kDa: kilodaltons; C: Controle; n: número de experimentos independentes.

#### 4.3 Efeitos da guanina no perfil de SUMOilação global de proteínas em astrócitos

Uma vez que a guanosina pode ser metabolizada à guanina, foi verificado se o aumento na SUMOilação observado nos astrócitos era um efeito da guanosina *per se* ou de seu metabólito. Com relação ao perfil de SUMO1-ilação global de proteínas nos astrócitos tratados com guanina não foi observada diferenças significativas (apêndice C). Entretanto, pode-se observar na Figura 23A, que a guanina na concentração de 500 μM, em 1 h diminuiu a SUMO2/3-ilação global de

proteínas comparando-se com o grupo controle (ANOVA de uma via,  $F=2,580$ ;  $p=0,06$ ).

**Figura 23:** Efeitos da guanina em 1 h, 6 h e 24 h na SUMO2/3-ilação global de proteínas em astrócitos corticais.



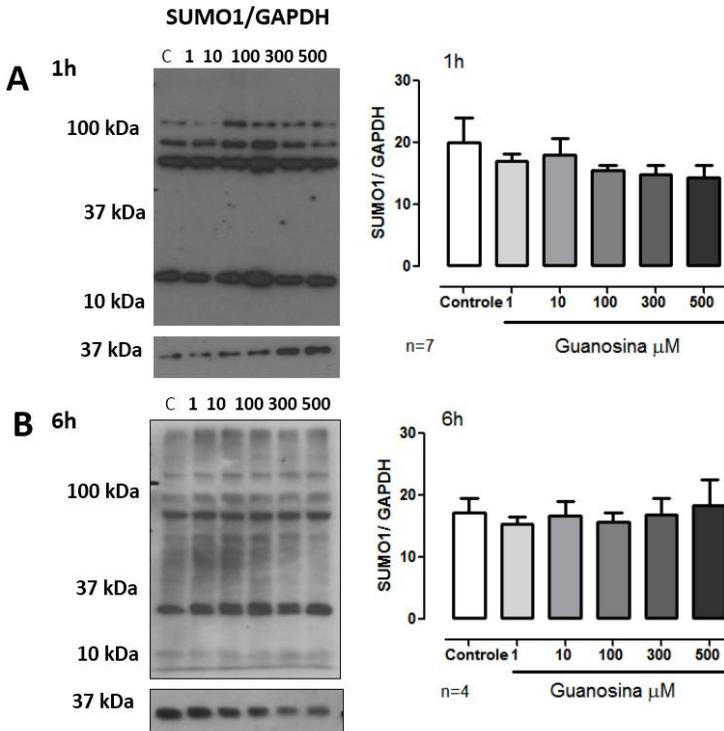
*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO2/3-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH, com as respectivas concentrações de guanina em **A.** 1 h, **B.** 6 h e **C.** 24 h. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas  $*p \leq 0,05$ ; C: Controle; n: número de experimentos independentes.

Pode-se observar na Figura 23B que a guanina na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , em 6 h aumentou a SUMO2/3-ilação global de proteínas (ANOVA de uma via,  $F=3,852$ ;  $p=0,015$ ). Pode-se observar na Figura 23C que a partir de 24 h, as diferentes concentrações de guanina não apresentaram nenhum efeito significativo na SUMO2/3-ilação global de proteínas quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via,  $F=1,945$ ;  $p=0,160$ ), por esse motivo o tempo de 48 h não foi avaliado.

#### 4.4 Efeito da guanosina na SUMOilação global de proteínas em neurônios

Uma vez que a maioria dos trabalhos que avaliam o perfil de SUMOilação são realizados em neurônios (para revisão ver HENLEY; CRAIG; WILKINSON, 2014; HENLEY; CARMICHAEL; WILKINSON, 2018) também foi investigado se a guanosina modulava o perfil de SUMOilação global de proteínas em neurônios. Pode-se observar na Figura 24A que em neurônios corticais tratados com guanosina por 1 h não foram detectadas diferenças significativas de SUMO1-ilação global nas diferentes concentrações de guanosina comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via,  $F=0,9127$ ;  $p=0,483$ ).

**Figura 24:** Efeito da guanosina em 1 h e 6 h na SUMO1-ilação global de proteínas em neurônios corticais.

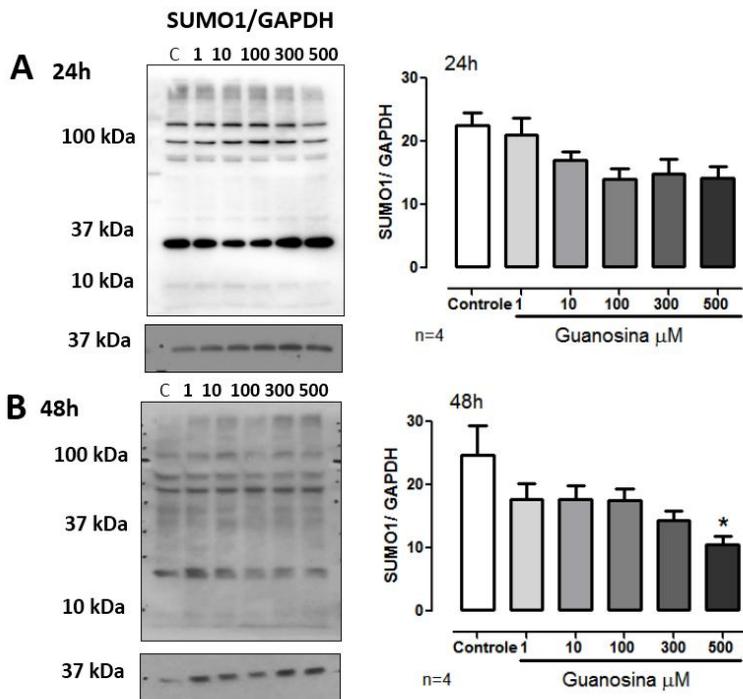


*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO1-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de

carregamento GAPDH, com as respectivas concentrações de guanosina em **A.** 1 h e **B.** 6 h. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA não detectou diferença entre os grupos. C: Controle; n: número de experimentos independentes.

Em neurônios tratados com guanosina durante 6 h também não houve diferenças significativas na SUMO1-ilação global de proteínas comparado com o grupo controle (Figura 24B, ANOVA de uma via,  $F=0,1666$ ;  $p=0,9717$ ).

**Figura 25:** Efeito da guanosina em 24 h e 48 h na SUMO1-ilação global de proteínas em neurônios corticais.



*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO1-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH, com as respectivas concentrações de guanosina em **A.** 24 h e **B.** 48 h. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls*

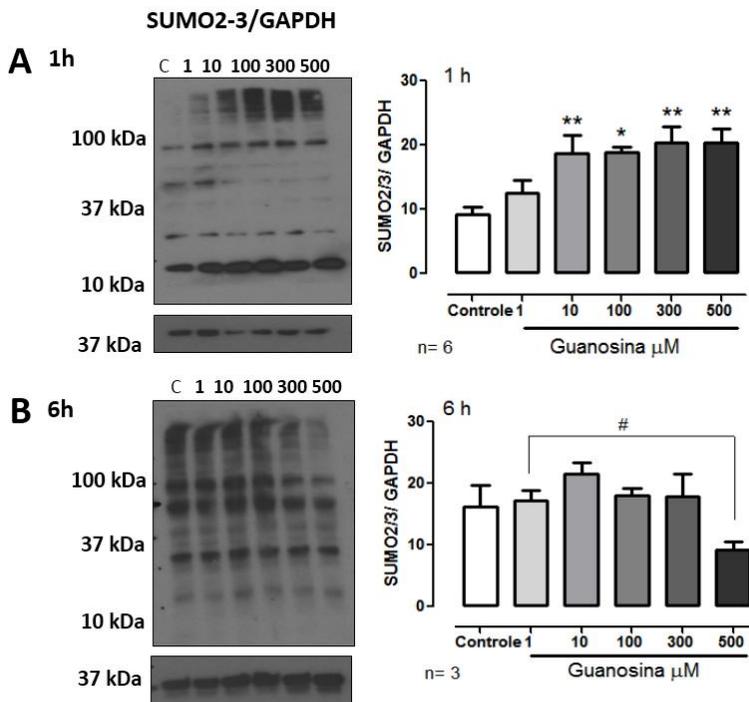
comparações múltiplas. \* $p \leq 0,05$ ; C: Controle; n: número de experimentos independentes.

Com relação a SUMO1-ilação global nos neurônios tratados por 24 h (Figura 25A) com as diferentes concentrações de guanosina a ANOVA detectou um efeito entre os tratamentos (ANOVA de uma via,  $F=3,231$ ;  $p=0,03$ ) porém, o teste de *post hoc* de *Newmann-Keuls* não detectou entre quais grupos seriam essa diferença. Em 48 h foi observado um efeito significativo na redução da SUMO1-ilação global (ANOVA de uma via,  $F=2,851$ ;  $p=0,047$ ), com a concentração de 500  $\mu\text{M}$  de guanosina ( $10,61 \pm 1,24$  DO) comparado com o grupo controle ( $24,67 \pm 4,70$  DO) (Figura 25B).

Com relação a SUMO2/3-ilação global de proteínas, pode ser observado na Figura 26A que o tratamento com a guanosina nas concentrações de 10, 100, 300 e 500  $\mu\text{M}$  em 1 h foi capaz de aumentar a SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios corticais (ANOVA de uma via,  $F=5,014$ ;  $p=0,001$ ). Os valores de densidade óptica observados variaram de  $9,14 \pm 1,29$  para o grupo controle,  $18,64 \pm 2,86$  para a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de guanosina,  $18,93 \pm 0,80$  para 100  $\mu\text{M}$  de guanosina, para  $20,33 \pm 2,61$  com 300  $\mu\text{M}$  de guanosina, e  $20,39 \pm 2,19$  com 500  $\mu\text{M}$  de guanosina.

Em 6 h não foram observadas diferenças entre as diferentes concentrações de guanosina com relação grupo controle (Figura 26B, ANOVA de uma via,  $F=2,890$ ;  $p=0,0613$ ), porém, o teste de *post hoc* *Newmann-Keuls* detectou diferenças onde a concentração de 500  $\mu\text{M}$  de guanosina ( $9,22 \pm 1,31$  DO) diminuiu a SUMO2/3-ilação global de proteínas com relação a concentração de 1  $\mu\text{M}$  ( $17,13 \pm 1,70$ ), porém, não diferiu do grupo controle ( $16,19 \pm 3,49$ ).

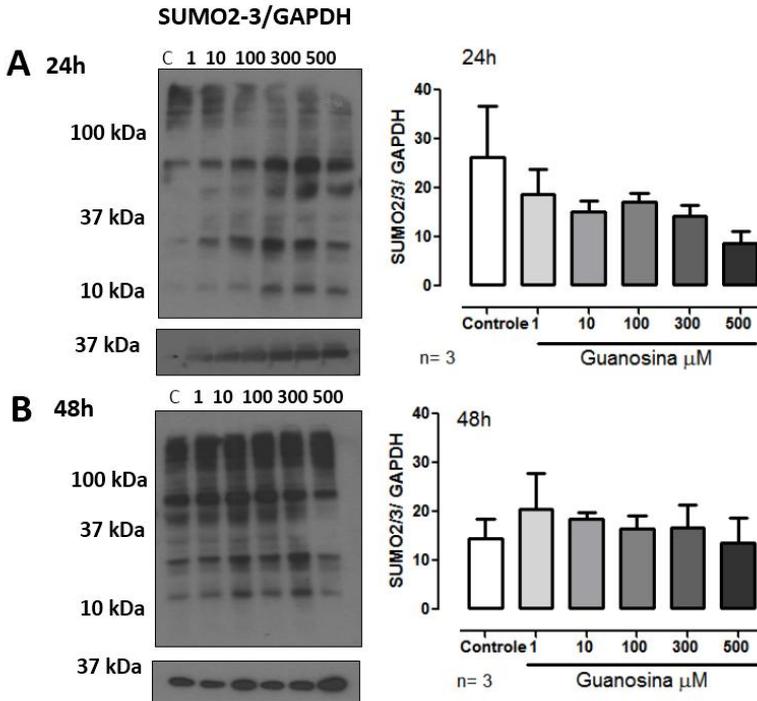
**Figura 26:** Efeito da guanosina em 1 h e 6 h na SUMO2/3-ilação global em neurônios corticais.



*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO2/3-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH, com as respectivas concentrações de guanosina em **A.** em 1 h. **B.** em 6 h. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; # $p < 0,05$  com relação a guanosina; C: Controle; n: número de experimentos independentes.

Com relação ao perfil de SUMO2/3-ilação global de proteínas em 24 h (ANOVA de uma via,  $F=1,309$ ;  $p=0,3236$ ) e 48 h (ANOVA de uma via,  $F=0,2917$ ;  $p=0,9085$ ) não foram observadas diferenças entre as diferentes concentrações de guanosina com relação ao grupo controle (Figura 27).

**Figura 27:** Efeito da guanosina em 24 h e 48 h na SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios corticais.



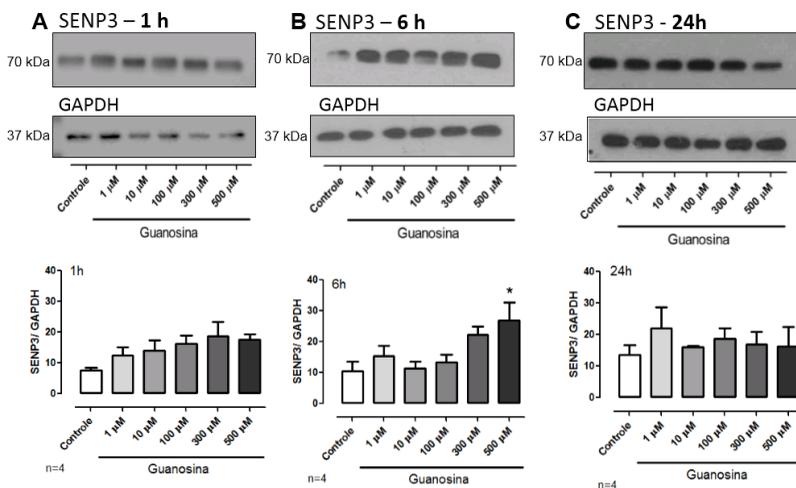
*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO2/3-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH, com as respectivas concentrações de guanosina em **A.** 24 h. e em **B.** 48 h. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA não detectou diferença entre os tratamentos. C: Controle; n: número de experimentos independentes.

#### 4.5 Efeitos da guanosina na SENP3 em neurônios

A SUMO2/3-ilação global de proteínas é regulada pela enzima SENP3, que é a enzima responsável por descojugar a SUMO2/3 das proteínas alvo. Em 1 h não houve alteração nos níveis de SENP3 nos neurônios corticais tratados com guanosina (ANOVA de uma via,  $F=1,450$ ;  $p=0,2602$ ), Figura 28A. Entretanto em 6 h houve um aumento significativo na SENP3 na concentração de 500 μM de guanosina

(ANOVA de uma via,  $F=3,638$ ;  $p=0,018$ ), Figura 28B. Em 24 h (Figura 28C) o efeito na SENP3 não é mais observado comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via,  $F=0,4313$ ;  $p=0,8205$ ), por esse motivo o tempo de 48 h não foi avaliado.

**Figura 28:** Efeito da guanosina em 1 h, 6 h, e 24 h, nos níveis de SENP3 em neurônios corticais.



*Western blottings* e análise quantitativa da densidade óptica de SENP3 dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH, com as respectivas concentrações de guanosina em **A.** 1 h, em **B.** 6 h e em **C.** 24 h. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas. \* $p \leq 0,05$ ; kDa: kilodaltons; n: número de experimentos independentes.

#### 4.6 Efeitos da guanosina na SUMOilação global de proteínas com o bloqueio dos transportadores de nucleosídeos em neurônios

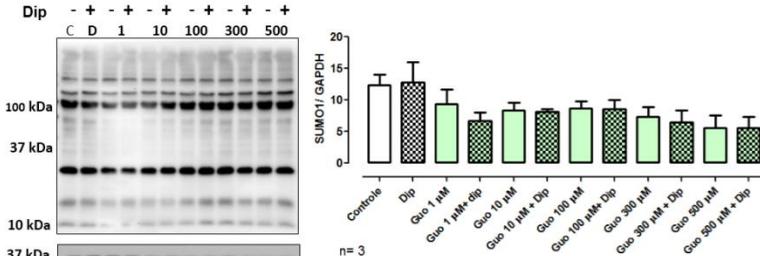
Sabe-se que a maquinaria de SUMOilação está presente no citoplasma e no núcleo das células (HENLEY; CRAIG; WILKINSON, 2014) e que a guanosina pode trafegar entre os compartimentos extra e intracelulares com auxílio dos transportadores de nucleosídeos presentes na membrana celular (para revisão ver PASTOR-ANGLADA; PÉREZ-TORRAS, 2018). Para investigar se o mecanismo pelo qual a guanosina aumenta a SUMO2/3-ilação é extracelular ou intracelular, neurônios corticais (14 d.i.v.) foram pré-incubados com dipiridamol (10 μM) por

20 min, um bloqueador do transporte de nucleosídeos, a guanosina foi então adicionada e mantida por 1 h.

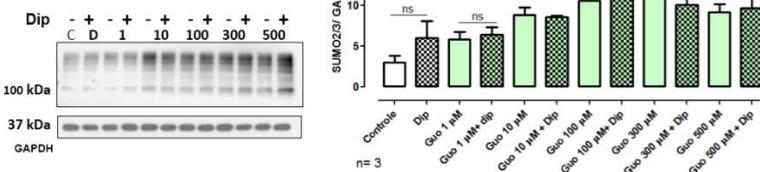
Pode-se observar na Figura 29A que mesmo com o bloqueio da internalização da guanosina a SUMO1-ilação global de proteínas permanece inalterada (ANOVA de uma via,  $F=1,709$ ;  $p=0,1318$ ). Pode-se observar na Figura 29B que o aumento da SUMO2/3-ilação global de proteínas de alto peso molecular provocado pela guanosina em 1 h se mantém significativo comparado com o controle mesmo na presença do dipiridamol (ANOVA de uma via,  $F=3,444$ ;  $p=0,0055$ ), ou seja, o aumento na SUMO2/3-ilação provocado pela guanosina independe de sua internalização, indicando sua possível interação com um receptor na membrana. Nesta figura são mostradas e quantificadas apenas as proteínas de alto peso molecular para isoforma SUMO2/3 uma vez que as bandas referentes aos pesos moleculares menores ficaram muito fracas mesmo com super-exposição.

**Figura 29:** Efeitos da guanosina em 1 h na SUMO1-ilação e na SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios corticais tratados com o bloqueador do transporte de nucleosídeos.

### A SUMO1



### B SUMO2/3 - Alto peso molecular



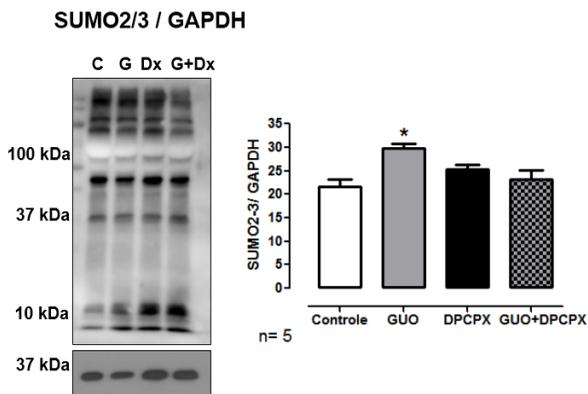
*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de **A.** SUMO1-ilação global de proteínas dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH, com as respectivas concentrações de guanosina e em **B.** *Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de

SUMO2/3-ilação global de proteínas dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH, com as respectivas concentrações de guanosina. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas. \*  $p \leq 0,05$ ; ns: não significativo; C: Controle; D ou Dip: dipiridamol (10  $\mu\text{M}$ ); n: número de experimentos independentes.

#### 4.7 Efeitos da guanosina na SUMOilação global de proteínas com o bloqueio dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>

Com base nos resultados mostrados acima, foi avaliado se haveria alteração no efeito da guanosina na SUMO2/3-ilação global de proteínas com bloqueio do receptor A<sub>1</sub>, utilizando DPCPX (8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina) antagonista dos receptores A<sub>1</sub> (100 nM) adicionado no meio de cultivo 20 min antes de guanosina (500  $\mu\text{M}$ ). Pode-se observar na Figura 30 que o pré-tratamento com o antagonista A<sub>1</sub> aboliu o efeito da guanosina em promover o aumento da SUMO2/3-ilação global de proteínas e o antagonista *per se* não promoveu alteração na SUMO2/3-ilação global de proteínas (ANOVA de uma via,  $F=3,086$ ;  $p=0,0571$ ).

**Figura 30:** Efeito da guanosina em 1 h na SUMO2/3-ilação global em neurônios corticais tratados com antagonista do receptor de adenosina A<sub>1</sub>.

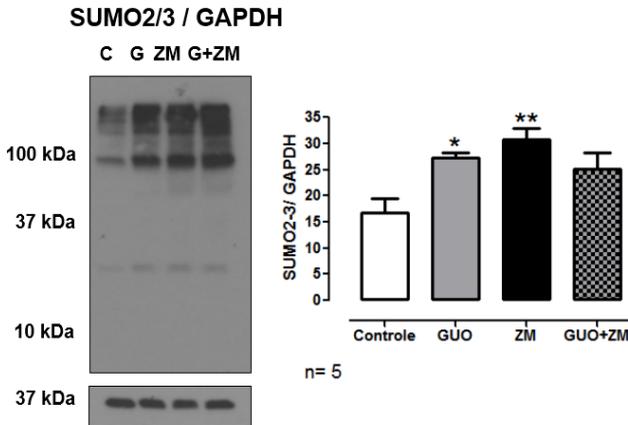


*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO2/3-ilação global de proteínas dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH, com o pré-tratamento com DPCPX (20 min, 100 nM) antes da adição de guanosina (500  $\mu\text{M}$  – 1 h). Resultados expressos em média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via seguido do teste

*post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas. \*  $p \leq 0,05$ ; C: Controle; G ou Guo: guanosina; Dx: DPCPX; n: número de experimentos independentes.

No que se refere a modulação do receptor  $A_{2A}$ , (utilizando ZM241385, antagonista  $A_{2A}$ , 50 nM), 20 min antes da adição da guanosina (500  $\mu$ M), pode-se observar na Figura 31 que o efeito de aumentar a SUMO2/3-ilação global de proteínas ocorreu com a presença de guanosina, com a presença do antagonista, mas não ocorreu quando ambos estavam presentes (ANOVA de uma via,  $F=6,569$ ;  $p=0,0042$ ).

**Figura 31:** Efeito da guanosina em 1 h na SUMO2/3-ilação global em neurônios corticais tratados com antagonista do receptor de adenosina  $A_{2A}$ .



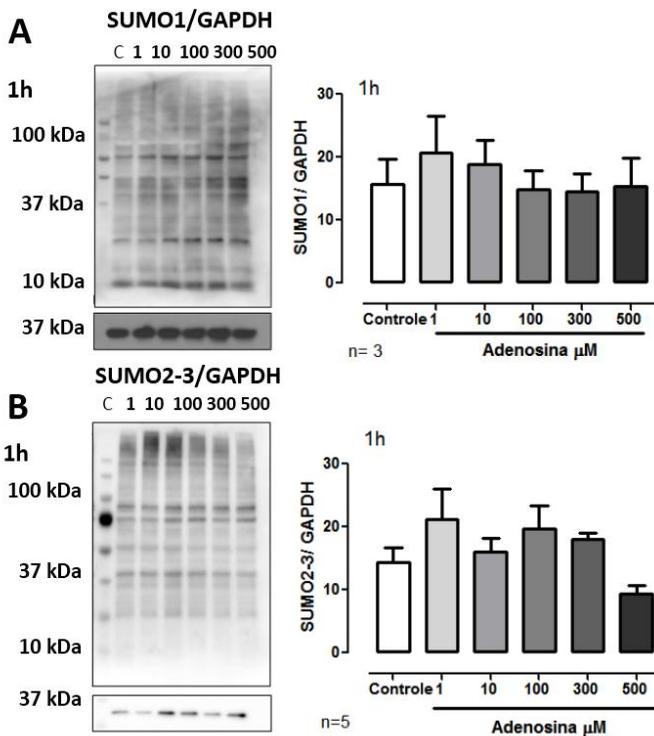
*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO2/3-ilação global de proteínas dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH, com o pré-tratamento com ZM241385 (20 min, 50 nM) antes da adição de guanosina (500  $\mu$ M - 1 h). Resultados expressos em média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ . C: Controle; G ou Guo: Guanosina; ZM: ZM241385; n: número de experimentos independentes.

#### 4.8 Efeitos da adenosina na SUMOilação global de proteínas em neurônios

Considerando a possível participação dos receptores de adenosina no efeito da guanosina, foi avaliado se a adenosina *per se*, poderia causar alterações na SUMOilação. Em neurônios tratados com

adenosina por 1 h nas mesmas concentrações utilizadas para a guanosina não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para SUMO1-ilação global de proteínas (ANOVA de uma via,  $F=0,371$ ;  $p=0,85$ ) nem para SUMO2/3-ilação global de proteínas (ANOVA de uma via,  $F=2,220$ ;  $p=0,08$ ) como pode ser observado na Figura 32A e B.

**Figura 32:** Efeito da adenosina em 1 h na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios corticais.



*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO2/3-ilação global de proteínas dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH, com as respectivas concentrações de adenosina em 1 h. **A.** SUMO1-ilação global de proteínas e em **B.** SUMO2/3-ilação global de proteínas. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA não detectou diferença entre os tratamentos. C: Controle; n: número de experimentos independentes.

Além dos resultados apresentados no presente capítulo, sobre a caracterização dos efeitos da guanosina na modulação do perfil de SUMOilação em neurônios e astrócitos corticais, também foi investigado se a guanosina apresentaria algum efeito na SUMOilação global de proteínas em células fora do SNC, esses resultados podem ser encontrados no apêndice E.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da guanosina no fenótipo de ativação astrocitária

Desde a sua descoberta em 1984 o peptídeo A $\beta$  vem sendo extremamente investigado na DA (RICCIARELLI e FEDELE, 2017). Em condições patológicas o A $\beta$  agrega formando dímeros, trímeros, protofibrilas e fibrilas que podem interagir com diferentes componentes celulares neuronais e não neuronais. Podendo promover uma série de eventos deletérios como disfunção sináptica, redução da LTP, redução na captação de glutamato neuronal. Até que gradualmente após a morte desses neurônios se atinge as manifestações cognitivas observadas na DA (PALOP; MUCKE, 2010; MUCKE; SELKOE, 2012).

A captação de glutamato é um fenômeno determinante para manter os níveis fisiológicos de glutamato no cérebro e evitar um processo denominado excitotoxicidade glutamatérgica que leva a morte neuronal. A homeostase na concentração de glutamato é mantida graças aos transportadores de aminoácidos Na<sup>+</sup> dependentes que estão presentes principalmente nos astrócitos (TROTTI; DANBOLT; VOLTERRA, 1998). Em modelos que promovam aumento de glutamato extracelular, como no caso da privação de glicose e oxigênio em fatias hipocâmpais, já foi demonstrado que a guanosina é capaz de promover o aumento na captação de glutamato via ativação de receptores BK (DAL-CIM et al., 2011). É sabido que a guanosina *per se* aumenta a captação de glutamato em fatias corticais, quando o glutamato é adicionado no meio a guanosina pode aumentar em até 52% a captação de glutamato no período de 1 h (FRIZZO et al., 2005). Também já foi observado um aumento na captação de glutamato pela guanosina em cultura primária de astrócitos corticais (FRIZZO et al., 2001; GOTTFRIED et al., 2002).

Já foi observado também em um modelo *in vivo* de hipóxia neonatal, capaz de reduzir a captação de glutamato em fatias hipocâmpais, que a guanosina previne essa redução, sugerindo que a guanosina possivelmente contribui para a manutenção fisiológica dos níveis de glutamato (MORETTO et al., 2005). Com relação aos

resultados obtidos no presente estudo o peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> em um protocolo de incubação de 48 h não promoveu alteração nos níveis de captação de glutamato para que se pudesse avaliar o efeito da guanosina. A guanosina *per se* não aumentou a captação de glutamato basal. Em investigações futuras, períodos de tempo menores poderiam ser aplicados nesse protocolo.

Os astrócitos respondem ao ambiente extracelular e isso pode ser evidenciado através da reatividade astrocitária que consiste de alterações morfológicas e também alterações funcionais, o que culmina em um aumento na expressão de GFAP. Essas características aparecem tanto na DA quanto em outras doenças do SNC, e moléculas protetoras que possam reverter ou prevenir essas características são de amplo interesse terapêutico (PEKNY; PEKNA, 2014).

Um estudo publicado por Hoppe e colaboradores (2013), demonstrou que a curcumina, um componente ativo do açafrão-da-Índia, preveniu a reatividade astrocitária causada pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> em 48 h. Também há evidências na literatura de que a guanosina (300  $\mu$ M- 24 h) é protetora contra o peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> (5  $\mu$ M) em células SH-SY5Y (PETTIFER et al., 2004). Ao investigar se a guanosina também promoveria efeitos sobre a toxicidade do peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> pode-se observar que a guanosina (100  $\mu$ M) preveniu o fenótipo de reatividade astrocitária quanto o aumento na expressão de GFAP promovido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> (2  $\mu$ M) em 48 h. Esses achados são extremamente relevantes, considerando que os astrócitos protegem os neurônios, podendo formar uma barreira importante entre os depósitos do peptídeo A $\beta$  e os neurônios (ROSSNER et al., 2005).

Outro estudo realizado em astrócitos cerebelares, revelou que o GMP ou a guanosina foram capazes de alterar a organização de proteínas como laminina e fibronectina. Neste mesmo artigo foi demonstrado que se após 24 h do tratamento com GMP ou guanosina, forem adicionados neurônios (para originar uma co-cultura), aumenta significativamente a adesão dos neurônios comparado com o grupo controle (DECKER et al., 2007). A guanosina (100  $\mu$ M) também já se mostrou glioprotetora em culturas utilizando-se astrócitos de animais idosos (180 dias) (SOUZA et al., 2016).

## 5.2 Efeitos da guanosina na SUMOilação global de proteínas em astrócitos e neurônios

Até o presente momento não foram encontrados trabalhos na literatura que discutam se a guanosina ou seus derivados possam

modular a SUMOilação de proteínas. Com base nos resultados apresentados acima, foi demonstrado pela primeira vez um efeito na SUMO2/3-ilação global de proteínas em astrócitos e neurônios promovido pela guanosina. Nos astrócitos este efeito foi observado em dois intervalos de tempo analisados, em 1 h nas concentrações de 10, 100, 300 e 500  $\mu\text{M}$  de guanosina e em 24 h na concentração de 100  $\mu\text{M}$  de guanosina. De forma interessante essa concentração de guanosina é uma das mais utilizadas em trabalhos *in vitro*, onde os efeitos protetores são geralmente observados (DAL-CIM et al., 2011; DAL-CIM 2012; SU et al., 2013; DAL-CIM 2016; THOMAZ et al., 2016). Usar um inibidor da SUMOilação, como o ácido gincólico, seria uma estratégia interessante para experimentos futuros, para investigar quais são as consequências desse aumento de SUMO2/3-ilação observado nos neurônios e astrócitos.

Nos neurônios também foi observado um aumento na SUMO2/3-ilação global de proteínas em 1 h. A partir de 6 h os níveis de SUMO2/3-ilação global de proteínas voltou aos níveis do grupo controle. Esse efeito pode estar relacionado com o aumento significativo observado no aumento de SENP3, também em 6 h, uma vez que essa enzima promove a deSUMOilação dessa isoforma. Nos neurônios também foi observado uma redução significativa na SUMO1-ilação global de proteínas em 48 h.

Como são as mesmas enzimas que conjugam a SUMO1 e a SUMO2/3, ainda não está claro como ocorre a escolha entre as isoformas para a SUMOilação. Pela carência de literatura nesse contexto até o presente momento, uma das explicações possíveis para o aumento na SUMO2/3-ilação e não na SUMO1-ilação em 1 h, poderia ser a maior disponibilidade de SUMO2/3 para ser conjugada às proteínas-alvo em relação à SUMO1. Já foi observado em células *cox7* que há cerca de 40% mais SUMO2/3 livre. Esse resultado segere pelo menos em parte, que haja uma dinâmica de conjugação diferente para as duas isoformas de SUMO, mas isso precisa ser confirmado em neurônios (SAITOH; HINCHEY, 2000; TATHAM et al., 2001; GOLEBIOWSKI et al., 2009).

É importante pontuar que alguns substratos podem ser modificados apenas por SUMO1 ou por SUMO2/3 ou ambos (VERTEGAAL et al., 2006). Nesse contexto, investigações futuras podem ter como foco uma proteína específica, e através de ensaios de co-imunoprecipitação, verificar quais alvos celulares estão sendo SUMOilados em decorrência do tratamento com a guanosina. Por exemplo, no estudo de Liu e colaboradores (2009), foi demonstrado que

durante a hipóxia e a reoxigenação, há um aumento dose-dependente na proteína kappaB-alpha na forma SUMO1-ilada em células tratadas com NECA (agonista não seletivo para os receptores de adenosina) e este efeito foi abolido pelo antagonista do receptor.

Já foi demonstrado na literatura que aumentar a SUMOilação de forma exógena poderia ter implicações neuroprotetoras. Bernstock e colaboradores (2018), realizaram um *screening* de compostos com atividade inibitória de SENP2, o que aumenta os níveis de SUMOilação e demonstraram que as moléculas identificadas, 6-tioguanina e isoprenalina, em células SH-SY5Y conseguem proteger as mesmas do protocolo de privação de oxigênio e glicose, dando mais suporte à hipótese de que o aumento dos níveis globais de SUMOilação seriam um mecanismo protetor em dano isquêmico (BERNSTOCK et al., 2018).

O aumento na SUMO2/3-ilação em 1 h poderia estar sendo causado pela guanina, uma vez que a guanosina é metabolizada a guanina. Para verificar essa possibilidade, astrócitos corticais foram tratados com guanina, nas mesmas concentrações. A maior concentração testada de guanina reduziu os níveis SUMO2/3-ilação global nos astrócitos, logo o aumento de SUMO2/3-ilação global de proteínas observado em 1 h pela guanosina é de fato um efeito da guanina. Deve-se considerar que tanto em um sistema biológico quanto nas condições experimentais empregadas as duas moléculas estão presentes uma vez que são ambas componentes endógenos e indispensáveis para muitas funções biológicas. O que ainda precisa ser avaliado é por qual via de sinalização a guanina estaria diminuindo a SUMO2/3-ilação em 1 h e aumentando a SUMO2/3-ilação em 6 h.

Em condições fisiológicas já foi demonstrado em astrócitos que a guanosina (administrada em sua forma radioativa [<sup>3</sup>H] Guo), pode ser internalizada em 15 min (GIULIANI et al., 2012). A maquinaria de SUMOilação por sua vez, também está presente no citoplasma das células. Nesse sentido, foi avaliado se o aumento observado na SUMO2/3-ilação global de proteínas promovido pela guanosina era devido a sua internalização. Ao utilizar o dipiridamol e bloquear a entrada de guanosina nos neurônios, o aumento de SUMO2/3-ilação global se manteve. Esse resultado sugere que a guanosina modula a SUMO2/3-ilação global de proteínas, via extracelular, através da modulação de um receptor de membrana.

Di Iorio e colaboradores (2004), demonstraram que a guanosina reduzia o número de células apoptóticas de um modo concentração dependente e que esse efeito não era perdido com o bloqueio dos

transportadores de nucleosídeos, demonstrando se tratar de um efeito da guanosina via extracelular. Como revisado na introdução, estudos prévios demonstraram efeitos extracelulares para a guanosina apontando como possível alvo os receptores de adenosina do tipo  $A_1$  e  $A_{2A}$ , uma vez que o bloqueio dos mesmos reduzia os efeitos observados (DAL-CIM et al., 2012).

O bloqueio do receptor  $A_1$  utilizando DPCPX (100 nM), aboliu o efeito da guanosina em promover o aumento da SUMO2/3-ilação global de proteínas e o antagonista *per se* não promoveu um efeito na SUMO2/3-ilação global de proteínas. Esse resultado sugere que a guanosina esteja aumentando a SUMO2/3-ilação global de proteínas via receptor  $A_1$ . Com a modulação do receptor  $A_{2A}$  (ZM241385) pôde-se observar que o efeito na SUMO2/3-ilação global de proteínas ocorreu com a presença de guanosina, com a presença do antagonista, mas não ocorreu quando ambos estavam presentes. Esse resultado sugere que o estado basal do receptor de adenosina pode estar modulando *per se* os níveis de SUMO2/3-ilação endógenos, o que precisa ser confirmado em experimentos futuros. O ZM241385 é classicamente descrito como um antagonista, porém, alguns trabalhos (incluindo resultados ainda não publicados do nosso grupo) sugerem que possa agir como um agonista inverso do receptor  $A_{2A}$ , podendo *per se* promover um efeito (SAFHI et al., 2010; LEBON et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2017). Contudo, não se pode descartar a possibilidade de interação farmacológica entre os dois compostos, por se tratar de um experimento *in vitro*.

Os receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  desencadeiam diferentes efetores intracelulares como descrito na introdução do presente capítulo, modulando de forma oposta os níveis de AMPc. Além disto, o receptor  $A_1$  ativa a hidrólise da fosfolipase C, e o receptor de adenosina  $A_{2A}$  ativa a cascata das proteínas MAP cinases (MAPKs) (BOREA et al., 2018). Entretanto, ainda não se sabe como essas vias de sinalização intracelular podem interagir com a maquinaria de SUMOilação da célula.

Apesar de a guanosina ter modulado a SUMO2/3-ilação de proteínas via receptores de adenosina. A adenosina em 1 h não modulou a SUMO1 e SUMO2/3-ilação global de proteínas. Não se descarta a possibilidade de que a adenosina module a SUMOilação em tempos menores. Considerando que os receptores acoplados a proteínas G, como é o caso dos receptores de adenosina, podem sofrer dessensibilização e internalização em resposta à exposição contínua ao agonista, ou ainda, promover um desacoplamento da proteína G, o que impediria uma resposta intracelular (KRUPNICK; BENOVIC, 1998; BÜNEMANN; HOSEY, 1999; SHETH et al., 2014). É possível que a

guanosina não promova dessensibilização destes receptores, uma vez que ela não é o agonista endógeno deles. Além disto, foi sugerido que a guanosina atue como um modulador alostérico dos receptores de adenosina (TASCA et al., 2018), o que necessita mais comprovação experimental. Nesse contexto, seria interessante investigar se ocorre modulação da SUMOilação pela adenosina, em minutos ao invés de 1 h. Porém, não foram realizadas investigações adicionais, pois, o foco principal dessa tese foi a guanosina.

Como apresentado na introdução, já foi demonstrado na literatura que a guanosina é capaz de modular MPTs como a fosforilação de proteínas (DI IORIO *et al.*, 2004; MOLZ et al., 2011; DAL CIM et al., 2012; SU et al., 2013). Entretanto, essa é a primeira vez em que foi demonstrado que a guanosina pode modular a SUMOilação de proteínas em astrócitos e neurônios corticais (Tabelas 3 e 4) de forma tempo e concentração dependente. O aumento na SUMO2/3-ilação em 1 h não é devido à guanina uma vez que a guanina em 1 h promove redução da SUMO2/3-ilação global de proteínas.

**Tabela 3:** Resumo dos efeitos da guanosina e da guanina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas em astrócitos corticais.

Tempo:	1 h	6 h	24 h	48 h
	= SUMO 1	= SUMO 1	= SUMO 1	= SUMO 1
Guanosina	↑ SUMO 2/3	= SUMO 2/3	↑ SUMO 2/3	= SUMO 2/3
	= SUMO 1	= SUMO 1	NA	NA
Guanina	↓ SUMO 2/3	= SUMO 2/3	= SUMO 2/3	NA

Para verificar as respectivas concentrações para cada efeito vide texto. NA: Não avaliado; = indica ausência de alteração com relação ao grupo controle, setas para cima indicam aumento, setas para baixo indicam redução da respectiva SUMOilação global. Fonte: o autor.

**Tabela 4:** Resumo dos efeitos da guanosina e da adenosina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas em neurônios corticais.

Tempo:	1 h	6 h	24 h	48 h
	= SUMO 1	= SUMO 1	= SUMO 1	↓ SUMO 1
Guanosina	↑ SUMO 2/3	= SUMO 2/3	= SUMO 2/3	= SUMO 2/3
	= SUMO 1	NA	NA	NA
Adenosina	= SUMO 2/3	NA	NA	NA

Para verificar as respectivas concentrações para cada efeito vide texto. NA: Não avaliado; = indica ausência de alteração com relação ao grupo controle, setas para cima indicam aumento, setas para baixo indicam redução da respectiva SUMOilação global. Fonte: o autor.

Em relação ao mecanismo de ação pelo qual a guanosina está promovendo o aumento na SUMO2/3-ilação de proteínas, os resultados aqui apresentados indicam que seja dependente da ativação do receptor de adenosina A<sub>1</sub>, uma vez que o uso de antagonista do receptor A<sub>1</sub> bloqueou os efeitos da guanosina. Também foi observado modulação na SUMOilação com o uso do agonista inverso dos receptores de adenosina A<sub>2A</sub>, uma vez que ZM241385 *per se* promoveu aumento na SUMO2/3-ilação ao invés de bloquear o efeito da guanosina. Este resultado sugere que os níveis endógenos do ligante para este receptor (ou seja, adenosina) podem estar controlando a SUMO2/3-ilação global de proteínas, o que precisa ser mais bem caracterizado em estudos futuros. A adenosina *per se* em 1 h não alterou os níveis de SUMO1-ilação nem os níveis de SUMO2/3-ilação global de proteínas nos neurônios corticais, entretanto não se descarta a possibilidade de a adenosina estar modulando a SUMOilação em outros tempos.

## Capítulo III - Avaliação dos efeitos da guanosina na disfunção mitocondrial

---

Este capítulo foi desenvolvido na *School of Biochemistry, Centre for Synaptic Plasticity*, Universidade de Bristol, no laboratório coordenado pelo professor Dr. Jeremy Henley (doutorado sanduíche financiado pelos programas CAPES-PDSE e Newton Fund).

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Disfunção mitocondrial

O cérebro humano tem uma alta necessidade metabólica, e é um dos órgãos que mais consomem oxigênio no corpo humano, cerca de 3,5 mL / 100g / min, o que significa que em repouso consome cerca de 20% do oxigênio total (KETY, 1957). Essa grande demanda em oxigênio e energia é em grande parte utilizada para manter as sinapses e retornar o estado de repouso da membrana após o fluxo de íons utilizado no disparo neuronal. A maioria da energia (em forma de ATP) utilizada pelo cérebro é proveniente da mitocôndria através da oxidação de substratos provenientes da glicose (MACASKILL; KITTLER, 2009).

A mitocôndria é a organela responsável pela produção de energia, tamponamento de  $Ca^{2+}$  e sinalização de apoptose, o que lhe confere extrema importância no SNC (DANIAL, KORSMEYER, 2004; SZABADKAI, DUCHEN, 2008; MACASKILL; KITTLER, 2009). Disfunções que promovam dano mitocondrial irão aumentar espécies reativas de oxigênio e promover uma redução na viabilidade celular. Portanto, uma homeostase da mitocôndria é um fator importante para a viabilidade celular e para que isso ocorra existem mecanismos responsáveis pela dinâmica mitocondrial, como por exemplo os processos de fissão e fusão mitocondrial (MICHEL et al., 2012).

Algumas toxinas, como por exemplo a rotenona, a 6-OHDA e o MPP<sup>+</sup>, causam o bloqueio do complexo I mitocondrial e são utilizadas como modelos *in vitro* de algumas patologias, como por exemplo doença de Parkinson. Essas toxinas vêm sendo utilizadas de forma aguda para avaliar disfunções mitocondriais, pois, eficientemente promovem redução de viabilidade celular, diminuição de atividade sináptica como LTP em fatias hipocâmpais, redução dos níveis de ATP intracelular entre outras disfunções (GUERRA DE SOUZA; PREDIGER; CIMAROSTI, 2016).

O termo dinâmica mitocondrial ou homeostase mitocondrial se refere aos processos de fissão, fusão, biogênese e degradação (mitofagia). Esses fenômenos são críticos para o funcionamento neuronal, uma vez que o desbalanço ou o não funcionamento adequado desses mecanismos vêm sendo correlacionados com diferentes patologias e doenças neurodegenerativas (BEAL 2007; BEREITER-HAHN; JENDRACH, 2010; LAAR; BERMAN, 2013). A dinâmica mitocondrial é um processo extremamente complexo que envolve muitas proteínas sejam elas as presentes nas membranas mitocondriais ou no citoplasma da célula. Sabe-se que o processo de fissão mitocondrial utiliza dentre outras, duas proteínas que foram investigadas nesse trabalho, uma GTPase, a Drp1, também denominada proteína relacionada a dinamina 1, que pode interagir com o fator de fissão mitocondrial (MFF, proteína ancorada na membrana mitocondrial externa) e promover a fissão (GANDRE-BABBE; VAN DER BLIEK, 2008; OSELLAME et al., 2016; MEYER; LEUTHNER; LUZ, 2017).

Na literatura é possível encontrar inúmeros trabalhos que discutem e relacionam a dinâmica mitocondrial com a SUMOilação, uma vez que diversas proteínas mitocondriais podem ser alvo da SUMO (para revisão ver GUERRA DE SOUZA; PREDIGER; CIMAROSTI, 2016). Já se sabe que a SUMOilação da proteína mitocondrial Drp1 está envolvida com processos de isquemia (GUO et al., 2013). Já foi sugerido que a SUMOilação poderia marcar proteínas mitocondriais não funcionais, e dessa forma controlar a qualidade dessas proteínas na célula (PAASCH et al., 2018).

Além da importante função da SUMOilação na dinâmica mitocondrial, a guanosina também tem efeitos protetores sobre a mitocôndria. Já foi demonstrado que a guanosina previne a disfunção mitocondrial, depleção de ATP e a geração de espécies reativas de oxigênio em fatias de estriado no modelo de 6-OHDA (modelo de disfunção mitocondrial e conseqüente dano celular, pois inibe os complexos I e IV) (GLINKA; YODIM, 1995; MARQUES et al., 2008). A guanosina previne também o estresse oxidativo mitocondrial induzido por rotenona e oligomicina em células SH-SY5Y (DAL-CIM et al., 2012). Em outros estudos, a guanosina reverteu a toxicidade induzida por MPP<sup>+</sup> em células SH-SY5Y indiferenciadas (PETTIFER et al., 2007) e protegeu fatias hipocâmpais contra a morte induzida por glutamato (MOLZ et al., 2011).

## 1.2 Justificativa

Inicialmente, foram realizados experimentos com a incubação do peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> (2  $\mu$ M por 48 h) nos neurônios corticais (14 d.i.v), porém, não foram observadas alterações nos níveis de SUMO1-ilação nem SUMO2/3-ilação para que pudesse ser testado o efeito da guanosina (dados não mostrados). Por esse motivo, foi utilizado um modelo que fosse capaz de promover uma redução na SUMOilação e também na viabilidade celular. As disfunções mitocondriais são características marcantes tanto nas doenças neurodegenerativas quanto metabólicas (SCHON; DI MAURO; HIRANO, 2012). Por esse motivo foi escolhido o uso da rotenona como modelo agudo que promove disfunção mitocondrial como diminuição na produção de ATP e perda de viabilidade celular (LITSKY et al. 1999).

Considerando que a guanosina já se mostrou protetora em diferentes protocolos utilizando fatias hipocámpais e estriatais, apontando para um possível mecanismo de ação com proteção mitocondrial (DAL-CIM 2012; MARQUES; MASSARI; TASCA, 2019; COURTES et al., 2019). O presente estudo buscou em um primeiro momento avaliar o efeito da rotenona na SUMOilação global de proteínas e na viabilidade dos neurônios corticais e posteriormente avaliar o efeito protetor da guanosina nos neurônios expostos a rotenona.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da guanosina sobre a SUMOilação de proteínas em um modelo de disfunção mitocondrial aguda induzida por rotenona.

### 2.1 Objetivos Específicos

1- Avaliar os efeitos da rotenona na SUMOilação global de proteínas e na viabilidade celular dos neurônios corticais;

2- Determinar os efeitos da guanosina sobre a viabilidade celular e SUMO2/3-ilação em neurônios incubados com rotenona;

3- Avaliar os efeitos da guanosina nos níveis das proteínas Drp1 e MFF;

4- Avaliar os efeitos da guanosina na incorporação do corante marcador de mitocôndria *mitotracker* em neurônios incubados com rotenona;

5- Investigar o efeito do *knockdown* de SENP3 na viabilidade celular e na SUMOilação em neurônios incubados com rotenona.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo Primário de Neurônios

As culturas neuronais foram preparadas seguindo o protocolo padrão descrito no capítulo II, e os neurônios foram mantidos por 14 d.i.v. para a realização dos experimentos (GUO et al., 2013).

#### 3.2 Tratamentos

As drogas adicionais utilizadas nesse estudo foram o corante *mitotracker* (Invitrogen, nº de catálogo: M7512, uso de acordo com as instruções do manual do fabricante). Meio de montagem de lâminas contendo DAPI (nº de catálogo: F6057) e a rotenona (Sigma-Aldrich, nº de catálogo: R8875). A rotenona foi inicialmente diluída em DMSO (100%) em uma solução-mãe de 3 mM, a partir dessa solução foi diluída em meio Neurobasal para obter-se a concentração de 300  $\mu$ M. A concentração de 300  $\mu$ M foi diluída novamente em meio Neurobasal para conseguir um volume pipetável para a concentração de 250 nM (ou concentrações utilizadas no estudo piloto). O tempo dos tratamentos e a concentração de rotenona foram padronizados de acordo com estudos pilotos realizados nesse trabalho (estudo piloto citado nos resultados).

O protocolo experimental de rotenona consistiu de 6 grupos experimentais: controle, rotenona (250 nM), guanosina (500  $\mu$ M) por 3 h, guanosina (500  $\mu$ M) mais rotenona por 3 h, guanosina (500  $\mu$ M) por 4 h, pré-tratamento com guanosina (500  $\mu$ M) por 1 h e posterior adição de rotenona (250 nM) por 3 h.

#### 3.3 Teste de Viabilidade Celular – MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT como descrito no capítulo II desta tese.

#### 3.4 Preparo das amostras para *Western blotting*

Após os tratamentos dos neurônios as amostras de proteínas foram preparadas como descrito previamente no capítulo II desta tese.

### 3.5 Western blotting

O protocolo de *Western blotting* encontra-se descrito no capítulo II da presente tese. Os anticorpos adicionais MFF (1:1000), Drp1 (1:1000) também foram mantidos *overnight* sob agitação a 4°C (uma tabela com os respectivos fabricantes dos anticorpos encontra-se no Anexo A).

### 3.6 Imunocitoquímica

Os neurônios foram plaqueados ( $1 \times 10^5$  células/poço) em lâminulas de vidro (previamente tratadas em ácido nítrico fumegante e poli-L-lisina (0,1 mg/mL). Após 14 d.i.v., previamente aos tratamentos foi adicionado o corante marcador mitocondrial *mitotracker* na concentração de 100 nM, e o mesmo permaneceu por 30 min antes dos tratamentos. O *mitotracker* é um corante que liga em grupos tios nas mitocôndrias de células vivas e precisa do potencial de membrana mitocondrial (CHAZOTTE, 2011). Após a incubação com rotenona e guanosina nos respectivos grupos experimentais os neurônios foram fixados com 2% de paraformaldeído na incubadora por 15 min. Após, os neurônios foram lavados com PBS 1X. Após três lavagens com PBS, os neurônios foram permeabilizados com PBS / Triton 0,1% durante 5 min e lavados novamente. Para parar o efeito do formaldeído foi adicionado glicina na concentração de 100 mM, após 5 min os neurônios foram lavados novamente. As lâminulas foram montadas sobre lâminas utilizando meio de montagem contendo DAPI. As lâminas foram trazidas da Universidade de Bristol para a UFSC e as imagens adquiridas em microscópio confocal (LCME- UFSC).

### 3.7 Infecção Neuronal com Lentivírus

Para expressão dos RNAs de interferência (shRNAs) com auxílio de vetor lentiviral pequenas sequências de *hairpins* foram clonadas no vetor pXLG3-PX-GFP-WPRE com o promotor H1. As sequências utilizadas foram: SCR19 - AATTCTCCGAACGTGTCAC; SENP3-1 – CAACAGTTTCTTCTATGATAA. As partículas lentivirais foram produzidas em células HEK293 utilizando vetores auxiliares p8.91 e pMD2.G, como descrito previamente por Rocca e colaboradores (2017). Os shRNAs foram clonados e desenvolvidos pelo Dr. Kevin Wilkinson (ROCCA et al., 2017). O meio (500  $\mu$ L) contendo as partículas virais foi adicionado nos neurônios no 9º d.i.v., para que

houvesse tempo necessário para o *knockdown* de SENP3, e os experimentos foram realizados no 14º d.i.v.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeitos da guanosina sobre a diminuição da viabilidade celular e de SUMO2/3-ilação induzida por rotenona em neurônios corticais

Para a escolha da concentração e do tempo de incubação da rotenona nos neurônios corticais foi feito um estudo piloto (1 h, 3 h, 6 h e 24 h nas concentrações de 250 nM, 500 nM e 500  $\mu$ M - dados não mostrados). O tempo de 3 h e a concentração de 250 nM foram os escolhidos por diminuírem a viabilidade celular em torno de 25% avaliada no teste de MTT e também por reduzirem a SUMO2/3-ilação global de proteínas em torno de 40%, contudo nesse tempo e nessa concentração não foi observada liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultivo dos neurônios (dados não mostrados).

A LDH é liberada no meio extracelular quando a permeabilidade da membrana já está afetada por eventos como apoptose, necrose ou outras formas de dano celular (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Foi escolhido um tempo e uma concentração de rotenona que ainda não liberasse essa enzima no meio, para que fosse possível avaliar alterações iniciais, nesse caso as duas alterações detectadas, redução de viabilidade pelo teste de MTT e redução na SUMO2/3-ilação, resultados descritos a seguir.

Pode-se observar que após a incubação com rotenona (250 nM) por 3 h houve uma redução significativa na SUMO2/3-ilação global nos neurônios (ANOVA de uma via,  $F=12,87$ ;  $p \leq 0,0001$ ) comparando-se o grupo controle ( $20,11 \pm 1,35$  DO) com a rotenona ( $11,79 \pm 1,30$  DO). Em 3 h os níveis de SUMO2/3-ilação com guanosina 500  $\mu$ M são iguais ao controle ( $22,82 \pm 2,29$  DO) e o mesmo foi observado em 4 h ( $22,79 \pm 0,86$  DO). A co-incubação ( $11,63 \pm 1,68$  DO) e o pré-tratamento ( $10,86 \pm 1,86$  DO) (1 h antes da adição de rotenona) com guanosina não alteraram os níveis de SUMO2/3-ilação global nessas condições experimentais (Figura 33A).

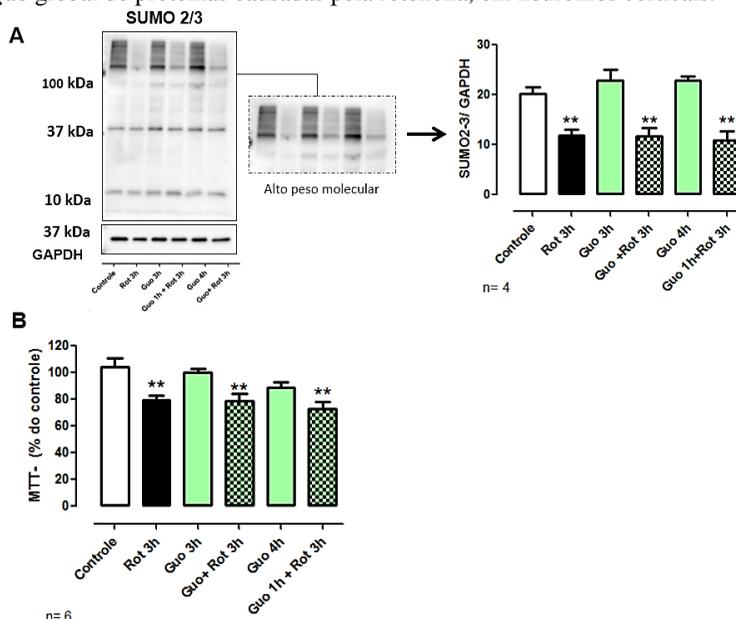
Pode-se observar na Figura 33B que a incubação com rotenona promoveu uma redução significativa na viabilidade celular avaliada pelo teste de MTT (ANOVA de uma via,  $F=7,098$ ;  $p=0,0003$ ), do grupo controle  $100\% \pm 6,61$  para  $79,49\% \pm 2,95$ . A guanosina *per se* não alterou a viabilidade dos neurônios nem em 3 h ( $100\% \pm 2,49$ ) nem em 4 h ( $88,48\% \pm 4,39$ ). A co-incubação ( $88,48\% \pm 5,12$ ) e o pré-tratamento ( $78,54\% \pm 5,46$ ) com a guanosina não foram capazes de

recuperar a perda de viabilidade causada pela rotenona observada pelo teste de MTT.

No que se refere a SUMO1-ilação global de proteínas, não foram observadas alterações em nenhum dos tratamentos empregados (ANOVA de uma via,  $F=0,9099$ ;  $p=0,4911$ ) (Figura 34).

Um segundo protocolo experimental foi realizado, onde a guanosina foi adicionada na concentração de 500  $\mu\text{M}$  por 1 h no final das 3 h com rotenona, ou seja, 1 h antes do teste de MTT para avaliar se a guanosina nessa condição recuperava a perda de viabilidade celular induzida pela rotenona (250 nM - 3 h). Nessa condição experimental, a guanosina também não foi capaz de recuperar a perda de viabilidade induzida pela rotenona (dados não mostrados).

**Figura 33:** Efeito da guanosina na redução de viabilidade celular e SUMO2/3-ilação global de proteínas causadas pela rotenona, em neurônios corticais.

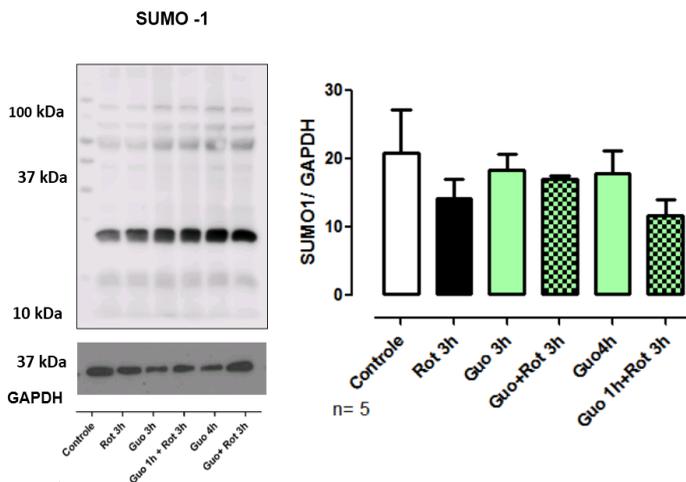


*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de **A**. SUMO2/3-ilação de proteínas de alto peso molecular dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH. **B**. Análise de viabilidade celular pelo teste de MTT. Resultados são expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de *Newman-Keuls* comparações múltiplas. \* $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$ . Guo: guanosina (500  $\mu\text{M}$ ); Rot: rotenona. Guo 1 h + Rot 3 h: pré- tratamento com guanosina por 1 h e

posterior incubação com rotenona por 3 h. n: número de experimentos independentes.

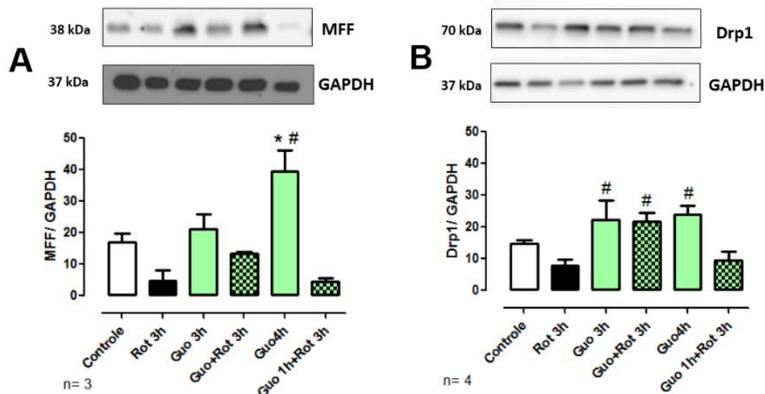
Na Figura 35 pode-se observar que o tratamento com rotenona no tempo de 3 h não alterou significativamente os níveis das proteínas MFf e Drp1. Pode-se observar ainda que a guanosina *per se* aumentou os níveis de MFf em 4 h (ANOVA de uma via,  $F=11,59$ ;  $p=0,0003$ ). Comparado com o grupo rotenona, houve um aumento na proteína Drp1 com o tratamento com guanosina em 3 condições experimentais, guanosina apenas por 3 h, guanosina com rotenona 3 h, e guanosina apenas 4 h (ANOVA de uma via,  $F= 4,447$ ;  $p=0,0082$ ).

**Figura 34:** Efeito da guanosina na SUMO1-ilação global de proteínas em neurônios corticais expostos à rotenona.



*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO1-ilação global dividida pelo controle de carregamento GAPDH. Resultados são expressos em média + erro padrão. ANOVA de uma via não detectou diferenças entre os grupos. Guo: guanosina (500  $\mu$ M), adicionada por 3 h, 4 h; Rot: rotenona. Guo 1 h + Rot 3 h: pré-tratamento com guanosina por 1 h e posterior incubação com rotenona por 3 h; n: número de experimentos independentes.

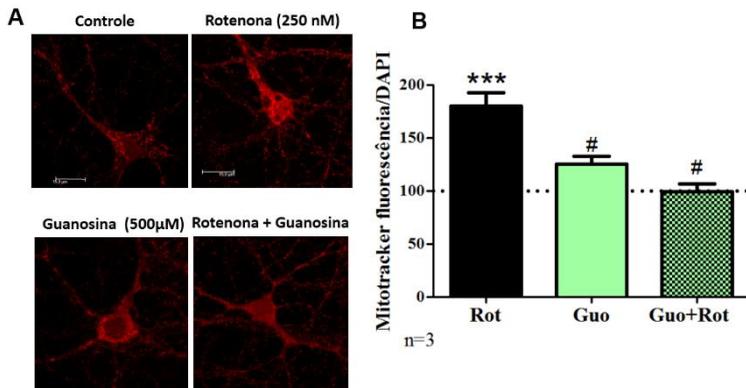
**Figura 35:** Efeitos da guanosina nos níveis de MFF e Drp1 nos neurônios corticais expostos a rotenona.



**A.** *Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de MFF dividido pelo controle de carregamento GAPDH. **B.** *Western blotting* representativo e a análise quantitativa da densidade óptica de Drp1 dividido pelo controle de carregamento GAPDH. Guo: guanosina (500  $\mu$ M), adicionada por 3 h, 4 h; Rot: rotenona. Guo 1 h + Rot 3 h: pré-tratamento com guanosina por 1 h e posterior incubação com rotenona por 3 h; MFF: fator de fissão mitocondrial, Drp1: proteína relacionada a dinamina. Análise estatística ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* Newman keuls comparações múltiplas. \* $p \leq 0,05$  com relação ao grupo controle, # $p \leq 0,05$  com relação ao grupo rotenona. n: número de experimentos independentes.

Ao analisar imagens por microscopia confocal dos neurônios incubados por 3 h com 250 nM de rotenona houve um aumento significativo na intensidade de fluorescência/DAPI quando esses neurônios são marcados com *mitotracker*. A guanosina (500  $\mu$ M) *per se* não alterou a intensidade de fluorescência/DAPI. Pode-se observar ainda que a co-incubação de guanosina com rotenona foi capaz de reverter esse aumento na intensidade de fluorescência/DAPI (ANOVA de uma via,  $F=20,97$ ;  $p=0,0004$ ) Figura 36.

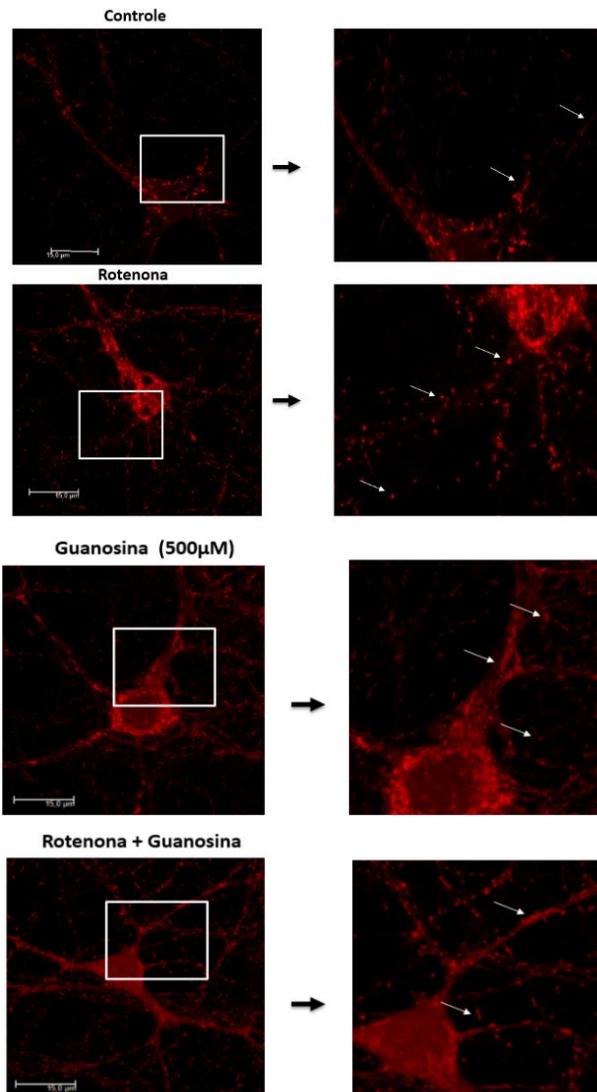
**Figura 36:** Efeito da guanosina no aumento de incorporação de *mitotracker* em neurônios corticais induzido por rotenona.



**A.** Fotomicrografias confocais de neurônios marcados com *mitotracker* com aumento de 1000x, imagens obtidas no *software LAS Af Lite*. **B.** Análise quantitativa de fluorescência pelo *software Image J*. Análise estatística ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls comparações múltiplas. \*\*\* $p \leq 0,01$  com relação ao grupo controle, # $p \leq 0,05$  com relação ao grupo rotenona. Guo: guanosina (500  $\mu\text{M}$  - 3 h); Rot: Rotenona (250 nM - 3 h). n: número de experimentos independentes.

Além das alterações na intensidade de fluorescência, a morfologia das mitocôndrias também parece alterada quando na presença de rotenona (Figura 37). Nas imagens obtidas utilizando-se o microscópio confocal, foi possível observar que as mitocôndrias após o tratamento com rotenona parecem adquirir um formato mais arredondado comparado com as mitocôndrias do grupo controle que apresentam um aspecto tubular e mais alongado.

**Figura 37:** Fotomicrografias confocais representativas da morfologia mitocondrial com marcação com *mitotracker* nos neurônios corticais.



Fotomicrografias confocais qualitativas da marcação das mitocôndrias totais com *mitotracker Far Red*. Aumento de 1000x. Setas mostram o formato das mitocôndrias nos respectivos tratamentos controle, rotenona, guanosina e rotenona + guanosina. Aumento na legenda 15 µm.

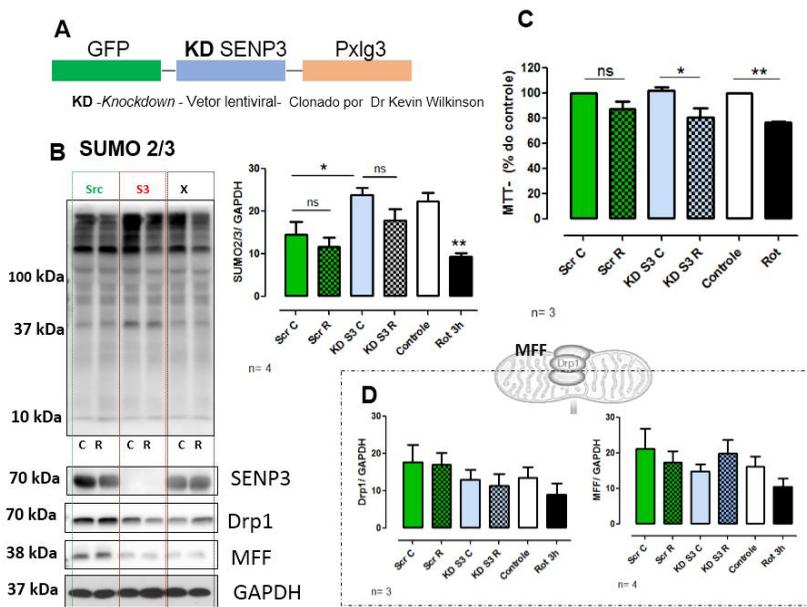
#### 4.2 Efeitos do *knockdown* da enzima SENP3 sobre a redução de viabilidade celular e SUMO2/3-ilação global de proteínas induzida por rotenona em neurônios corticais

Em seguida, foi realizado um experimento para investigar se o aumento constitutivo da SUMOilação causado pela depleção da enzima SENP3 poderia reverter os efeitos tóxicos da rotenona, nas mesmas condições do protocolo anterior. Na Figura 38B pode-se observar que a redução da enzima SENP3 foi confirmada por *Western blotting*. Conseqüentemente houve um aumento significativo nos níveis de SUMO2/3-ilação global de proteínas ( $23,93 \pm 1,65$  DO) nos neurônios SENP3 *knockdown* comparados com os neurônios contendo apenas o vetor viral (Scr) ( $14,61 \pm 2,89$  DO) (ANOVA de uma via,  $F=4,800$ ;  $p=0,02$ ).

A exposição à rotenona reduziu os níveis de SUMO2/3-ilação global de proteínas como observado no protocolo anterior nos neurônios não infectados, reproduzindo o resultado do experimento anterior (controle  $22,42 \pm 1,93$  DO; rotenona  $9,43 \pm 0,76$  DO; ANOVA de uma via,  $F=7,409$ ;  $p=0,0006$ ). Contudo a rotenona não alterou a SUMO2/3-ilação global nos neurônios que expressam o vetor viral tanto Scr quanto os neurônios *knockdown* para SENP3. Com relação aos níveis de Drp1 (ANOVA de uma via,  $F=0,9893$ ;  $p=0,4637$ ) e MFF (ANOVA de uma via,  $F=1,165$ ;  $p=0,3639$ ) não foram observadas alterações significativas.

Nos neurônios controle (Scr) a rotenona não reduziu a viabilidade de forma significativa, porém nos neurônios *knockdown* para SENP3, a rotenona diminuiu significativamente a viabilidade pelo teste de MTT (ANOVA de uma via,  $F=7,276$ ;  $p=0,0024$ ).

**Figura 38:** Efeito do knockdown de SENP3 na redução de viabilidade celular e SUMO2/3-ilação global de proteínas induzida por rotenona, e nas proteínas mitocondriais MFF e Drp1 em neurônios corticais.



**A.** Constructo lentiviral ligado com GFP - (proteína fluorescente verde) **B.** *Western blotting* representativo de SUMO2/3-ilação global, SENP3, Drp1, MFF e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO2/3-ilação global de proteínas dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH. **C.** Viabilidade celular avaliada pelo teste de MTT. **D.** Análise quantitativa da densidade óptica de Drp1 e MFF dividida pela densidade óptica do controle de carregamento GAPDH. Resultados são expressos em média + erro padrão. ANOVA de uma via *seguido* do teste *post hoc* de *Newman keuls* \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ; ns: não significativo; Src: (*scramble*); KD Neurônios infectados sem vetor porém sem nenhum *knockdown*. S3: Neurônios infectados com shRNA pra *knockdown* de SENP3. X: sem nenhum vetor viral. Drp1: proteína relacionada a dinamina 1; MFF: fator de fissão mitocondrial; n: número de experimentos independentes.

## 5 DISCUSSÃO

A rotenona é uma toxina utilizada em diferentes modelos, como por exemplo de hipóxia química (LITSKY et al.,1999) e amplamente utilizada para modelar alguns aspectos da doença de Parkinson

(SANDERS; GREENAMYRE, 2013; WRANGEL et al., 2015). A rotenona é capaz de diminuir o ATP da célula, uma vez que é um potente inibidor do complexo I mitocondrial (CHARALAMBOUS; MANGNER; KILBOURN, 1994; Figura 39A). Já foi demonstrado que as consequência da exposição à rotenona seria ativação de caspase 3, liberação de citocromo C, apoptose e aumento de espécies reativas de oxigênio (SHERER et al., 2000). Todos esses fatores podem danificar lipídios, proteínas, DNA, RNA e ao fazê-lo levar a um declínio nas funções fisiológicas (HAIGIS; YANKNER, 2010).

Estudos realizados em diferentes tipos celulares, que não o cultivo primário neuronal, encontraram resultados ao contrário dos observados no presente estudo. Em células PC12, Lin e colaboradores (2017) utilizaram 1  $\mu\text{mol/L}$  de rotenona por 24 h e observaram uma redução de SUMO1 e SUMO2/3 livre, apesar de não avaliarem SUMOilação global de proteínas. Os autores também observaram que a rifampicina (antibiótico e imunossupressor) aumentou as duas isoformas da SUMO de um modo concentração dependente. Quando as células eram pré-tratadas com rifampicina e incubadas com rotenona, tanto a SUMO1 e SUMO2/3 quanto a viabilidade celular era recuperada. Dessa forma os autores conseguiram estabelecer uma correlação positiva entre o aumento da SUMOilação e o aumento da viabilidade celular após a incubação com rotenona. Diferente do observado na presente tese, onde em neurônios corticais, a guanosina sozinha aumenta a SUMO2/3-ilação global de proteínas (em 1 h capítulo II), mas em 3 h não recuperou a redução de viabilidade celular induzida por rotenona avaliada pelo teste de MTT.

Já foi demonstrado que o pré-tratamento com rapamicina por 48 h conseguiu atenuar a liberação de citocromo C e reduziu a incorporação de *mitotracker*. Esse trabalho foi realizado em células SHSY5Y e a rotenona (10  $\mu\text{M}$  - 3 h) diminuiu a incorporação de *mitotracker* sugerindo que a rotenona em concentrações mais altas reduz o potencial de membrana (PAN et al., 2009). Diferente do observado no protocolo experimental empregado na presente tese, em que 3 h de exposição à rotenona aumentou a incorporação do marcador *mitotracker* em neurônios corticais.

O aumento de fluorescência observado nos neurônios incubados com rotenona, com a marcação do corante *mitotracker* pode estar relacionada com um aumento nos processos de fissão mitocondrial. Uma vez que já foi demonstrado na literatura que em condições de hipóxia e redução de ATP a mitocôndria tende a iniciar processos de mitofagia e sofre alterações na permeabilidade de membrana (DING e YING, 2012;

Figura 39B). A mitofagia faz parte de um processo no qual as mitocôndrias disfuncionais seriam eliminadas para proteger as mitocôndrias ainda funcionais (EL-HATTAB et al., 2018).

As mitocôndrias de células em cultivo podem passar pelos processos de fissão e fusão dentro de minutos ou até mesmo segundos (LIU et al., 2009; DALMASSO et al., 2017). Um exemplo de quão dinâmico esse processo é pode ser observado nos níveis de MFF avaliados no presente trabalho, onde o tratamento com guanosina não aumentou os níveis de MFF em 3 h, porém em 4 h foi observado um aumento significativo. O aumento observado no MFF, pode indicar que em algum momento a guanosina possa aumentar a fissão mitocondrial. Uma vez que já foi demonstrado que a superexpressão do MFF estimula o recrutamento da Drp1 para mitocôndria e isso é acompanhado de fissão mitocondrial (OTERA et al., 2010).

Ao observar os efeitos da incubação da rotenona sozinha, existe uma tendência em reduzir os níveis de MFF e a guanosina mostra o perfil contrário, uma tendência em aumentar. Na co-incubação de guanosina com rotenona por 4 h o aumento de MFF não foi mais observado. Embora a guanosina sozinha module os níveis de MFF, curiosamente a guanosina *per se* não aumenta os níveis de Drp1 com relação ao grupo controle. Foi observado aumento de Drp1 promovido pela guanosina apenas quando comparado com a exposição à rotenona. Com relação a Drp1, novamente a guanosina mostrou um perfil de modificação contrário ao da rotenona, onde a rotenona sozinha mostra uma tendência em reduzir os níveis de Drp1 e a guanosina aumenta a Drp-1 na co-incubação de guanosina com rotenona em 3 h. O fato de a literatura ainda não ter mostrado que a guanosina modula MFF e Drp1, dificulta uma discussão de qual a consequência desses resultados.

Guo e colaboradores (2013) demonstraram em neurônios que no modelo de privação de glicose e oxigênio, a SENP3 é degradada, prolongando a SUMOilação da Drp1 o que a mantém no citoplasma. No período de reoxigenação ocorre a recuperação da SENP3 o que resulta em de-SUMOilação da Drp1. Também já foi demonstrado que SUMOilação da Drp1 impede sua interação com o MFF (GUO et al., 2017). Nesse sentido, um efeito que pode ser investigado em trabalhos futuros seria, se o aumento de SUMO2/3-ilação global promovido pela guanosina, poderia estar SUMOilando a proteína Drp1 e dessa forma contribuindo para os efeitos protetores da guanosina no modelo de privação de glicose e oxigênio.

Sabe-se que a Drp1 e o MFF são fatores relacionados com a fissão mitocondrial, porém aumentar o nível dessas duas proteínas não

implica diretamente no fato de haver mais processos de fissão, uma vez que a Drp1 é uma proteína citoplasmática e precisa ser recrutada para a mitocôndria para que haja fissão (OSELLAME et al., 2016). Vale ressaltar ainda, que não apenas o MFF, mas outros receptores (como por exemplo as proteínas de dinâmica mitocondrial de 49 e 51 kDa, conhecidas como MiD49 e MiD51) também podem mediar o recrutamento da Drp1 para a mitocôndria e promover a fissão mitocondrial (LOSÓN et al., 2013). Aumentar o processo de fissão de uma forma rápida pode servir como um mecanismo protetor por permitir a degradação de mitocôndrias. Aumentar a fissão também resulta em redução da fosforilação oxidativa, o que pode proteger a célula se o dano utilizado envolve geração de espécies reativas de oxigênio como é o caso do protocolo empregado com rotenona (MEYER; LEUTHNER; LUZ, 2017).

Já foi demonstrado na literatura que a deSUMOilação (por SUMO2/3) da Drp1 faz com que ela interaja com o MFF, aumentando os processos de fissão mitocondrial. O oposto é verdadeiro, onde o aumento da SUMO2/3ilação da Drp1 previne a interação Drp1-MFF reduzindo a fissão mitocondrial. Apesar de a Drp1 poder ser SUMOilada por ambas SUMO1 e SUMO2-3 (HARDER; ZUNINO; MCBRIDE, 2004; GUO; HENLEY, 2014), a SUMO1-ilação da Drp1 parece não estar envolvida com a interação da Drp1-MFF (GUO et al., 2017) mas pode prevenir a degradação da Drp1 (HARDER; ZUNINO; MCBRIDE, 2004). Esses achados da literatura, juntamente com os achados do capítulo II, onde a guanosina *per se* aumenta a SUMO2/3-ilação global de proteínas, sugerem de forma indireta que a Drp1 pode estar retida no citoplasma reduzindo os mecanismos de fissão. Isso pode ser observado no resultado encontrado no capítulo III, onde a rotenona sozinha por 3 h aumenta a incorporação do corante *mitotracker*. Que pode ser explicado pelo aumento de fluorescência sugerindo aumento de fissão. Na co-incubação com guanosina esse aumento não foi observado.

Na literatura já foi descrito efeito protetor da guanosina no protocolo de rotenona, em uma cultura mista de neurônios e astrócitos, por Litsky e colaboradores (1999). Nesse estudo os autores observaram que o efeito da guanosina era abolido na presença de um inibidor da enzima PNP (enzima que degrada a guanosina à guanina). Os autores sugeriram então que o efeito protetor da guanosina dependia da presença de glia uma vez que a PNP estaria ausente em neurônios (CASTELLANO et al., 1990; CEBALLOS; TUTTLE; RUBIO, 1994). Esses achados da literatura podem explicar o motivo pelo qual a guanosina não recuperou a viabilidade celular no modelo de rotenona

observada no presente trabalho, por se tratar de um modelo realizado em culturas neuronais com uma quantidade de células da glia insuficiente (em torno de 10 %) para promover os mesmos efeitos observados no trabalho de Litsky e colaboradores (1999). O que dá mais suporte a essa hipótese, é o fato de que em células SHSY5Y, já foi observado que a guanosina protegeu contra a perda de viabilidade celular induzida por rotenona e oligomicina (DAL-CIM et al., 2012), adicionalmente é descrito na literatura que as células SHSY5Y expressam PNP (ZUCCARINI et al., 2018).

Nesse sentido, um experimento interessante para investigações futuras, seria utilizar o protocolo de rotenona em fatias hipocâmpais ou corticais, ou co-culturas de astrócitos e neurônios e verificar se na presença de astrócitos a guanosina poderia promover proteção contra a rotenona, ou seja, recuperar a viabilidade celular. Não se descarta a possibilidade de que no protocolo de 3 h, a guanosina possa vir a recuperar a viabilidade se testada em um período de tempo maior, como visto por Litsky e colaboradores (1999), que observaram os efeitos da guanosina na viabilidade celular 7 h depois da adição de rotenona. Outro estudo que também dá suporte a essa hipótese da necessidade de células gliais, é o de Jurkowitz e colaboradores (1998) que observaram que adenosina, inosina e a guanosina previnem a perda de viabilidade celular em células gliais tratadas com amobarbital (inibidor do complexo 1 mitocondrial).

Com relação aos níveis de SUMO2/3-ilação global de proteínas no protocolo de 3 h com rotenona mais guanosina, não foi observado aumento, possivelmente porque os níveis de SUMO2/3 retornaram aos níveis do controle. Porém, quando o protocolo de rotenona 3 h e guanosina 1 h no final foi empregado e também não foi observado recuperação nos níveis de SUMO2/3-ilação global de proteínas, pode-se discutir esse resultado com base em dados já publicados que demonstram que eventos de hipóxia promovem internalização dos receptores A<sub>1</sub> de adenosina (COELHO et al., 2006). Uma vez que foi demonstrado nessa tese que o aumento de SUMO2/3-ilação de proteínas é via esses receptores, uma vez internalizados, não haveria a possibilidade de recuperar os níveis de SUMO2/3-ilação. Adicionalmente, a rotenona promove uma redução dos níveis de ATP das células (KANG et al., 2012). Considerando que a SUMOilação precisa de ATP para acontecer, isso também pode explicar o resultado obtido. Contudo não se pode afirmar que a SUMOilação aumenta apenas via receptores A<sub>1</sub>, mas esse mecanismo pode explicar os resultados obtidos no protocolo com a rotenona.

Existem estudos na literatura que comprovam tanto os efeitos protetores da guanosina quanto os efeitos protetores da SUMOilação. Entretanto, seja por uma questão experimental, ou até mesmo pelo tipo de metodologias empregadas, num primeiro momento não foi possível relacionar de forma direta e experimental que o aumento de SUMOilação causado pela guanosina seja crucial para que ela exerça neuroproteção, isso precisa ser confirmado em experimentos futuros.

Segundo Marques e colaboradores (2008) a guanosina preveniu disfunção mitocondrial, em fatias de estriado incubadas com 6-OHDA. É interessante pontuar que apesar da 6-OHDA também inibir o complexo I mitocondrial, os testes realizados pelo autor, além do teste de MTT, conseguiram detectar melhor os efeitos da guanosina.

Em outros tipos celulares a guanosina mostrou-se protetora contra o estresse oxidativo mitocondrial, induzido por rotenona e oligomicina em células SH-SY5Y, diminuindo a produção de radicais livres e aboliu a morte celular. O bloqueio da via PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  aboliu o efeito neuroprotetor da guanosina. A guanosina também induziu a expressão de uma importante enzima antioxidante, a heme oxigenase-1 (DAL-CIM et al., 2012). Em outras investigações a guanosina (100  $\mu$ M) reverteu a toxicidade induzida por MPP<sup>+</sup> (500  $\mu$ M) em células SH-SY5Y indiferenciadas (PETTIFER et al., 2007). Em fatias hipocâmpais, a adição de guanosina (100  $\mu$ M) protegeu as fatias hipocâmpais da morte induzida por glutamato e também inibiu a ativação de enzima óxido nítrico sintase induzível (MOLZ et al., 2011). No entanto nos neurônios, a guanosina na concentração empregada, não recuperou a perda de viabilidade celular provocada pela rotenona em um protocolo de 3 h.

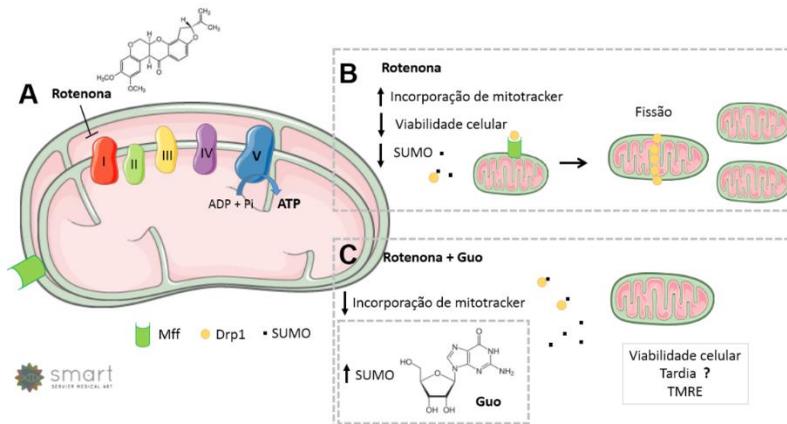
Quanto à morfologia das mitocôndrias investigações futuras seriam interessantes, contudo uma análise através de microscopia eletrônica de transmissão seria o mais adequado para adquirir resultados robustos. Considerando que com aumento das fotos através da microscopia confocal não foi possível definir onde é o começo e o final de cada mitocôndria. Nesse sentido, foram apresentadas na presente tese apenas imagens qualitativas, em que se pode observar em algumas mitocôndrias uma morfologia arredondada após o tratamento com a rotenona. Um estudo realizado em uma linhagem de neurônio dopaminérgica (células MN9D) utilizando incubação de 10 nM de rotenona por 24 h, foi observado que nessa concentração e nesse tempo as células ainda tinham a membrana da célula intacta (medido pela incorporação de iodeto de propídio). Observações por microscopia eletrônica nesse mesmo estudo, revelaram que as mitocôndrias

apresentavam alterações morfológicas com formato arredondado e inchadas e que em 36 h já era observado perda da integridade da membrana da célula (KANG et al., 2012).

Com relação aos resultados obtidos na presente tese, com relação à exposição de neurônios corticais à rotenona podem-se levantar algumas considerações. Primeiro, o protocolo da rotenona pode ter sido muito robusto para ser realizado em cultivo de neurônios tendo em vista que a maioria dos estudos utilizam outras células como modelo experimental (PC12, SH5YSY). Com relação ao tempo avaliado pode ter sido muito curto (3 h), por isso não se descarta a possibilidade de que a guanosina melhore a viabilidade celular em neurônios, porém, tempos mais longos (24 h, por exemplo) precisam ser avaliados em experimentos futuros (Figura 39C). O protocolo da rotenona mimetiza algumas condições observadas na isquemia como, por exemplo, a redução de ATP na célula. Porém, diferente do modelo clássico para o estudo da isquemia *in vitro*, o modelo de privação de glicose e oxigênio (TASCA; DAL-CIM; CIMAROSTI, 2015) a rotenona não permite uma fase de reperfusão. Resultados publicados (DAL-CIM et al., 2011) e não publicados do nosso grupo, sugerem que a guanosina tenha efeito quando adicionada na fase de reoxigenação/reperfusão no modelo de isquemia *in vitro*. Nesse contexto, um protocolo de privação de glicose e oxigênio em células neuronais parece mais ameno e os efeitos protetores da guanosina poderiam ter sido observados.

Tendo em consideração os resultados obtidos no teste de viabilidade celular realizado nos neurônios com expressão lentiviral, existe a possibilidade de haver uma maior proliferação de astrócitos, pois, o meio de cultura do lentivírus contém soro que é adicionado e mantido por 5 dias até que o experimento seja realizado. Se houver mais astrócitos, já foi demonstrado na literatura que a adição de astrócitos na cultura de neurônios é *per se* um fator protetor contra rotenona (RATHINAM et al., 2012; LIU et al., 2018). Entretanto, nos neurônios *knockdown* para SENP3 foi observado queda da viabilidade celular, fato este que vai contra à nossa hipótese inicial e com dados da literatura (GUO et al., 2013). Esse resultado pode ser atribuído ao fato de se tratar de um modelo diferente e um tempo diferente do avaliado por Guo e colaboradores (2013). Ainda, pelo fato de a SUMOilação ser um processo dinâmico, a falta de SENP3 pode acarretar um prejuízo tanto na maturação de novas isoformas da SUMO2/3, quanto na falta de deSUMO2/3-ilação, o que pode implicar na redução da viabilidade celular observada no tempo de 3 h.

**Figura 39:** Representação esquemática dos possíveis efeitos da guanosina no protocolo com rotenona.



**A.** Mitocôndria e os complexos I, II, II, IV e V, mostrando que a rotenona promove inibição do complexo I. **B.** Os efeitos observados com a incubação de rotenona 250 nM por 3 h foram um aumento na incorporação do corante *mitotracker*, uma redução de ambas SUMOilação e viabilidade celular, esses eventos podem estar promovendo mais fissão mitocondrial. **C.** Os efeitos observados com a co-incubação de guanosina (500  $\mu$ M) e rotenona por 3 horas diminuíram a incorporação do corante *mitotracker* o que pode indicar menos fissão, uma vez que a guanosina tem como mecanismo aumentar a SUMOilação, o que manteria a proteína Drp1 no citoplasma. Sugestão de experimentos futuros: utilizar TMRE (éster etil tetrametilrodamina), uma sonda que mede potencial de membrana e verificar a viabilidade celular em tempos maiores que 3 h. Drp1 (proteína relacionada a dinamina 1); MFF (fator de fissão mitocondrial). Fonte: o autor.

## DISCUSSÃO GERAL

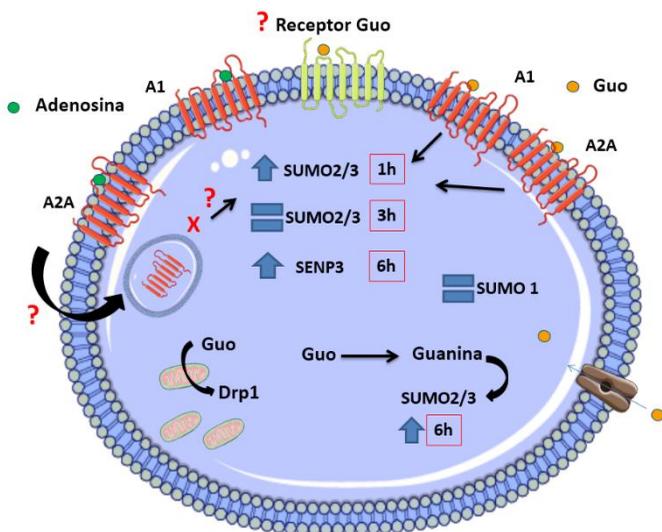
Durante as duas últimas décadas de estudo da SUMOilação, tem se tornado cada vez mais consenso na literatura que a SUMOilação apresenta um papel fundamental tanto na homeostase celular quanto em processos patológicos (para revisão ver ENSERINK, 2015). Nesse contexto, é sabido que as duas isoformas, SUMO1 e SUMO2/3, estão longe de serem diferentes apenas pelo fato de 3 aminoácidos variarem de uma isoforma para outra, mas que também respondem de maneiras diferentes ao estresse (SAITOH; HINCHEY, 2000; BOSSIS; MELCHIOR, 2006; WILKINSON et al., 2010). Por exemplo, um experimento realizado em células COS-7, após o estresse de choque

térmico (43° C) houve aumento na conjugação de SUMO2/3 e a conjugação de SUMO1 pareceu não ser afetada (SAITOH; HINCHEY, 2000). Esse efeito de aumento de SUMO2/3 pode ser em parte atribuído pela sensibilidade das SENPS ao calor, demonstrado em estudo posterior (PINTO et al., 2012). Outro exemplo clássico em relação à resposta ao estresse é o aumento na SUMOilação observado na isquemia, o qual já foi demonstrado como imprescindível para que haja neuroproteção *in vitro* e *in vivo*, pois, ao fazer o *knockdown* das 3 isoformas da SUMO, tem um efeito negativo na função neurológica pós isquêmica (CIMAROSTI et al., 2008; CIMAROSTI et al., 2012; LEE et al., 2009; DATWYLER et al., 2011; GUO et al; 2013; ZHANG et al., 2017).

A literatura já sugere em diferentes abordagens que a guanosina atue na fosforilação de proteínas (DI IORIO et al., 2004; MOLZ et al., 2011; DAL CIM et al., 2012; SU et al., 2013). No presente trabalho foi demonstrado pela primeira vez que a guanosina pode modular a SUMOilação global de proteínas *in vivo* e *in vitro*, e o mecanismo pelo qual ela o faz envolve os receptores de adenosina (Figura 40).

Já foi demonstrado e sugerido na literatura que os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>1</sub> podem controlar prejuízo de memória em camundongos adultos (PAGNUSSAT et al., 2015). Ao utilizar inibição farmacológica do receptor A<sub>2A</sub> já foi observado uma restauração na plasticidade sináptica nos neurônios e uma reversão no déficits de memória no modelo animal APP/PS1. Os autores sugerem que antagonistas do receptor A<sub>2A</sub> seriam uma alternativa terapêutica interessante de se investigar em pacientes no estágio inicial da DA (VIANA DA SILVA et al., 2016). Uma vez que foi observado que os efeitos *in vitro* da guanosina afetam a SUMOilação via receptores de adenosina, esse passa a ser um mecanismo interessante para ser investigado, principalmente na linhagem C57BL/6 que apresentou melhoras cognitivas com o tratamento com guanosina. Considerando a relevância dos receptores de adenosina, da SUMOilação e da guanosina como moléculas endógenas neuroprotetoras tanto no contexto do envelhecimento quanto da DA os resultados desta tese abrem portas para inúmeras investigações futuras.

**Figura 40:** Resumo dos resultados obtidos na abordagem experimental *in vitro* relacionados ao aumento na SUMOilação global de proteínas e seu mecanismo de ação.



A guanosina promoveu aumento de SUMO2/3-ilação global de proteínas em 1 h. Em 3 h esse aumento volta aos níveis de controle. A enzima SENP3 aumenta em 6 h. A guanina promove redução da SUMO2/3-ilação global de proteínas em 1 h e aumento na SUMO2/3-ilação global de proteínas em 6 h na concentração mais alta empregada. Os efeitos da guanosina sobre mecanismos mitocondriais e os efeitos da adenosina na SUMOilação precisam ser melhores investigados.

## CONCLUSÕES

- 1) A guanosina melhorou a memória espacial dos camundongos jovens, conforme avaliado pelo teste de realocação de objetos, e melhorou a memória de trabalho dos camundongos idosos, conforme avaliado pelo teste de labirinto em Y;
- 2) O tratamento com guanosina por 14 dias aumentou a SUMO1-ilação global de proteínas no hipocampo de camundongos C57BL/6 jovens (3 meses) e idosos (24 meses);
- 3) A guanosina preveniu a reatividade astrocitária e o aumento no imunoconteúdo de GFAP causados pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>;
- 4) A guanosina aumentou a SUMO2/3-ilação global de proteínas *in vitro*, em astrócitos e neurônios corticais, após 1 h de tratamento.
- 5) O efeito observado é um efeito *per se* da guanosina, uma vez que a guanina não aumentou a SUMO2/3-ilação em 1 h;
- 6) Em astrócitos corticais a guanina (500  $\mu$ M) reduziu a SUMO2/3-ilação global de proteínas em 1 h e aumentou em 6 h;
- 7) O mecanismo pelo qual a guanosina aumentou a SUMO2/3-ilação global de proteínas em 1 h é extracelular e envolve os receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>;
- 8) No protocolo de disfunção mitocondrial induzido por rotenona a guanosina não foi capaz de recuperar a SUMO2/3-ilação global de proteínas, nem a perda de viabilidade neuronal causada pela rotenona em 3 h, mas reduziu a incorporação do corante *mitotracker* causada pela rotenona;
- 9) O *knockdown* de SENP3, embora tenha sido capaz de recuperar a SUMO2/3-ilação global de proteínas, não foi capaz de recuperar a perda de viabilidade neuronal causada pela rotenona em 3 h.

## REFERÊNCIAS

- AGNATI, L. F. et al. New methods to evaluate colocalization of fluorophores in immunocytochemical preparations as exemplified by a study on A2A and D2 receptors in Chinese hamster ovary cells. **J Hist Cytoc**, v. 53, n. 8, p. 941-953, 2005.
- ANDERSON, D. B. et al. Sumoylation: Implications for neurodegenerative diseases. **Adv Exp Med Biol**, v. 963, p. 261-281, 2017.
- ANDREOU, A. M.; TAVERNARAKIS, N. Roles for SUMO modification during senescence. **Adv Exp Med Biol**, v. 694 p.160–171, 2010.
- AKAR, C.A.; FEINSTEIN, D. L.; Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by sumoylation. **J of Neuroinflam**, v. 6, n.12, p. 1-10, 2009.
- ALMEIDA, R. F. et al. Guanosine anxiolytic-like effect involves adenosinergic and glutamatergic Neurotransmitter Systems. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 1, p. 423-436, 2017.
- ALVARENGA, D.; BRITO, C. 1 em cada 4 brasileiros terá mais de 65 anos em 2060, aponta IBGE. 25/07/2018 <Disponível em <https://g1.globo.com/economia/noticia/2018/07/25/1-em-cada-4-brasileiros-tera-mais-de-65-anos-em-2060-aponta-ibge.ghtml>.> Acesso em 28/04/2019.
- ALONSO-ANDRÉS, P. et al. Purine-related metabolites and their converting enzymes are altered in frontal, parietal and temporal cortex at early stages of Alzheimer's disease pathology. **Brain Pathol**, v. 28, n. 6, p. 933-946, 2018.
- ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behav Brain Res**, v. 204, n. 1, p. 206-211, 2009.
- BAILEY, D.; O'HARE, P. Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 1, p. 692-703, Jan 2004.
- BALLARD, C. et al. Alzheimer's disease. Review. **Lanc**, 1019–1031, 2011.
- BARRETO, G.; HUANG, T. T.; GIFFARD, R. G. Age-related defects in sensorimotor activity, spatial learning, and memory in C57BL/6 mice. **J Neurosurg Anesthesiol**, v. 22, n. 3, 214-219, 2010.
- BENCATH, K. P. et al. Identification of a multifunctional binding site on Ubc9p required for Smt3p conjugation. **J Biol Chem**, v. 277, n. 49, p. 47938-45, 2002.

- BERNSTOCK, J. D. et al. Quantitative high-throughput screening identifies cytoprotective molecules that enhance SUMO conjugation via the inhibition of SUMO-specific protease (SENP)2. **FASEB J**, v. 32, n. 3, p. 1677-1691, 2018.
- BEAL, M.F. Mitochondria and neurodegeneration. **Nov Found Symp**, v. 287, p. 183-192, 2007.
- BEREITER-HAHN, J.; JENDRACH, M. Mitochondrial dynamics. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 284, p. 1-65, 2010.
- BELICZA, M. Evaluation of morphologically determined apoptotic index. **Acta Med Croatica**, v. 63, p. 3-12, 2009.
- BENARD, G. et al. Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1797, p. 698-709, 2010.
- BETTIO, L. E. et al. The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation. **Eur J Neurosci**, v. 43, n. 8, p. 1006-1015, 2016.
- BETTIO, L. E.; GIL-MOHAPEL, J.; RODRIGUES, A. L. Guanosine and its role in neuropathologies. **Purin Signal**, v. 12, n. 3, p. 411-426, 2016.
- BJORKLUND, O. et al. Adenosine A(1) and A(3) receptors protect astrocytes from hypoxic damage. **Eur J of Pharmac**, v. 596, p. 6-13, 2008.
- BICCA, M. A. et al. B<sub>2</sub> receptor blockage prevents A $\beta$ -induced cognitive impairment by neuroinflammation inhibition. **Behav Bra Res**, v. 278, p. 482-491, 2015.
- BOECK, C. R. et al. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. **Epilep**, v. 45, n. 7, p. 745-750, 2004.
- BOHREN, K. M. et al. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. **J Biol Chem**, v. 279, n. 26, p. 27233-8, 2004.
- BOREA, P. A. et al. Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. **Physiol Rev**, v. 98, n. 3, p. 1591-1625, 2018.
- BOSSIS, G.; MELCHIOR, F. SUMO: regulating the regulator. **Cell Div**, v. 1, p. 13, 2006.

BÜNEMANN, M.; HOSEY, M. M. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. **J Physiol**, v. 517, p. 5–23, 1999.

BYLEBYL, G. R.; BELICHENKO, I.; JOHNSON, E. S. The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. **J Biol Chem**, v. 278, n. 45, p. 44113-44120, 2003.

CASELLI, R.J. et al. Alzheimer's disease a century later. **J Clin Psychiatry**, v.67, n.11, p. 1784-800, 2006.

CHARALAMBOUS, A.; MANGNER, T. J.; KILBOURN, M. R. Synthesis of (2-[<sup>11</sup>C]methoxy)rotenone, a marker of mitochondrial complex I activity. **Nucl Med Biol**, v. 22, n. 1, p. 65-69, 1995.

CHAZOTTE, B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 8, p. 990-992, 2011.

CICCARELLI, R. et al. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **Int J Dev Neurosci**, v. 19, n. 4, p. 395-414, 2001.

CICCARELLI, R. et al. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. **Glia**, v. 25, n. 1, p. 93-8, 1999.

CIMAROSTI, H. et al. Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2012.

CIMAROSTI, H.; HENLEY, J. M. Investigating the mechanisms underlying neuronal death in ischemia using in vitro oxygen-glucose deprivation: potential involvement of protein SUMOylation. **Neuroscientist**, v. 14, n. 6, p. 626-636, 2008.

CIMAROSTI, H. et al. Increased protein SUMOylation following focal cerebral ischemia. **Neuropharmacol**, v. 54, n. 2, p. 280-289, 2008.

COELHO, J. E, et al. Hypoxia-induced desensitization and internalization of adenosine A1 receptors in the rat hippocampus. **Neurosci**, v. 138, n. 4, p. 1195-1203, 2006.

COURTES, A. A. et al. Guanosine protects against Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial dysfunction in rats. **Biomed Pharmacother**, v. 111, p. 1438-1446, 2019.

CONSTANTINO, L. C. et al. Adenosine A<sub>1</sub> receptor activation modulates N-methyl-d-aspartate (NMDA) preconditioning phenotype in the brain. **Behav Bra Res**, v. 282, p. 103-110, 2015.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C., In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. **Mol Psychiatry**, v. 9, p. 326–357, 2004.

CRYAN, J. F. MOMBÉREAU, C, VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci and Biobehav Rev**, v, 29, p. 571–625, 2005.

CHO, S. J. et al. Plasma SUMO1 Protein is elevated in Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 47, n. 3, p. 639-643, 2015.

CHOW, V. W. An Overview of APP Processing Enzymes and Products. **Neuromol Med**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2010.

D'ANDREA, M. R. et al. Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. **Histopat**, v. 38, n. 2, p. 120-134, 2001.

DAL-CIM, T. et al. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neurosci**, v. 183, p. 212-220, 2011.

DAL-CIM, T. et al. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. **Neurochem Int**, v. 61, n. 3, p. 397-404, 2012.

DAL-CIM, T. Mecanismos de neuroproteção da guanosina contra a eurotoxicidade induzida por isquemia e dano oxidativo mitocondrial in vitro. **Tese de doutorado**, UFSC, p. 1-182, 2012.

DAL-CIM, T. et al. Neuroprotection promoted by guanosine depends on glutamine synthetase and glutamate transporters activity in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. **Neurotox Res**, v. 29, n. 4, p. 460-468, 2016.

DALMASSO, G. et al. Agent-Based Modeling of Mitochondria Links Sub-Cellular Dynamics to Cellular Homeostasis and Heterogeneity. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1-33, 2017.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v.116, p. 205–219, 2004.

DATWYLER, A. L. et al. SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 11, p. 2152-2159, 2011.

DE OLIVEIRA, D. L. et al. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. **Brain Res**, v. 1018, n. 1, p. 48-54, 2004.

DECKER, H. et al. Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 9, p. 1943-1951, 2007.

DESTERRO, J. M.; THOMSON, J.; HAY, R. T. Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. **FEBS Lett**, v. 417, n. 3, p. 297-300, 1997.

DI IORIO, P. et al. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. **Glia**, v. 46, n. 4, p. 356-368, 2004.

DI LIBERTO, V. et al. The guanine-based purinergic system: The tale of an orphan neuromodulation. **Front Pharmacol**, v. 7, n.158, p. 1-15, 2016.

DE LERA RUIZ, M.; LIM, Y. H.; ZHENG, J. Adenosine A2A receptor as a drug discovery target. **J Med Chem**, v. 57: p. 3623–3650, 2014.

DING, W. X.; YIN, X. M. MITOPHAGY: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. **Biol Chem. Biol Chem**, v. 393, n. 7, p. 547–564. 2012.

DOBRACHINSKI, F. et al. Regulation of mitochondrial function and glutamatergic system are the target of guanosine effect in traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 34, n. 7, p. 1318-1328, 2017.

DORVAL, V.; FRASER, P. E. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. **J Biol Chem**, v. 281, n. 15, p. 9919-9924, 2006.

DROESCHER, M.; CHAUGULE, V. K.; PICHLER, A. SUMO rules: Regulatory concepts and their implication in neurologic functions. **Neuromolec Med**, v. 15, n. 4, p. 639-660, 2013.

DUNWIDDIE, T. V.; FREDHOLM, B. B. Adenosine A1 receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize

pyramidal neurons in rat hippocampus. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 249, n. 1, p. 31-37, 1989.

EL-HATTAB, A.W. et al. Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. **Mol Genet Metab**, v. 125, n. 4, p. 315-321, 2018.

ENSERINK, J. M. SUMO and the cellular stress response. **Cell Div**, v. 10, n. 4, p. 1-13, 2015.

EVDOKIMOV, E. et al. Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. **J Cell Sci**, v. 121, n. 24, p. 4106-4113, 2008.

FELIGIONI, M.; NISHIMUNE, A.; HENLEY, J. M. Protein SUMOylation modulates calcium influx and glutamate release from presynaptic terminals. **Eur J Neurosci**, v. 29, n. 7, p. 1348-1356, 2009.

FICULLE, E. et al. Aging-related SUMOylation pattern in the cortex and blood plasma of wild type mice. **Neurosc Lett**, v. 668, p. 48–54, 2018.

FLETCHER-JONES, A. et al. The C-terminal helix 9 motif in rat cannabinoid receptor type 1 regulates axonal trafficking and surface expression. **E Life**, p. 1-26, 2019.

FLURKEY, K.; CURRER, J. M.; HARRISON, D. E. The mouse in biomedical research.' in James G. Fox (ed.), American College of Laboratory Animal Medicine series. **Elsevier**, 2007.

FRANCO, R. et al. Partners for adenosine A1 receptors. **J Mol Neurosci**, v. 26, n. 2-3, p. 221-232, 2005.

FREDHOLM, B. B. et al. Nomenclature and classification of adenosine receptors. International union of pharmacology. XXV. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p. 527-552, 2001.

FREDHOLM, B. B. et al. Adenosine and brain function. **Int Rev Neurobiol**, v. 63, p. 191-270, 2005.

FREDHOLM, B.B. et al. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 1, p. 1-34, 2011.

FRIZZO, M. E., et al. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. **NeuroReport**, v. 12, p. 879– 881, 2001.

FRIZZO, M. E. et al. Guanosine enhances glutamate transport capacity in brain cortical slices. **Cell and Mol Neurob**, v. 25, n. 5, 2005.

FUKUDA, I. et al. Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate. **Chem Biol**, v. 16, n. 2, p. 133-140, 2009.

GALTS, C. P. C. et al. Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options. **Neurosc Biobehav Rev**, v. 102, p. 56-84, 2019.

GANDRE-BABBE, S.; VAN DER BLIEK, A. M. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. **Mol Biol Cell**, v. 19, n. 6, p.2402-2412, 2008.

GEISS-FRIEDLANDER, R.; MELCHIOR, F. Concepts in sumoylation: a decade on. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 947-956, 2007.

GEOFFROY, M. C.; HAY, R. T. An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 8, p. 564-568, 2009.

GERBATIN, R. D. R. et al. Guanosine Protects Against Traumatic Brain Injury-Induced Functional Impairments and Neuronal Loss by Modulating Excitotoxicity, Mitochondrial Dysfunction, and Inflammation. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 10, p. 7585-7596, 2016.

GERBATIN, R. R. et al. A<sub>1</sub> rather than A<sub>2A</sub> adenosine receptor as a possible target of Guanosine effects on mitochondrial dysfunction following Traumatic Brain Injury in rats. **Neurosci Lett**. v. 8, n. 704, p. 141-144, 2019.

GILL, G. Something about SUMO inhibits transcription. **Curr Opin Genet Dev**, v. 15, n. 5, p. 536-541, 2005.

GIULIANI, P. et al. Tissue distribution and metabolism of guanosine in rats following intraperitoneal injection. **J Biol Regul Homeost Agents**. v. 26, n. 1, p. 51-65, 2012a.

GIULIANI, P. et al. Guanine-based purines modulate the effect of L-NAME on learning and memory in rats. **Panminerva Med**, v. 54, p. 53-58, 2012b.

GLINKA, Y. Y.; YOUDIM, M. B. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. **Eur J of Pharm**, v. 292, p. 329-332, 1995

- GOEDERT, M. et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 11, p. 4051-5, 1988.
- GOLEBIEWSKI, F. et al. System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. **Sci Signal**, v. 2, n. 72, p. ra24, 2009.
- GOMES, C. V. et al. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, n. 5, p. 1380-1399, 2011.
- GONG, L. et al. Preferential interaction of sentrin with an ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9. **J Biol Chem**, v. 272, n. 45, p. 28198-28201, 1997.
- GONG, L. et al. Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. **FEBS Lett**, v. 448, n. 1, p. 185-189, 1999.
- GOTTFRIED, C. et al. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Mech of Agei and Develop**, v. 123, p. 1333-1340, 2002.
- GUERRA DE SOUZA, A. C.; PREDIGER, R. D.; CIMAROSTI, H. SUMO-regulated mitochondrial function in Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 137, n. 5, p. 673-686, 2016.
- GURUNG, S. et al. ADAR2-mediated Q/R editing of GluK2 regulates kainate receptor upscaling in response to suppression of synaptic activity. **J Cell Sci**, v.131, p. 1-11, 2018.
- GUO, D. et al. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. **Nat Genet**, v. 36, n. 8, p. 837-841, 2004.
- GUO C. et al. Senp3-mediated desumoylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. **Embo J**, v. 32, p. 1514-1528, 2013.
- GUO, C. et al. SENP3-mediated deSUMOylation of Drp1 facilitates interaction with Mff to promote cell death. **Scient Repo**, v. 7, p. 1-11, 2017.
- GUO, C.; HENLEY, J. M. Wrestling with stress: roles of protein SUMOylation and deSUMOylation in cell stress response. **IUBMB life**, v. 66, p. 71-77, 2014.
- HAAS, H. L.; SELBACH, O. Functions of neuronal adenosine receptors. **Naunyn Schmied Arch Pharmacol**, v. 362, n. 4-5, p. 375-381, 2000.

HAIGIS, M. C.; YANKNER, B. A. The aging stress response. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 333–344, 2010.

HAMMARBERG, C.; SCHULTE, G.; FREDHOLM, B.B. Evidence for functional adenosine A3 receptors in microglia cells. **J Neurochem**, v. 86, p. 1051–1054, 2003.

HANSEL, G. et al. Guanosine protects against cortical focal ischemia, involvement of inflammatory response. **Mol Neurobiol**, v. 52, n. 3, p. 1791–1803, 2015.

HARDER, Z.; ZUNINO, R.; MCBRIDE, H. Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. **Curr Biol**, v. 14, p. 340–345, 2004.

HARTL, F. U. Protein misfolding diseases. **Ann Revi of Biochem**, v.86, p. 21–26, 2017.

HAY, R. T. SUMO: a history of modification. **Mol Cell**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2005.

HAYASHI, T. et al. Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. **Exp Cell Res**, v. 280, n. 2, p. 212-221, 2002.

HECKER, C. M. et al. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. **J Biol Chem**, v. 281, n. 23, p. 16117-16127, 2006.

HECKMAN, P. R.; WOUTERS, C.; PRICKAERTS, J. Phosphodiesterase inhibitors as a target for cognition enhancement in aging and Alzheimer's disease: a translational overview. **Curr Pharm Des**. v.21, n.3, p. 317-331, 2015.

HELLWEG, R. et al. Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas. **Neurobiol Dis**, v. 25, p. 1-7, 2007.

HENDRIKS, I. A. et al. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. **Nat Struct Mol Biol**, v. 21, n. 10, p. 927-936, 2014.

HENLEY, J. M.; CRAIG, T. J.; WILKINSON, K. A. Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction. **Physiol Rev**, v. 94, n. 4, p. 1249-1285, 2014.

HENLEY, J. M.; CARMICHAEL, R. E.; WILKINSON, K. A. Extranuclear SUMOylation in Neurons. **Trends Neurosci**, v. 41, n. 4, p. 198-210, 2018.

HICKEY, C. M.; WILSON, N. R.; HOCHSTRASSER, M. Function and regulation of SUMO proteases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 12, p. 755-766, 2012.

HILL, S. J. G-protein-coupled receptors: past, present and future. **Br J Pharmacol**, v. 147, Suppl 1: S27-37, 2006.

HOPPE, J. B. et al. SUMO-1 conjugation blocks beta-amyloid-induced astrocyte reactivity. **Neurosci Lett**, v. 546, p. 51-56, 2013.

IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: **ArtMed**, 2002.

IWATSUBO T. et al. Visualization of Abeta 42(43) and Abeta 40 in senile plaques with end-specific Abeta monoclonals: evidence that an initially deposited species is Abeta 42(43). **Neur**, v.13, n. 1, p.45-53, 1994

JACKSON, E. K. et al. Extracellular guanosine regulates extracellular adenosine levels. **Am J Physiol Cell Physiol**, v, 304, n. 5, p. 406-421. 2013.

JELLINGER, K.A. Alzheimer 100 - highlights in the history of Alzheimer research. **J Neural Transm**. 1603-1623, 2006.

JIANG, T.; CADENAS, E. Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age. **Aging Cell** v. 13 n. 6, p. 1059–1067, 2014.

JOHNSON, E. S.; BLOBEL, G. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. **J Biol Chem**, v. 272, n. 43, p. 26799-26802, 1997.

JURKOWITZ, M. S. et al. Adenosine, inosine, and guanosine protect glial cells during glucose deprivation and mitochondrial inhibition: correlation between protection and ATP preservation. **J Neurochem**, v. 71, n. 2, p. 535-548, 1998.

KAMITANI, T.; NGUYEN, H. P.; YEH, E. T. Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. **J Biol Chem**, v. 272, n. 22, p. 14001-14004, 1997.

KANG, H. et al. Mechanisms to prevent caspase activation in rotenone-induced dopaminergic neurodegeneration: role of ATP depletion and procaspase-9 degradation. **Apopt**, v. 17, p.449–462, 2012.

KARRAN, E.; MERCKEN, M.; DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 9, p. 698-712, 2011.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, n. 19, 10409-10414, 1997.

KERSCHER, O. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. **EMBO Rep**, v. 8, n. 6, p. 550-555, 2007.

KETY, S.S. The general metabolism of the brain in vivo. In: *Metabolism of the nervous system* (Richter D, ed), London: **Pergamon**, p. 221-237, 1957.

KHOURY, G. A.; BALIBAN, R. C.; FLOUDAS, C. A. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database, **Sci. Rep**, 1, 90, 2011.

KNIPSCHER, P. et al. Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. **Mol Cell**, v. 31, n. 3, p. 371-382, 2008.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Animal models of depression: molecular perspectives. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 7, p. 121-147, 2011.

KRUPNICK, J. G.; BENOVIC, J. L. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 38, p. 289-319, 1998.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. **Cold Spring Harb Protoc**, p. 465-468, 2018.

LAAR, V. S. V.; BERMAN, S. B. The interplay of neuronal mitochondrial dynamics and bioenergetics: implications for Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 51, n. 4, p. 3-55, 2013.

LANZMASTER, D. et al. Guanosine: a neuromodulator with therapeutic potential in brain disorders. **Aging Dis**, v. 7, n. 5, p. 657-679, 2016a.

LANZMASTER, D. et al. Guanosine prevents anhedonic-like behavior and impairment in hippocampal glutamate transport following amyloid- $\beta$ 1-40 administration in mice. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 7, p. 5482-5496, 2017.

LEBON, G. et al. Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. **Nature**, v. 474, n. 7352, p. 521-525, 2011.

LEE, G. W. et al. Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue. **J Biol Chem**, v. 273, n. 11, p. 6503-6507, 1998.

LEE, Y. J. et al. Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27, n. 5, p. 950-962, 2007.

LEE, Y. J. et al. SUMOylation participates in induction of ischemic tolerance. **J Neurochem**, v. 109, n. 1, p. 257-267, 2009.

LEE, Y. J. et al. Global SUMOylation is a molecular mechanism underlying hypothermia-induced ischemic tolerance. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 416, 2014a.

LEE, L. et al. Regulation of synaptic plasticity and cognition by SUMO in normal physiology and Alzheimer's disease. **Sci Rep**, v. 4, p. 7190, 2014b.

LESZCZYNSKI, M. How Does Hippocampus Contribute to Working Memory Processing? **Front Hum Neurosci**, 5: 168, 2011.

LI, B. et al. Expression of nucleoside transporter in freshly isolated neurons and astrocytes from mouse brain. **Neurochem Res**, v. 38, n. 11, p. 2351-2358, 2013.

LI, R. SHEN, Y. An old method facing a new challenge: Re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. **Life Scie**, v. 92, p. 747-751, 2013.

LIANG, Y.C. et al. SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. **Sci Rep**, v. 6:26509, p. 1-15, 2016.

LITSKY, L. M. et al. Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during chemical hypoxia. **Bra Res**, v. 821, p. 426-432, 1999.

LIU, X. Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. **EMBO J**, v. 28, p. 3074-3089, 2009.

LIU, B. et al. Glio- and neuro-protection by prosaposin is mediated by orphan G-protein coupled receptors GPR37L1 and GPR37. **Glia**, v. 66, n. 11, p. 2414-2426, 2018.

LOSÓN, O. C. et al. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. **Mol Biol Cell**, v. 24, n. 5, p. 659-667, 2013.

MACASKILL, A. F., KITTLER, J.T. Control of mitochondrial transport and localization in neurons. **Trends Cell Biol**, v. 20, n. 2, p. 102-112, 2010.

MARCELLI, S. et al. Targeting SUMO-1ylation contrasts synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 8, p. 6609-6623, 2017.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. Basic Medical Biochemistry: a clinical approach, **Lippin Will Wilk**, 1996.

MARTIN, S. et al. Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 12, p. 948-959, 2007.

MARTINS, W. C. et al. Atorvastatin prevents cognitive deficits induced by intracerebroventricular amyloid- $\beta$ 1-40 administration in mice: involvement of glutamatergic and antioxidant systems. **Neurotox Res**, v. 28, n. 1, p. 32-42, 2015.

MARTINS, W. C.; TASCAS, C. I.; CIMAROSTI, H. Battling Alzheimer's Disease: Targeting SUMOylation-Mediated Pathways. **Neurochem Res**, 2016.

MARQUES, N. F.; MASSARI, C. M.; TASCAS, C. I. Guanosine protects striatal slices against 6-ohda-induced oxidative damage, mitochondrial dysfunction, and ATP depletion. **Neurotox Res**, v. 35, n. 2, p. 475-483, 2019.

MATIAS, I.; MORGADO, J.; GOMES, F. C. A. Astrocyte heterogeneity: impact to brain aging and disease. **Front Aging Neurosci**, v. 11, n. 59, p. 1- 18, 2019.

MATTSON, M. P. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. **Ann Intern Med**, v. 139, p. 441-444, 2003.

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, p. 631-639, 2004.

MATSUZAKI, S. et al. SUMO1 affects synaptic function, spine density and memory. **Sci Rep**, v. 5, p. 10730, 2015.

MAZUREK, A. A. Treatment of Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 342, n.11, p. 821; 821-2, 2000.

MCGAUGH, J. L. Memory a century of consolidation. **Science**, v. 287, p. 248-251, 2000.

MCMANUS, F. P. et al. Quantitative SUMO proteomics reveals the modulation of several PML nuclear body associated proteins and an anti-senescence function of UBC9. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 7754, 2018.

MCMILLAN, L. E. et al. Profiles of SUMO and ubiquitin conjugation in an Alzheimer's disease model. **Neurosci Lett**, v. 502, n. 3, p. 201-208, 2011.

MENDES-DE-AGUIAR, C. B. et al. Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity. **J Neurosci Res**, v. 86, n. 14, p. 3117-3125, 2008.

MEYER, J. N.; LEUTHNER, T.C.; LUZ, A. L. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. **Toxicology**, v. 391, p. 42–53, 2017.

MICHEL, S. et al. Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance. **J. Cell. Physiol.** v. 227, p. 2297–2310, 2012.

MOLZ, S. et al. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase  $\beta$  pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 9, p. 1400-1408, 2011.

MORETTI, M, et al., Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr Res**, v. 46, n. 3, p. 331-340, 2012.

MORETTO, M. B. et al. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. **Exp Neurol**, v. 195, n. 2, p. 400-406, 2005.

MUCKE, L.; SELKOE, D. J. Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein: synaptic and network dysfunction. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 7, 2012.

MUKHOPADHYAY, D.; DASSO, M. Modification in reverse: the SUMO proteases. **Trends Biochem Sci**, v. 32, n. 6, p. 286-295, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NACERDDINE, K. et al. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. **Dev Cell**, v. 9, n. 6, p. 769-779, 2005.

NEGRI, C. et al. Multiparametric staining to identify apoptotic human cells. **Exp Cell Res**, v. 234, n. 1, p. 174-177, 1997.

OCHIISHI, T. et al. Cellular localization of adenosine A1 receptors in rat forebrain: immunohistochemical analysis using adenosine A1 receptor-specific monoclonal antibody. **J Comp Neurol**, v. 411, n. 2, p. 301-316, 1999.

OLESKOVICZ, S. P. et al. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. **Neurochem Int**, v. 52, n. 3, p. 411-418, 2008.

OLIVEIRA, K. A. et al. Guanosine promotes cytotoxicity via adenosine receptors and induces apoptosis in temozolomide-treated A172 glioma cells. **Purinergic Signal**, v. 13, n. 3, p. 305-318, 2017.

ONAO LAPO, O. J.; ONAO LAPO, A. Y. Subchronic Oral Bromocriptine Methanesulfonate Enhances Open Field Novelty-Induced Behavior and Spatial Memory in Male Swiss Albino Mice. **Neurosci J**, e948241, 2013.

ORR, A. G. et al. Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. **Nat Neurosci**, v.18, n. 3, p.423-434, 2015.

OSELLAME, L. D. Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. **J Cell Sci**, v. 129, n. 11, p. 2170-2181, 2016.

OTERA, H. et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. **J of Cell Biol**, v. 191, p. 1141-1158, 2010.

PAASCH, F. Failed mitochondrial import and impaired proteostasis trigger SUMOylation of mitochondrial proteins. **J Biol Chem**, v. 293, n. 2, p. 599-609, 2018.

PAGNUSSAT, N. et al. Adenosine A<sub>2A</sub> receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. **Brit J of Pharm**, v. 172, p. 3831–3845, 2015.

PALOP, J. J.; MUCKE, L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. **Nat Neurosci**, v. 13, p. 812–818, 2010.

PAN, T. et al. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction **Neurosc**, v. 164, p. 541-551, 2009.

- PARAMESHWARAN, K.; DHANASEKARAN, M.; SUPPIRAMANIAM, V. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. **Exp Neurol**, v. 210, n. 1, p. 7-13, 2008.
- PASTOR-ANGLADA, M.; PÉREZ-TORRAS, S. Emerging roles of nucleoside transporters. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 1-8, 2018.
- PEDRAZZA, E. L. et al. Habituation to an open field alters ecto-nucleotidase activities in rat hippocampal synaptosomes. **Neurosci Lett**, v. 413, n. 1, p. 21-24, 2007.
- PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. **Physiol Rev**, v. 94, n. 4, p.1077-1098, 2014.
- PENG, L. et al. Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. **Glia**, v. 52, n. 1, p. 25-35, 2005.
- PETERS, R. Ageing and the brain, **Postgrad. Med. J**, v. 82, p. 84–88, 2006.
- PETERSON, G. L. Simplification of Protein Assay Method of Lowry Et Al - Which Is More Generally Applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.
- PETTIFER, K. M. et al. Guanosine protects SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced apoptosis. **Neuroreport**, v. 15, n. 5, p. 833-836, 2004.
- PETTIFER, K. M. et al. MPP(+)-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine. **Purinergic Signal**, v. 3, n. 4, p. 399-409, 2007.
- PIERMARTIRI, T. C. et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. **Neurotox Res**, v. 16, n. 2, p. 106-115, 2009.
- PINTO, M. P. et al. Heat shock induces a massive but differential inactivation of SUMO-specific proteases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 10, p. 1958-1966, 2012.
- POLUCENO, G. Avaliação dos efeitos do nucleosídeo guanosina e da ativação farmacológica de canais de potássio (bk) em um modelo de isquemia cerebral *in vitro*. **Dissertação de mestrado**, UFSC, 2019.
- PREDIGER, R. D. et al. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for

a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav Brain Res**, v. 177, n. 2, p. 205-213, 2007.

PRETI, D. et al. History and perspectives of A2A adenosine receptor antagonists as potential therapeutic agents. **Med Res Rev**, v. 35, n. 4, p. 790-848, 2015.

QUIROZ, C. Key modulatory role of presynaptic adenosine A2A receptors in cortical neurotransmission to the striatal direct pathway. **Sci World J**, v. 18, n.9, p.1321-1344, 2009.

QUILLFELDT, J. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. **Rodent Mod as Tools in Eth Biomed Res**, p. 271-311, 2015.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.

RIAL, D. et al. Behavioral phenotyping of Parkin-deficient mice: looking for early preclinical features of Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 9, n. 12, e114216, 2014.

RICCIARELLI, R.; FEDELE, E. The Amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: It's time to change our mind. **Curr Neuropharmacol**, v. 15, n. 6, p. 926-935, 2017.

ROMAGNOLI, R. et al. Allosteric enhancers of A1 adenosine receptors: state of the art and new horizons for drug development. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 30, p. 3488-3502, 2010.

RAMOS, D. B. et al. Intranasal guanosine administration presents a wide therapeutic time window to reduce brain damage induced by permanent ischemia in rats. **Purinergic Signal**, v. 12, n. 1, p. 149-159, 2016.

RATHBONE, M. P. et al. Systemic administration of guanosine promotes functional and histological improvement following an ischemic stroke in rats. **Brain Res**, v. 1407, p. 79-89, 2011.

RATHINAM, M. L. et al. Astrocyte mediated protection of fetal cerebral cortical neurons from rotenone and paraquat. **Env Toxi Pharm**, v. 33, n. 2, p. 353-360, 2012.

REISS, A. B. et al. Adenosine and the Cardiovascular System. **Am J Cardiovas Drugs**, v. 19, p. 1-16, 2019.

ROCCA, D. L.; WILKINSON, K. A.; HENLEY, J. M. SUMOylation of FOXP1 regulates transcriptional repression via CtBP1 to drive dendritic morphogenesis. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

ROMERO, C. I. et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Analyt Biochem**, v. 401, n. 15, p. 318-320, 2010.

ROSSNER, S. et al. Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. **J Neurochem**, v. 92 n. 2, p. 226-234, 2005.

ROSSATO, J. I. et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learn Mem**, v. 14, n. 1, p. 36-46, 2007.

ROESLER, R. et al. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. **Neuroreport**, v. 3, n. 11, p. 2537-2540, 2000.

SAFHI, M. M. et al. Priming of signal transducer and activator of transcription proteins for cytokine-triggered polyubiquitylation and degradation by the A2A adenosine receptor. **Mol Pharmacol**, v. 77, n. 6, p. 968-978, 2010.

SAITOH, H.; HINCHEY, J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. **J Biol Chem**, v. 275, n. 9, p. 6252-6258, 2000.

SANDERS, L. H.; GREENAMYRE, J. T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson's disease and the rotenone model. **Free Radic Biol Med**, v. 62, p. 111-120, 2013.

SANTOS, B. dos. Avaliação do efeito do tratamento crônico com guanósina sobre o comportamento e a neurogênese de camundongos adultos, **TCC**, UFSC, p. 1-72, 2007.

SCHAMNE, M. G. et al. The Gender-Biased Effects of Intranasal MPTP Administration on Anhedonic- and Depressive-Like Behaviors in C57BL/6 Mice: the Role of Neurotrophic Factors. **Neurotox Res**, v. 34, n. 4, p. 808-819, 2018.

SCHESCHONKA, A.; TANG, Z.; BETZ, H. Sumoylation in neurons: nuclear and synaptic roles? **Trends Neurosci**, v. 30, n. 3, p. 85-91, 2007.

SCHMIDT, A. P.; LARA, D.R., SOUZA, D.O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacol Ther**, v. 116, n. 3, p. 401-416, 2007.

SCHON, E. A.; DI MAURO, S.; HIRANO, M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 12, p. 878-890, 2012.

SCHWARZ, S. E. et al. The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 2, p. 560-564, 1998.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **J Neurol Neuros and Psych**, v. 20, p. 11-21, 1957.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine receptors and the central nervous system. **Handb Exp Pharmacol**, n. 193, p. 471-534, 2009.

SELKOE, D. J. Folding proteins in fatal ways. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 900-4, 2003.

SERRANO-POZO, A. et al. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspec in Med**. a006189, 2011.

SHARROCKS, A. D. PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? **Genes Dev**, v. 20, n. 7, p. 754-8, 2006.

SHETH, S. et al. Adenosine receptors: expression, function and regulation. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 2, p. 2024-2052, 2014.

SHERER, T. B. et al. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. **J Neurosci**, v. 22, n. 16, p. 7006-7015, 2002.

SILVA, L. C. Sumoilação de proteínas na epilepsia do lobo temporal mesial. **Dissertação de mestrado**. UFSC, p. 1-97, 2018.

SILVEIRINHA, V.; STEPHENS, G. J.; CIMAROSTI, H. Molecular targets underlying SUMO-mediated neuroprotection in brain ischemia. **J Neurochem**, v. 127, n. 5, p. 580-591, 2013.

SINGER, M. A. The Origins of Aging: Evidence that Aging is an Adaptive Phenotype. **Curr Aging Sci**, v. 9, n. 2, p. 95-115, 2016.

SKOVRONSKY, D. M.; DOMS, R. W.; LEE, V. M. Y. Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid  $\beta$  protein that accumulates with time in culture. **J Cell Biol**, v. 141, n. 4, p. 1031-1039, 1998.

SOUZA, D. G. et al. Anti-aging effects of guanosine in glial cells. **Purinergic Signal**, v. 12, n. 4, p. 697-706, 2016.

STANKOVA, T. et al., SUMO1-conjugation is altered during normal aging but not by increased amyloid burden **Aging Cell**, 17:e12760, 2018.

STERU, L. et al., The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

SU, C. et al. Guanosine promotes proliferation of neural stem cells through cAMP-CREB pathway. **J Biol Regul Home Age**, v.27, n. 3, p.673-680, 2013.

SUZAWA, M. et al. A gene-expression screen identifies a non-toxic SUMOylation inhibitor that mimics SUMO-less human LRH-1 in liver. **Elife**, v. 4, 2015.

SVENNINGSSON, P. et al. Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. **Synapse**, v. 27, n. 4, p. 322-335, 1997.

SQUIRE, L. R. Memory and brain. New York, NY, US: **Oxford Uni Press**, 1987.

SQUIRE, L. R. Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. **J Cogn Neurosci**, v. 4, n. 3, p. 232-243, 1992.

SQUIRE, L.R.; KNOWLTON, B.; MUSE, G. The structure and organization of memory Annu. **Rev Psychol**, v.44, p.453-495, 1993.

SZABADKAI, G.; DUCHEN, M. R. Mitochondria: the hub of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. **Phys (Bethesda)**, v. 23, p.84-94, 2008.

TAKSANDE, B. G. Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress induced behavioral alteration in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 720, v. 1-3, p. 115-120, 2013.

TANAKA, K. et al. Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 12, p. 8660-8672, 1999.

TAO, C. C. et al. Epigenetic regulation of HDAC1 SUMOylation as an endogenous neuroprotection against A $\beta$  toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. **Cell Death Differ**, v. 24, n. 4, p. 597-614, 2017.

TAROZZI, A. et al. Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 24, n.3, p. 297-306, 2010.

TASCA, C. I.; DAL-CIM, T.; CIMAROSTI, H. In vitro oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death. **Methods Mol Biol**, v. 1254, p. 197-210, 2015.

TASCA, C. I. et al. Neuromodulatory effects of guanine-based purines in health and disease. **Front Cell Neurosci**, v. 23, n. 12, p. 1-14, 2018.

TATHAM, M. H. et al. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and UBC9. **J Biol Chem**, v. 276, n. 38, p. 35368-35374, 2001.

TAVARES, R. G. et al. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. **Neurochem Res**, v. 30, n. 4, p. 439-444, 2005.

THE JACKSON LABORATORY. When are mice considered old? Disponível em <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2017/november/when-are-mice-considered-old#> data de acesso 10 de julho de 2019.

THIERRY, B., et al. Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? **Behav Neural Biol**, v. 41, p. 180-189, 1984.

THOMAZ, D. T. et al. Guanosine prevents nitroxidative stress and recovers mitochondrial membrane potential disruption in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. **Purin Signal**, v. 12, n. 4, p. 707-718, 2016.

TROTTI, D.; DANBOLT, N. C.; VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? **Trends Pharmacol Sci** v. 19, n. 8, p. 328-334, 1998.

UEMURA, Y. et al. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. **Stroke**, v. 22, n. 12, p. 1548-1553, 1991.

ULRICH, H. D. Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 10, p. 525-532, 2005.

VERGER, A.; PERDOMO, J.; CROSSLEY, M. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. **EMBO Rep**, v. 4, n. 2, p. 137-142, 2003.

- VERTEGAAL, A. C. et al. Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 12, p. 2298-2310, 2006.
- VERKHRATSKY, A.; PARPURA, V. Astroglial pathology in neurological, neurodevelopmental and psychiatric disorders. **Neurobiol Dis**, v. 85, p. 254–261, 2016.
- VIANA DA SILVA, S. et al. Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors. **Nat Commun**, v. 17, n. 7:11915, p.1-11, 2016.
- VINADÉ, E. R., et al., Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. **Brain Res**, v. 977, n. 1, p. 97-102, 2003.
- VINADÉ, E. R. et al. Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. **Neurobiol Learn Mem**, v. 81, n. 2, p. 137-43, 2004.
- VINADÉ, E. R. et al. Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. **J of Neurosc Res**, v. 79, p. 248-253, 2005.
- VOLPINI, R. et al. Evidence for the existence of a specific G protein-coupled receptor activated by guanosine. **Chem Med Chem**, v. 6, n. 6, p. 1074-1080, 2011.
- WANG, L. et al. Neuron-specific Sumo1-3 knockdown in mice impairs episodic and fear memories. **J Psychiatry Neurosci**, v. 39, n. 4, p. 259-266, 2014.
- WEI, W. et al. A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 375, n. 3, p. 454-459, 2008.
- WILKINSON, K. A.; NAKAMURA, Y.; HENLEY, J. M. Targets and consequences of protein SUMOylation in neurons. **Brain Res Rev**, v. 64, n. 1, p. 195-212, 2010.
- WRANGEL, C. V. et al. rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: Behavioral and electrophysiological findings **Behav Bra Res**, v. 279, p. 52–61, 2015.
- WU, Y. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells. **Anal Biochem**, v. 423, n. 1, p.15-22, 2012.

YEH, E. T. SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. **J Biol Chem**, v. 284, n. 13, p. 8223-8227, 2009.

YUN, S. M. et al. SUMO1 modulates A $\beta$  generation via BACE1 accumulation. **Neurobiol Aging**, v. 34, n. 3, p. 650-662, 2013.

YOO, D. Y. et al. Chronic administration of SUMO-1 has negative effects on novel object recognition memory as well as cell proliferation and neuroblast differentiation in the mouse dentate gyrus. **Mol Med Rep**, v. 16, p. 3427-3432, 2017.

ZHANG, F. P. et al. SUMO-1 function is dispensable in normal mouse development. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 17, p. 5381-5390, 2008.

ZHANG, Y. Q.; SARGE, K. D. SUMOylation of amyloid precursor protein negatively regulates Abeta aggregate levels. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 374, n. 4, p. 673-678, 2008.

ZHANG, X.; WEN, H.; SHI, X. Lysine methylation: beyond histones. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 44, n. 1, p. 14-27, 2012.

ZHANG, L. et al. Neuron-specific SUMO knockdown suppresses global gene expression response and worsens functional outcome after transient forebrain ischemia in mice. **Neuroscience**, v. 343, p. 190-212, 2017.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 49, n. 6, p. 589-618, 1996.

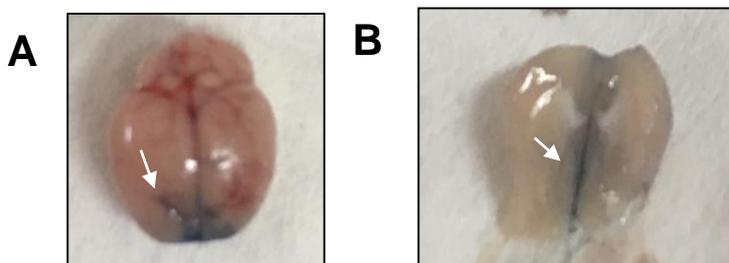
ZUCCARINI, M. et al. Uncovering the signaling pathway behind extracellular guanine-induced activation of NO system: new perspectives in memory-related disorders. **Front Pharmacol**, v. 9, n.110, p. 1-15, 2018.

ZUSSO, M. et al. Neuroepigenetics and Alzheimer's disease: An Update. **J Alzheimers Dis**, v. 64, n. 3, p. 671-688, 2018.

## APÊNDICE A – Injeção i.c.v. de peptídeo $A\beta_{1-42}$ nos camundongos C57BL/6 jovens e os respectivos comportamentos nos diferentes testes avaliados

A administração intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo  $A\beta_{1-42}$  (Bachem) agregado (400 pmol/animal, 3  $\mu$ L) ou PBS (controle) foi realizada à mão livre pelo Dr Mauricio Cunha com auxílio de bomba de infusão (velocidade 3  $\mu$ L/minuto) apenas uma vez, no primeiro dia do experimento. O local da administração foi obtido aproximadamente a partir do ponto de Bregma (1 mm posterior, 1 mm direita e 3 mm abaixo) visando o ventrículo direito (PREDIGER et al., 2007; BICCA et al., 2015; LANZNASTER et al., 2017). O sítio de injeção pôde ser confirmado como mostrado na Figura 41 onde a injeção do corante azul de Evans (0,5%) que difunde através do terceiro ventrículo confirmando o acerto das injeções.

**Figura 41:** Confirmação do sítio de injeção i.c.v. com corante azul de Evans.



**A.** Encéfalo inteiro de camundongo C57BL/6 mostrando o sítio de injeção. **B.** Corte transversal de encéfalo de camundongo mostrando a difusão do corante azul de Evans.

Com relação aos comportamentos analisados, a concentração de 400 pmol do peptídeo  $A\beta_{1-42}$  não foi capaz de promover nenhuma alteração comportamental nos testes avaliados (campo aberto, realocação de objetos, labirinto em Y, borrifada de sacarose, teste de suspensão pela cauda, MWM). Os valores podem ser observados na Tabela 4, onde os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão. Quando se analisa os valores brutos foram observados dentro dos grupos experimentais alguns animais que responderam à toxicidade do peptídeo  $A\beta_{1-42}$  formando subgrupos.

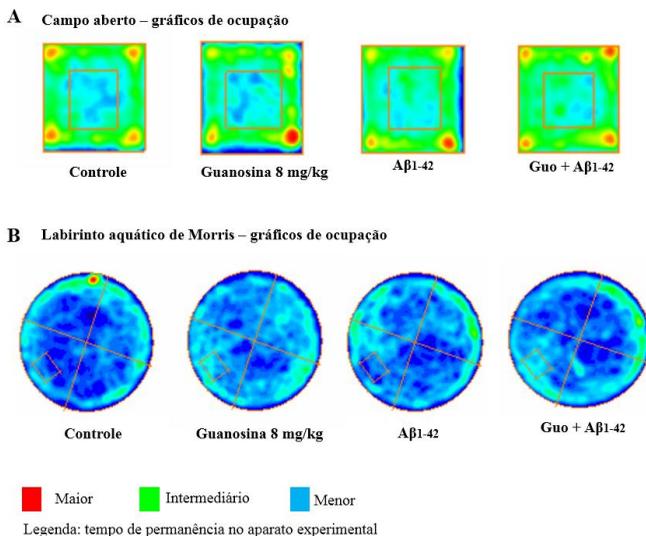
**Tabela 5:** Comportamentos observados nos camundongos C57BL/6 jovens tratados com guanosina e com a infusão do peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

Teste/ Comportamentos avaliados	Controle	A $\beta$ <sub>1-42</sub>	A $\beta$ <sub>1-42</sub> +Guo
<b>Campo aberto</b>	<b>n=9</b>	<b>n=10</b>	<b>n=11</b>
Tempo no centro (s)	63,22 $\pm$ 8,55	48,89 $\pm$ 6,64	74,96 $\pm$ 15,99
Distância percorrida (m)	22,78 $\pm$ 2,39	21,94 $\pm$ 1,57	19,20 $\pm$ 1,96
Entradas no centro	30,56 $\pm$ 3,93	23,36 $\pm$ 3,29	28,45 $\pm$ 4,50
<b>Reconhecimento de objetos</b>	<b>n= 11</b>	<b>n= 12</b>	<b>n= 12</b>
Índice de discriminação	51,03 $\pm$ 3,33	56,37 $\pm$ 3,62	53,79 $\pm$ 3,19
<b>Labirinto em Y</b>	<b>n=11</b>	<b>n=10</b>	<b>n=12</b>
Alternâncias (%)	61,79 $\pm$ 2,839	61,97 $\pm$ 3,80	58,85 $\pm$ 2,50
<b>Teste de borrifada de sacarose</b>	<b>n=8</b>	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>
Latência para primeira autolimpeza	28,00 $\pm$ 7,00	36,71 $\pm$ 6,66	22,00 $\pm$ 5,90
Autolimpeza (s)	178,5 $\pm$ 16,84	159,4 $\pm$ 16,46	109,6 $\pm$ 16,35
<b>Teste de Suspensão pela cauda</b>	<b>n=10</b>	<b>n=12</b>	<b>n=13</b>
Latência primeira imobilidade (s)	104,3 $\pm$ 10,90	111,8 $\pm$ 15,14	92,31 $\pm$ 7,86
Imobilidade total (s)	95, 80 $\pm$ 13,15	128,8 $\pm$ 20,20	107,2 $\pm$ 11,65
<b>MWM</b>	<b>n=10</b>	<b>n=11</b>	<b>n=12</b>
Latência para encontrar plataforma (s)	26,70 $\pm$ 5,21	34,45 $\pm$ 7,57	21,92 $\pm$ 5,79

Resultados são expressos em média  $\pm$  erro da média; Guo: guanosina (8 mg/kg i.p.); A $\beta$ <sub>1-42</sub> (400 pmol i.c.v.) MWM: Labirinto aquático de Morris; s: segundos; m: metros; %: porcentagem; n: número de animais. Fonte: o autor.

Os resultados comportamentais nos testes de campo aberto e MWM foram analisados com auxílio do *software Anymaze* (Figura 42) exceto para os animais em que o programa não foi capaz de localizar o animal corretamente no aparato.

**Figura 42:** Gráficos de ocupação obtidos pelo software Anymaze.



Figuras qualitativas que representam através da intensidade das cores da legenda o perfil de exploração do animal em cada aparato experimental.

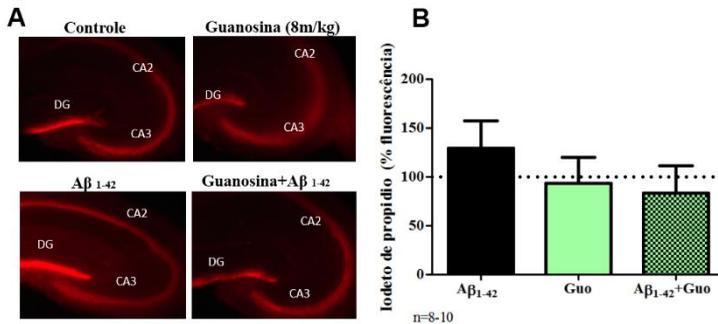
### Análise de morte celular com Iodeto de propídio (IP)

Um dos hipocampus foi utilizado para o preparo de fatias (400  $\mu$ m) com auxílio de fatiador de tecidos *McILwain*<sup>®</sup> e foram recuperadas em tampão por 10 min e em seguida incubadas com IP (7  $\mu$ g/mL) por 30 min em tampão KREBS (KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaCl 136,9 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,9 mM - pH 7,4), à 37°C. Em seguida, as fatias foram retiradas do meio contendo IP e foram transferidas para placa de 96 poços contendo tampão KREBS (200  $\mu$ L/poço). A fluorescência foi mensurada em leitor de microplacas *Spectramax* 190 quando o IP se liga ao DNA e emite fluorescência vermelha (630 nm) quando excitado por luz verde (495 nm) (PIERMARTIRI et al., 2009). Logo após a leitura da absorbância foram retiradas fotos em microscópio *Olympicus* aumento 40 x.

Com relação a intensidade de fluorescência nos ensaios de IP nas fatias hipocampais, a ANOVA de duas vias não detectou diferenças com o tratamento do A $\beta$ <sub>1-42</sub> (F(1, 32)=0,10336, p=0,74992). Não foram observadas diferenças com o tratamento com guanosina (F(1,

32)=0,76040,  $p=0,38970$ ) nem com o tratamento de guanósina mais  $A\beta_{1-42}$  ( $F(1, 32)=0,41050$ ,  $p=0,52628$ ) (Figura 43).

**Figura 43:** Efeito da guanósina na fluorescência de iodeto de propídio em fatias hipocâmpais dos camundongos C57BL/6 que receberam a i.c.v. com peptídeo  $A\beta_{1-42}$ .

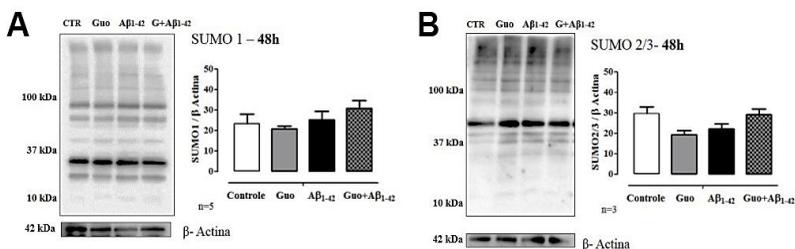


**A.** Imagens de fluorescência representativas das fatias hipocâmpais dos camundongos jovens C57BL/6 nos respectivos grupos experimentais (aumento 100X). DG: giro denteado, CA3, CA2: regiões hipocâmpais. **B.** Quantificação da fluorescência pela leitura a 630 nm. A análise estatística ANOVA de duas vias não detectou diferenças entre os grupos.

## APÊNDICE B – Efeito da guanosina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação global de proteínas nos astrócitos corticais incubados com peptídeo A $\beta_{1-42}$

Com relação ao perfil de SUMO1-ilação (ANOVA de uma via,  $F=0,6645$ ;  $p=0,5859$ ) e SUMO2/3-ilação (ANOVA de uma via,  $F=3,468$ ;  $p=0,07$ ) global dos astrócitos corticais tratados com guanosina e com o peptídeo A $\beta_{1-42}$  não foram detectadas diferenças entre os tratamentos (Figura 44 A e B).

**Figura 44:** Efeito da guanosina na SUMO1-ilação e SUMO2/3-ilação em 48 h nos astrócitos incubados com o peptídeo A $\beta_{1-42}$ .

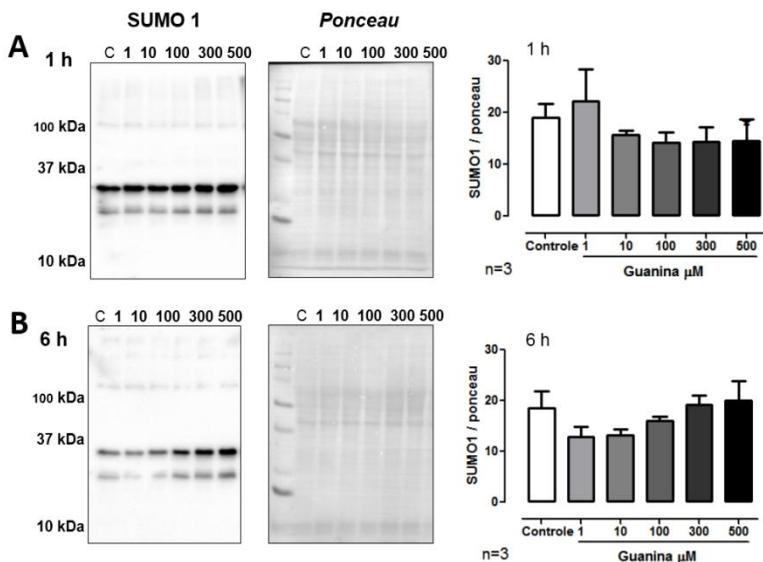


**A.** *Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO1-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento  $\beta$ -actina, com os respectivos tratamentos. **B.** *Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO2/3-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento  $\beta$ -actina, com os respectivos tratamentos. Resultados expressos como média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via não detectou diferença entre os grupos. CTR: Controle; Guo: Guanosina (100  $\mu$ M); A $\beta_{1-42}$  (2  $\mu$ M); n: número de experimentos independentes.

## APÊNDICE C – Efeito da guanina nos níveis globais de SUMO1-ilação em astrócitos corticais

As diferentes concentrações de guanina não afetaram a SUMO1-ilação global de proteínas em astrócitos em 1 h (ANOVA de uma via,  $F=0,8650$ ;  $p=0,5318$ , Figura 45A), nem em 6 h (ANOVA de uma via,  $F=1,587$ ,  $p=0,2369$ , Figura 45B). Uma vez que só foram observadas diferenças para SUMO2/3-ilação nos tempos de 1 h e 6 h os tempos de 24 h e 48 h não foram investigados para SUMO1-ilação global de proteínas.

**Figura 45:** Efeitos da guanina na SUMO1-ilação global em astrócitos corticais.

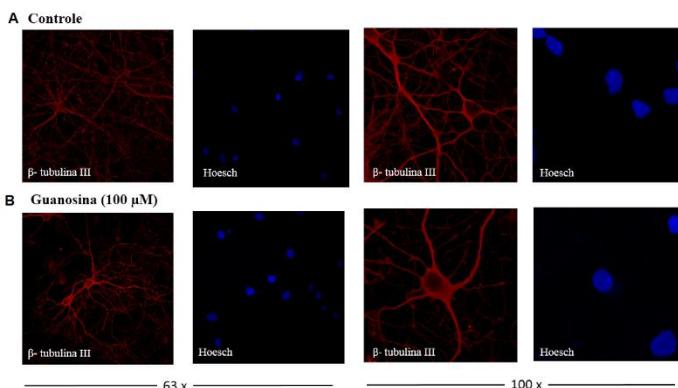


*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO1-ilação global dividida pela densidade óptica do controle de carregamento *Ponceau*, com os respectivos tratamentos em **A**. 1 h e em **B**. 6 h. Resultados expressos em média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via não detectou diferença entre os grupos. C: Controle; n: número de experimentos independentes.

## APÊNDICE D – Fotomicrografias representativas das culturas de neurônios

Pode-se observar na Figura 46, fotomicrografias representativas de neurônios com (14 d.i.v.) através da marcação de  $\beta$ -tubulina III, anticorpo específico para marcação neuronal e o corante DAPI marcando os núcleos. Essas micrografias mostram que o tratamento com guanosina (100  $\mu$ M) não alterou a morfologia dos neurônios em até 48 h e confirmam que nas culturas utilizadas a maioria das células eram neurônios.

**Figura 46:** Fotomicrografias representativas da morfologia de neurônios corticais obtidas em microscópio confocal.



Marcação específica para neurônio  $\beta$ -tubulina III em vermelho e marcação para núcleo DAPI em azul. **A.** Neurônios controle em meio neurobasal 48 h. **B.** Neurônios tratados com guanosina (100  $\mu$ M) por 48 h. Aumentos de 63x e 100x.

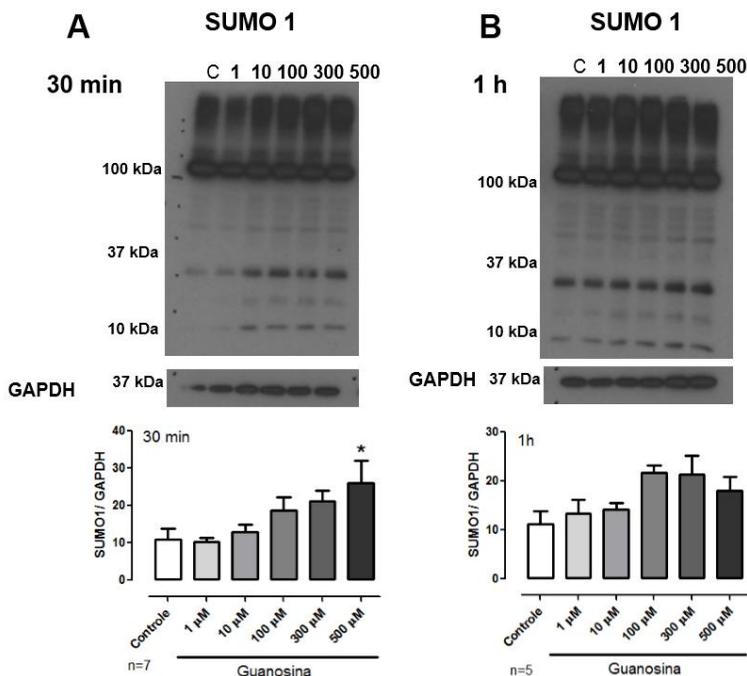
## APÊNDICE E – Efeitos da guanosina em células HEK 293

Com base nos resultados mostrados no capítulo II da presente tese, onde a guanosina aumentou a SUMO2/3-ilação global em astrócitos e em neurônios corticais de cultivo primário, fez com que surgisse a pergunta: será que a guanosina poderia promover o mesmo efeito na SUMOilação em células fora do SNC? Nesse sentido, foram realizados experimentos com as células derivadas de rim de embrião humano (*human embryonic kidney cells*-HEK). As células HEK são células imortalizadas e amplamente utilizadas em estudos e avaliações *in vitro*. Para estudar os diferentes efeitos dos receptores de adenosina essas células recebem transfecção com os cDNA de interesse uma vez que elas expressam esses receptores em níveis menores ao comparado com outros tecidos como cérebro (para revisão ver SHETH et al., 2014).

As células HEK foram manipuladas de acordo com protocolo padrão do laboratório do Prof. Jeremy Henley, na Universidade de Bristol. As células foram contadas em câmara de Neubauer antes de serem plaqueadas e foram mantidas em meio DMEM (Lonza) (FLETCHER-JONES et al., 2019). O preparo de amostra e o procedimento para *Western blotting* seguiu o mesmo protocolo descrito no capítulo II dessa tese. Após atingirem confluência em torno de 90% foram tratadas com guanosina nas concentrações de 1, 10 100, 300 e 500  $\mu\text{M}$  e as células HEK foram tratadas com guanosina por 30 min e 1 h.

Como podemos observar na Figura 47A a guanosina na concentração de 500  $\mu\text{M}$  aumentou significativamente SUMO1-ilação global de proteínas em 30 min nas células HEK (ANOVA de uma via,  $F=3,409$ ;  $p=0,012$ ). A ANOVA de uma via detectou uma possível diferença em 1 h ( $F=2,806$ ;  $p=0,039$ ), porém, esse efeito não foi detectado pelo *post hoc* *Newmann Keuls*.

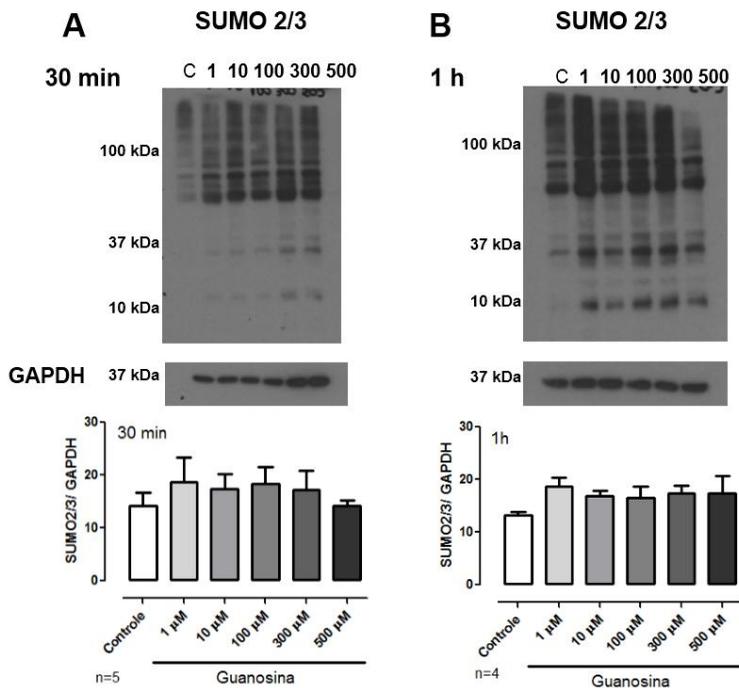
**Figura 47:** Efeito da guanosina na SUMO1-ilação global de proteínas em células HEK em 30 min e 1 h.



*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO1-ilação global dividida pelo controle de carregamento GAPDH, com os respectivos tratamentos em **A.** 30 min e em **B.** 1 h. Resultados expressos em média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls comparações múltiplas  $*p \leq 0,05$ . C: Controle; n:número de experimentos independentes.

As diferentes concentrações de guanosina não foram capazes de modular a SUMO2/3-ilação global de proteínas em 30 min em células HEK (ANOVA de uma via,  $F=0,4004$ ;  $p=0,8436$ , Figura 48A). Também não foram detectadas diferenças na SUMO2/3-ilação global de proteínas nas mesmas concentrações de guanosina no tempo de 1 h nas células HEK (ANOVA de uma via,  $F=0,9181$ ;  $p=0,4916$ , Figura 48B).

**Figura 48:** Efeito da guanosina na SUMO2/3-ilação global de proteínas em células HEK em 30 min e 1 h.

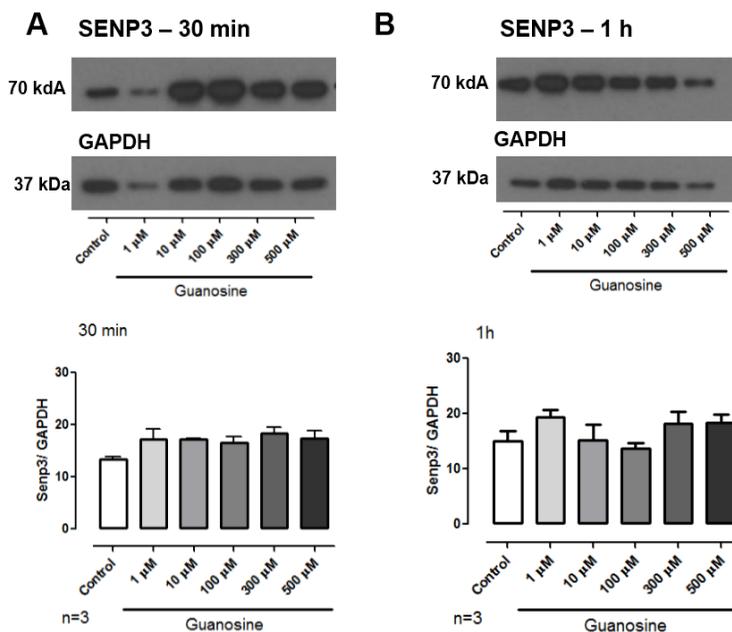


Western blotting representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SUMO1-ilação global dividida pelo controle de carregamento GAPDH, com os respectivos tratamentos em **A**. 30 min e em **B**. 1 h. Resultados expressos em média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls não detectou diferença entre os grupos. C: Controle; n:número de experimentos independentes.

Com relação à enzima que promove a deSUMOilação, SENP3, as diferentes concentrações de guanosina não foram capazes de modular seus níveis em 30 min em células HEK (ANOVA de uma via,  $F=0,4615$ ;  $p=0,1421$ ; Figura 49A). As diferentes concentrações de guanosina não foram capazes de modular os níveis de SENP3 em 1 h em células HEK (ANOVA de uma via,  $F=1,646$ ,  $p=0,2219$ ; Figura 49B). Entretanto, como foi observado um aumento de SUMO1-ilação global em 30 min nas células HEK e a enzima responsável pela desconjugação dessa isoforma é a SENP1, seriam necessários experimentos que analisassem

o nível desta isoforma, não fizemos esse experimento pela falta de especificidade/qualidade dos anticorpos que estavam à disposição.

**Figura 49:** Efeito da guanosina na SENP3 em células HEK em 30 min e 1 h.



*Western blotting* representativo e análise quantitativa da densidade óptica de SENP3 dividida pelo controle de carregamento GAPDH, com os respectivos tratamentos em **A**. 30 min e em **B**. 1 h. Resultados expressos em média + erro padrão. Análise estatística ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls não detectou diferença entre os grupos. C: Controle; n: número de experimentos independentes.

**ANEXO A** – Lista dos anticorpos usados na presente tese**Tabela 6:** Lista de anticorpos utilizados para *Western Blotting* e imunocitoquímica.

<b>Anticorpo</b>	<b>Fabricante (nº catálogo)</b>	<b>Diluição</b>
<i>Anti-mouse IgG HRPlinked</i>	Abcam (ab6728)	1:5000
<i>Anti-rabbit IgG HRP-linked</i>	Cell signaling (#7074S)	1:5000
Anti-beta amiloide (D54D2)	Cell signaling (8243P)	1:100
Anti-SUMO1	Cell signaling (#4930)	1:1000
Anti-SUMO2/3	Cell signaling (#4971S)	1:1000
Anti-SENP3	Cell signaling (D20A10)	1:1000
Anti-Mff	Santa cruz (sc398617)	1:1000
Anti-Drp1	Cell signaling (#14647)	1:1000
Anti-GAPDH	Abcam (ab8248)	1:10000
Anti-GFAP	Sigma (3670S)	1:100
Anti- $\beta$ -actina	Cell signaling (ab8226)	1:10000
Anti- $\beta$ -Tubulina	Cell signaling (2146S)	1:10000

Fonte: o autor

## ANEXO B – Capítulo de livro publicado disponível em

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28197918>

---

## Sumoylation: Implications for Neurodegenerative Diseases

# 16

Dina B. Anderson, Camila A. Zanella,  
Jeremy M. Henley, and Helena Cimarosti

### Abstract

The covalent posttranslational modifications of proteins are critical events in signaling cascades that enable cells to efficiently, rapidly and reversibly respond to extracellular stimuli. This is especially important in the CNS where the processes affecting synaptic communication between neurons are highly complex and very tightly regulated. Sumoylation regulates the function and fate of a diverse array of proteins and participates in the complex cell signaling pathways required for cell survival. One of the most complex signaling pathways is synaptic transmission.

Correct synaptic function is critical to the working of the brain and its alteration through synaptic plasticity mediates learning, mental disorders and stroke. The investigation of neuronal sumoylation is a new and exciting field and the functional and pathophysiological implications are far-reaching. Sumoylation has already been implicated in a diverse array of neurological disorders. Here we provide an overview of current literature highlighting recent insights into the role of sumoylation in neurodegeneration. In addition we present a brief assessment of drug discovery in the analogous ubiquitin system and extrapolate on the potential for

---

D.B. Anderson  
Ispen Bioinnovation Ltd.  
Units 4-10 The Quadrant, Barton Lane,  
Abingdon OX14 3YS, UK

C.A. Zanella • H. Cimarosti (✉)  
Department of Pharmacology, Federal University of  
Santa Catarina, Campus Universitario – Trindade,  
Florianópolis CEP 88040-900, Brazil  
e-mail: [helena.cimarosti@ufsc.br](mailto:helena.cimarosti@ufsc.br)

---

J.M. Henley  
MRC Centre for Synaptic Plasticity, School of  
Biochemistry, University of Bristol,  
University Walk, Bristol BS8 1TD, UK