

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Tharine Aparecida Dal-Cim

**Mecanismos de Neuroproteção da Guanosina contra a
Neurotoxicidade induzida por Isquemia e Dano Oxidativo**

Mitocondrial *in vitro*

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina do Grau de Doutor em
Neurociências
Orientador: Prof. Dra. Carla Inês Tasca
Coorientador: Prof. Dra. Alexandra Latini

Florianópolis, 2012

Dal-Cim, Tharine Aparecida
Mecanismos de Neuroproteção da Guanosina contra a
Neurotoxicidade induzida por Isquemia e Dano Oxidativo
Mitochondrial in vitro [tese] / Tharine Aparecida Dal-Cim ;
orientadora, Carla Inês Tasca ; co-orientadora, Alexandra
Latini. - Florianópolis, SC, 2012.
158 p. ; 21cm

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

Inclui referências


1. Neurociências. 2. Neurociências. 3. neuroproteção .
4. guanosina. 5. sistema glutamatérgico. I. Tasca, Carla
Inês. II. Latini, Alexandra. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.
IV. Título.

THARINE APARECIDA DAL CIM

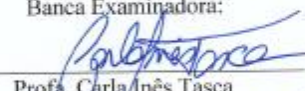
**“MECANISMOS DE NEUROPROTEÇÃO DA
GUANOSINA CONTRA A NEUROTOXICIDADE
INDUZIDA POR ISQUEMIA E DANO OXIDATIVO
MITOCONDRIAL *IN VITRO*”.**

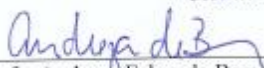
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina


Florianópolis, 30 de agosto de 2012.



Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Coordenadora do Curso

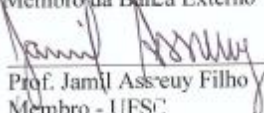
Banca Examinadora:



Profa. Carla Inês Tasca
Orientadora – UFSC


Profa. Andreza Fabro de Bem
Membro - UFSC


Prof. Francisco Ciruela
Membro da Banca Externo


Profa. Lisiane Oliveira Porciúncula
Membro da Banca Externo


Prof. Jamil Ass'ey Filho
Membro - UFSC


Prof. Rodrigo Bairy Leal
Membro - UFSC

Dedico este trabalho aos meus pais,
Ivanir e Teori pelo incentivo e amor de
toda uma vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Teori e Vani, que sempre me incentivaram nos maiores desafios da minha vida. Obrigada por acreditarem e confiarem em mim. O amor e a amizade de vocês tornou tudo possível, obrigada.

Agradeço minha orientadora, Dra. Carla I. Tasca, por todos os ensinamentos e paciência durante toda minha formação acadêmica desde a iniciação científica até o desenvolvimento dessa tese de doutorado. Obrigada pela amizade, pelo apoio e pelas palavras de incentivo e motivação.

Aos meus irmãos Thavi e Thiago pela força, carinho e amor.

Ao meu namorado Thiago que esteve sempre ao meu lado vibrando com minhas vitórias e dividindo comigo as incertezas e frustrações. Obrigada pela paciência, pelo companheirismo e pela amizade.

Agradeço a minha co-orientadora Dra. Alexandra Latini que me supervisionou durante o estágio pós-doutoral da minha orientadora Dra. Carla Tasca.

Agradeço o pessoal do laboratório pelas discussões científicas e auxílio na confecção dessa tese mas acima de tudo agradeço pela amizade e convivência. Obrigada Chai, Débora, Adalba pela ajuda. Obrigada Samuel e Wagner pelas conversas e risadas. Obrigada Fabi, Leandra e Karen pela força e carinho vocês se tornaram grandes amigas para mim. Agradeço também as Doutoradas: Helena Deker, Simone Molz e Ana Zeni mulheres maravilhosas que me incentivaram e me inspiraram durante minha formação acadêmica, obrigada pela amizade.

Agradeço a Cláudia pelos ensinamentos, pela amizade, parceria e conselhos durante todos esses anos.

Ao pessoal dos outros laboratórios em especial a Ana Paula e Débora pelos empréstimos e trocas de experiências em nossa técnica preferida western blot. Agradeço a Aline pela ajuda na medida da atividade dos complexos mitocondriais.

Agradeço a prof. Dra Manuela G. López pela supervisão durante meu doutorado sanduiche na Universidade Autônoma de Madri. Agradeço também aos colegas de laboratório que contribuíram para a realização desse estágio.

Agradeço a Pós-Graduação em Neurociências e ao secretário do curso, Nivaldo, pela sua dedicação.

Agradeço aos professores do curso em especial e aos professores Nelson e Rodrigo pela ajuda e força durante o doutorado sanduiche e a professora Ana Lúcia por sua disponibilidade e atenção.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento da pesquisa com bolsa auxílio.
A CAPES pelo financiamento da bolsa de dourado sanduiche.
Agradeço ao pessoal do laboratório multiusuário de Estudos em
Biologia (LAMEB) do CCB UFSC
Agradeço a todos que direta o indiretamente contribuíram para
realização deste estudo.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Transmissão Glutamatérgica.....	1
1.2. Os transportadores de glutamato.....	3
1.3. Papel dos astrócitos na transmissão glutamatérgica.....	4
1.4. Excitotoxicidade glutamatérgica e Isquemia cerebral.....	6
1.4.1. Isquemia Cerebral e Inflamação.....	7
1.4.2. Canais de Potássio e Isquemia Cerebral.....	9
2. Transmissão Purinérgica.....	10
2.1 Derivados da Guanina.....	12
2.2 Efeitos extracelulares da GUO no SNC.....	13
3. OBJETIVOS	16
3.2 Objetivo Geral.....	16
3.3 Objetivos Específicos.....	16
CAPÍTULO 1	18
CAPÍTULO 2	26
CAPÍTULO 3	61
CAPÍTULO 4	81
CAPÍTULO 5	101
DISCUSSÃO	116
CONCLUSÃO	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

APRESENTAÇÃO

Esta Tese de Doutorado está organizada da seguinte forma: Introdução, Objetivos, Artigos científicos publicados, submetidos e em preparação para submissão, Resultados preliminares, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

A **Introdução** contém o embasamento teórico para a realização dessa Tese. Os

Materiais e métodos, os Resultados, assim como as Referências Bibliográficas específicas, encontram-se no corpo de cada trabalho, os quais estão apresentados na forma de **Artigos Científicos** em quatro capítulos. O quinto capítulo descreve resultados preliminares e que serão complementados posteriormente.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos.

A seção **Conclusões** descreve as conclusões gerais da Tese.

A seção **Referências Bibliográficas** apresenta as referências citadas na Tese.

Todos os capítulos foram desenvolvidos no laboratório de Neuroquímica 4, sob coordenação da Profa. Dra Carla I. Tasca. Os capítulos 1-2 foram em parte desenvolvidos na Universidade Autônoma de Madri sob coordenação da Profa. Dra Manuela García López. O capítulo 5 foi em parte desenvolvido no laboratório do professor Dr. Antônio Galina da UFRJ e no laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo da UFSC sob coordenação da Profa. Dra Alexandra Latini da UFSC.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura1. Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgicas...5

CAPÍTULO 1

Figure 1. Guanosine protects against cell death induced by Rot/oligo in SH-SY5Y neuroblastoma cells.....21

Figure 2. Evaluation of extracellular interaction sites and signaling pathways involved in guanosine-induced neuroprotection against cell death induced by Rot/oligo in SH-SY5Y neuroblastoma cells.....22

Figure 3. Guanosine induces Akt phosphorylation and inactivation of GSK-3 β by phosphorylation of its Ser-9.....22

Figure 4. Guanosine protects SH-SY5Y neuroblastoma cells by inducing HO-1 expression via PI3K/Akt.....23

Figure 5. Guanosine inhibits mitochondrial ROS production elicited by Rot/oligo in SH-SY5Y neuroblastoma cells.....24

Figure 6. Schematical representation of putative protective mechanism of guanosine.....24

CAPÍTULO 2

Figure 1. Guanosine prevents loss of mitochondrial membrane potential in hippocampal slices subjected to OGD via A₁ adenosine receptors activation.....44

Figure 2. Guanosine decreases ROS production in hippocampal slices subjected to OGD via A₁ adenosine receptor.....45

Figure 3. Guanosine prevents loss of mitochondrial membrane potential in hippocampal slices subjected to OGD via ERK 1/2 pathway activation.....46

Figure 4. ERK 1/2 activation is involved in reduction of ROS production promoted by guanosine in hippocampal slices subjected to OGD.....47

Figure 5. Guanosine inhibits NF- κ B activation in hippocampal slices subject to OGD: involvement of ERK 1/2 and A₁ adenosine receptor.....48

Figure 6. Guanosine reduces iNOS induction by OGD: involvement of ERK 1/2 and A₁ adenosine receptor.....49

Figure 7. Evaluation of involvement of G_{i/o} Protein on guanosine-induced modulation of glutamate uptake in hippocampal slices subjected OGD.....50

Figure 8. Evaluation of the involvement of ERK 1/2 and A ₁ adenosine receptor on guanosine-induced modulation of glutamate uptake in hippocampal slices subjected OGD.....	51
Figure 9. Evaluation of involvement of A _{2A} receptor on guanosine-induced modulation of glutamate uptake in hippocampal slices subjected OGD.....	52
Figure 10. Mechanism of cellular protection afforded by GUO against OGD.....	53

CAPÍTULO 3

Figure1. Guanosine counteracts glutamate release from hippocampal slices subjected to OGD.....	72
Figure2. Guanosine protects hippocampal slices against OGD.....	73
Figure 3. Evaluation of the involvement of PI3K/Akt pathway and reverse transporters activity in the neuroprotective effect of guanosine against OGD.....	74
Figure4. Guanosine partially prevents the decrease in glutamine synthetase activity in hippocampal slices subjected to OGD.....	75

CAPÍTULO 4

Figure 1. Guanosine protects against cell death induced by OGD in cortical astrocytes.....	92
Fig. 2. Guanosine inhibits ROS production elicited by OGD in astrocytic cells.....	93
Fig. 3. Evaluation of involvement of PI3K/AKT or MAPK/ERK pathways on guanosine-induced modulation of glutamate uptake.....	94
Fig. 4. Immunocytochemical analysis of GLT-1 expression in astrocytes subjected to OGD and treated with GUO.....	95

CAPÍTULO 5

Figura 1. Consumo de oxigênio em fatias de hipocampo submetidas à PGOR e/ou GUO.....	108
Figura 2. Efeito da privação de glicose e oxigênio e do tratamento com GUO sobre a atividade NADH desidrogenase.....	110
Figura3. Efeito da privação de glicose e oxigênio e do tratamento com GUO sobre a atividade do complexo II.....	111

Figura4. Efeito da privação de glicose e oxigênio e do tratamento com GUO sobre a atividade do complexo IV.....112

DISCUSSÃO

Figura 1. Resumo dos mecanismos neuroprotetores da GUO em células neurais e as possíveis vias de sinalização e sítios de interações envolvidos.....126

LISTA DE ABREVIATURAS

A₁R: receptor de adenosina tipo 1
A_{2A}R: receptor de adenosina tipo 2A
A_{2B}: receptor de adenosina do tipo 2B
A₃: receptor de adenosina do tipo 3
ADP: adenosina difosfato
Akt/PKB: proteína cinase B
AMPA: alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato
ATP: adenosina trifosfato
AVC: acidente vascular cerebral
BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro
BK: canal de K⁺ de alta condutância ativado por Ca²⁺
COX-2: ciclo-oxigenase-2
CoQ: coenzima Q
EAAC: carreador de aminoácidos excitatórios
EAAT: transportador de aminoácidos excitatórios
ERK: proteína cinase regulada por sinal extracelular
EROs: espécies reativas de oxigênio
FCCP: fluorocarbonil-cianeto fenilidrazona
FAD : flavina-adenina dinucleotídeo
FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo reduzida
GABA: Ácido gama-amino-butírico
GDP: guanosina-5'-difosfato
GLAST: transportador de glutamato e aspartato
GLT-1: transportador de glutamato 1
GLUT transportadores de glicose
GMP: guanosina-5'-monofosfato
GS: Glutamina sintase
GSK3β: glicogênio sintase cinase-3 β
GTP: guanosina-5'-trifosfato
GUO: guanosina
iGluR: receptores inotrópicos de glutamato
iNOS: óxido nítrico sintetase induzível
K_{ATP}: canal de K⁺ sensíveis ao ATP
LDH: lactato desidrogenase
MAPK: proteína cinase ativada por mitógenos
MEK: MAP cinase cinase
mGluR: receptores metabotrópicos de glutamato
MTT: 3-[4,5- Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo
Na⁺/K⁺ ATPase: sódio/potássio ATPase

NAD⁺ : Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NF-κB: fator nuclear kappa B
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO: óxido nítrico
P2X: receptores ionotrópicos de ATP
P2Y: receptores metabotrópicos de ATP
PGO: Privação de glicose e oxigênio
PI3K: proteína cinase de fosfatidilinositol 3
PKC: proteína cinase C
Rot/oligo: rotenona/oligomicina A
SH-SY5Y: células de neuroblastoma humano da linhagem SHSY-5Y
SNC: sistema nervoso central
TNFα: fator de necrose tumoral α

RESUMO

A guanosina (GUO) é um modulador endógeno da excitotoxicidade glutamatérgica e promove neuroproteção em modelos de neurotoxicidade *in vivo* e *in vitro*. A guanosina promove neuroproteção frente à privação de glicose e oxigênio (PGO) através da modulação da atividade do canal de potássio do tipo BK (canal de K^+ de larga condutância ativado por Ca^{2+}), ativação da via da PI3K e aumento da captação de glutamato. Neste trabalho demonstramos que a GUO (1 mM) protege culturas de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) da morte neuronal decorrente da superprodução de espécies reativas de oxigênio induzidas pela co-administração de rotenona e oligomicina A, através da ativação da via de sinalização celular proteína cinase dependente de fosfatidilinositol (PI3K)/proteína cinase B (Akt), inibição da enzima glicogênio sintase cinase (GSK-3 β)/PI3K/GSK-3 β e indução da enzima antioxidante heme oxygenase-1. Estes efeitos foram mediados pelo BK, e pelos receptores de adenosina do subtipo A_1R e A_2AR . Em fatias de hipocampo submetidas a um modelo de isquemia *in vitro* (PGO), o tratamento com GUO (100 μ M) previne o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a despolarização da membrana mitocondrial, inibiu a ativação do fator de transcrição NF- κ B e reduziu os níveis da iNOS induzidos pela PGO. A presença do inibidor da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) /proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e do antagonista de A_1R reverteram os efeitos neuroprotetores promovidos pelo tratamento com GUO. A GUO estimula a captação de glutamato através da ativação da via MAPK/ERK, mas não envolve ativação de A_1R . A GUO também reduz a liberação de glutamato e protege as fatias de hipocampo através da modulação do transporte reverso de glutamato. Adicionalmente, a PGO induz uma diminuição na atividade da glutamina sintetase e o tratamento com GUO reverte parcialmente este efeito. No entanto, a GUO não apresenta efeito sobre a redução da atividade dos complexos da cadeia respiratória e não previne a inibição da fosforilação oxidativa induzida pela PGO nas fatias de hipocampo de ratos. Avaliando-se o papel da GUO sobre as células astrocitárias corticais observamos que a GUO (10 μ M) protege contra a PGO através da estimulação da atividade dos transportadores de glutamato e diminuição da produção de EROs. Os efeitos da GUO sobre a modulação dos transportadores astrocitários de glutamato envolvem a ativação da via MAPK/ERK. Desta forma, a GUO um nucleosídeo endógeno e não tóxico pode conter a neuroinflamação e excitotoxicidade induzida pelo dano oxidativo

mitocondrial e pela isquemia apresentando um importante papel neuroprotetor.

Palavras chaves: guanosina, neuroproteção, sistema glutamatérgico, sistema purinérgico, canais de potássio, isquemia, dano oxidativo mitocondrial.

ABSTRACT

Guanosine (GUO) is an endogenous modulator of glutamatergic excitotoxicity and promotes neuroprotection in *in vitro* and *in vivo* models of neurotoxicity. Guanosine promotes neuroprotection against oxygen and glucose deprivation (OGD) by increasing glutamate uptake through modulation of BK potassium channels (Ca²⁺-activated large-conductance K⁺ channels) and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway. In the present study, GUO (1 mM) protected human neuroblastoma cell cultures (SH-SY5Y) from neuronal death due to overproduction of reactive oxygen species (ROS) induced by co-administration of rotenone and oligomycin-A, by activating the PI3K/protein kinase B (Akt) cell signaling pathway, glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 β) and induction of the antioxidant enzyme heme oxygenase-1. These effects on SH-SY5Y were mediated via BK channels and the adenosine receptors A₁R and A_{2A}R. In hippocampal slices subjected to an ischemic *in vitro* model (OGD), GUO (100 μ M) treatment prevented the excessive ROS production, mitochondrial membrane depolarization, inhibited the activation of the nuclear transcription factor NF- κ B and reduced inducible Nitric oxide synthase (iNOS) levels induced by OGD. The mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular-signal regulated kinase (ERK) kinase (MEK) inhibitor, PD98059 and the A₁R antagonist, DPCPX, abolished GUO-induced neuroprotective effects. GUO stimulated glutamate uptake through activation of MAPK/ERK pathway, but did not involve activation of A₁R. GUO also counteracted the glutamate release induced by OGD in hippocampal slices through modulation of the reverse activity of glutamate transporters. Additionally, OGD induced a decrease in glutamine synthetase activity and GUO treatment partially reversed this effect. However, GUO was not able to prevent the reduction of respiratory chain complexes activity and inhibition of oxidative phosphorylation induced by OGD in rat hippocampal slices. The evaluation of GUO's role on cortical astrocytic cells showed that GUO (10 μ M) protects against OGD by stimulating the activity of glutamate transporters and decreasing ROS production. GUO's effects on modulation of astrocytic glutamate transporters involved MAPK/ERK activation. In conclusion, GUO affords neuroprotection against ischemic and oxidative damage through the modulation of glutamatergic and purinergic systems, activation of BK potassium channels and involving the activation of PI3K and MAPK/ERK signaling pathways. Therefore,

GUO is an endogenous and non-toxic nucleoside that may counteract neuroinflammation and excitotoxicity, presenting a potential neuroprotective role.

Key words: guanosine, neuroprotection, glutamatergic system, purinergic system, potassium channel, ischemia, mitochondrial oxidative damage.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transmissão Glutamatérgica

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, desempenhando importante papel na manutenção da atividade nervosa central e em fenômenos plásticos vinculados à aprendizagem e à memória (MELDRUM, 2000). Os neurônios glutamatérgicos são distribuídos através de todo o SNC sendo encontrado em maiores quantidades no córtex cerebral e região límbica. As sinapses glutamatérgicas compreendem cerca de 40% de todas as sinapses encontradas no cérebro (FAIRMAN & AMARA, 1999).

Além de sua fundamental importância como neurotransmissor, o glutamato apresenta múltiplos papéis no cérebro de mamíferos podendo ser precursor para a síntese do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA), servindo no metabolismo intermediário como substrato energético, fazendo parte da composição de diferentes derivados de aminoácidos como, por exemplo, proteínas e do peptídeo antioxidante glutatona.

No SNC o glutamato pode ser sintetizado *de novo* a partir da glicose, que entra no cérebro através de uma família de transportadores de glicose (GLUT) que estão presentes nas células do endotélio, astrócitos, neurônios e possivelmente, em outras células do encéfalo (QUTUB & HUNT, 2005). A glicose é primeiramente captada no cérebro pelos astrócitos onde pode ser convertida em glicogênio por meio de ação da enzima glicogênio sintetase (LOMAKO et al., 1993) ou a piruvato via glicólise. Parte do piruvato é convertido em lactato pela lactato desidrogenase (LDH) e outra parte entra no ciclo do ácido tricarboxílico onde é convertida a α -cetoglutarato que por sua vez recebe um grupamento amino de outro aminoácido através de uma reação de transaminação originando o glutamato. O glutamato também pode ser sintetizado a partir da glutamina através do ciclo glutamato-glutamina, o qual transfere glutamina dos astrócitos para os neurônios, e é um passo fundamental para a síntese de glutamato pelos neurônios.

A internalização do glutamato em vesículas sinápticas ocorre através de transportadores vesiculares de glutamato que são expressos tanto em neurônios como em astrócitos (OZKAN & UEDA, 1998; BEZZI et al., 2004). Em resposta a altas concentrações de íons cálcio (Ca^{2+}), tipicamente resultantes de potenciais de ação, as vesículas se fundem com a membrana plasmática, liberando o glutamato para a fenda sináptica, mecanismo conhecido como exocitose. O glutamato presente

na fenda sináptica interage com receptores presentes nas membranas pré e pós-sinápticas bem como com receptores presentes nas células gliais (Fig. 1). Os receptores glutamatérgicos são divididos em duas categorias: ionotrópicos (iGluR) que são canais iônicos dependentes da ativação por ligantes específicos e metabotrópicos (mGluR) que tem sua atividade acoplada a uma proteína-G.

Os iGluR são canais iônicos multiméricos e a união de agonistas a esses receptores leva a alteração conformacional do canal, o que aumenta a probabilidade de abertura do mesmo e acarreta em influxo de íons. Distintas famílias de mGluR têm sido identificadas farmacologicamente por suas afinidades com agonistas sintéticos. São eles: alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato (AMPA), Cainato (KA) e N-metil-D-aspartato (NMDA)(MADDEN, 2002). Os receptores AMPA são distribuídos igualmente pelo SNC sendo ricamente expressos no hipocampo. Este receptor permite a entrada de íons sódio (Na^+), porém quando a subunidade GluR2 está ausente na sua conformação este se torna permeável a íons Ca^{2+} . O receptor KA é encontrado no hipocampo, córtex, estriado, cerebelo, amígdala, hipotálamo, medula espinhal e na retina. Os receptores KA diferenciam-se dos receptores AMPA pela menor corrente conduzida e pela cinética de desativação mais lenta (HUETTNER, 2003). O receptor NMDA é encontrado em todo o cérebro, sendo localizado principalmente no cérebro anterior e na região CA1 do hipocampo. O potencial de repouso deste receptor é mantido por um íon Mg^{2+} . Quando ocorre despolarização da membrana há passagem de íons através deste receptor. A ativação de receptores NMDA permite o influxo de grandes quantidades de Ca^{2+} extracelular para o interior da célula (OZAWA et al., 1998).

Existem 8 tipos de mGluR acoplados a proteína-G e são nomeados de mGluR1 ao 8. Eles foram identificados e classificados em 3 grupos (I, II e III), baseados na homologia da sequência de aminoácidos, vias de transdução de sinais e seletividade farmacológica (KENNY & MARKOU, 2004). O grupo I (mGluR1 e mGluR5) está predominantemente localizado pós-sinápticamente onde se acopla à proteína G para ativar a fosfolipase C (PLC), que catalisa a produção de inositol-(1,4,5)-trifosfato e por meio disso dispara a liberação de íons Ca^{2+} dos estoques intracelulares. O grupo II de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR2 e mGluR3) é encontrado tanto pré como pós-sinápticamente e são acoplados à proteína Gi/o modulando a atividade da adenilato ciclase. Por último, o grupo III de receptores mGlu (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) está

predominantemente localizado pré-sinápticamente onde atua como autorreceptor, e também está acoplado às proteínas-G modulando a atividade da adenilato ciclase (KIM et al., 2008).

1.2. Os transportadores de glutamato

Os níveis de glutamato na fenda sináptica são cuidadosamente regulados a fim de preservar a integridade da transmissão sináptica excitatória (ROTHSTEIN et al., 1993). Esta regulação ocorre através da interação entre a liberação de glutamato e a retirada desse neurotransmissor da fenda sináptica (KANAI & HEDIGER, 2003). O glutamato é ativamente removido da fenda sináptica e transportado para o citoplasma contra o seu gradiente de concentração através de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT) dependentes de sódio de alta afinidade ao glutamato que estão presentes em células neuronais e astrocitárias (Fig.1) (DANBOLT, 2001).

Foram identificados e clonados 5 subtipos de transportadores de glutamato dependentes de Na^+ estes possuem diferentes distribuições regionais e celulares através do cérebro além de possuírem características moleculares e farmacológicas distintas (BEART & O'SHEA, 2007). O transportador glial, GLAST (em humanos denominados EAAT1) é encontrado na glia de Bergmann da camada molecular do cerebelo, nas células de Muller da retina em menor quantidade em regiões como o hipocampo. Já o transportador glial, GLT-1 (em humanos denominados EAAT2) principalmente encontrado no córtex e hipocampo e em menores quantidades no cerebelo (HUANG & BERGLES, 2004).

O transportador neuronal de glutamato mais amplamente distribuído no cérebro é o carreador de aminoácidos excitatórios 1 (EAAC1 - homólogo humano, EAAT3). O EAAC1 encontrado em regiões perisinápticas de sinapses excitatórias. A presença do transportador EAAC1 na região CA1 do hipocampo pode contribuir com o tamponamento de glutamato na fenda sináptica bem como regular a ativação de receptores NMDA nas sinapses ativas circundantes (SCIMEMI et al., 2009). Entretanto, o EAAC1 contribui em menor quantidade para a retirada do glutamato da fenda sináptica do que o transportador GLT-1 (NIEOULLON et al., 2006). Os outros subtipos de transportadores de glutamato incluem EAAT4, localizado em células de Purkinje e o EAAT5, localizado em neurônios retinianos (DANBOLT, 2001).

1.3. Papel dos astrócitos na transmissão glutamatérgica

As células astrocitárias são as maiores responsáveis pelo retirada do glutamato da fenda sináptica (KANAI & HEDIGER, 2003). A retirada do glutamato da fenda sináptica pelos transportadores dependentes de Na^+ ocorre da seguinte forma: uma molécula de glutamato liga-se a face externa do transportador juntamente com dois íons Na^+ e um próton. Este evento desencadeia uma alteração conformacional do transportador permitindo que o glutamato, os íons Na^+ e o próton sejam liberados no citoplasma da célula em contrapartida ocorre a saída de um íon K^+ . Este mecanismo depende da atividade da Na^+/K^+ ATPase, o que despense um grande consumo de ATP (CAMACHO & MASSIEU, 2006). Recentemente foi demonstrado que ocorre compartimentalização entre o transportador GLUT-1, a Na^+/K^+ ATPase, enzimas da via glicolítica e a mitocôndria que são as principais fontes energéticas para a funcionalidade do mecanismo de captação de glutamato (GENDA et al., 2011). Então, a manutenção dos níveis de ATP é essencial para o controle da transmissão glutamatérgica uma vez que a captação de glutamato requer grande demanda energética.

Uma vez presente no citoplasma das células astrocitárias, o glutamato reage com amônia e forma glutamina através da atividade da enzima glutamina sintetase, uma enzima presente somente em células gliais. Os astrócitos liberam a glutamina para o espaço extracelular, essa por sua vez é captada pelos neurônios onde é novamente convertida a glutamato por ação da glutaminase ativada por fosfato fechando assim o ciclo glutamato-glutamina (SCHOUSBOE & WAAGEPETERSEN, 2005).

A atividade dos transportadores de glutamato pode ser regulada através do controle de expressão, disponibilidade na superfície celular e por fosforilação (ANDERSON & SWANSON, 2000). A modulação de vias de sinalização intracelular por fatores tróficos ou moléculas neuroprotetoras podem alterar a disponibilidade e a atividade dos transportadores de glutamato (GUILLET et al., 2005; MOLZ et al., 2011; NIEOULLON et al., 2006). Além disso, os transportadores de glutamato são vulneráveis ao aumento das espécies reativas de oxigênio no interior da célula devido a presença de sítios de cisteína regulados pelo estado redox, assim um aumento na produção de espécies reativas de Oxigênio (EROs) no interior celular pode resultar em uma diminuição na captação de glutamato (TROTTI et al., 1996; TAMAHARA et al., 2002).

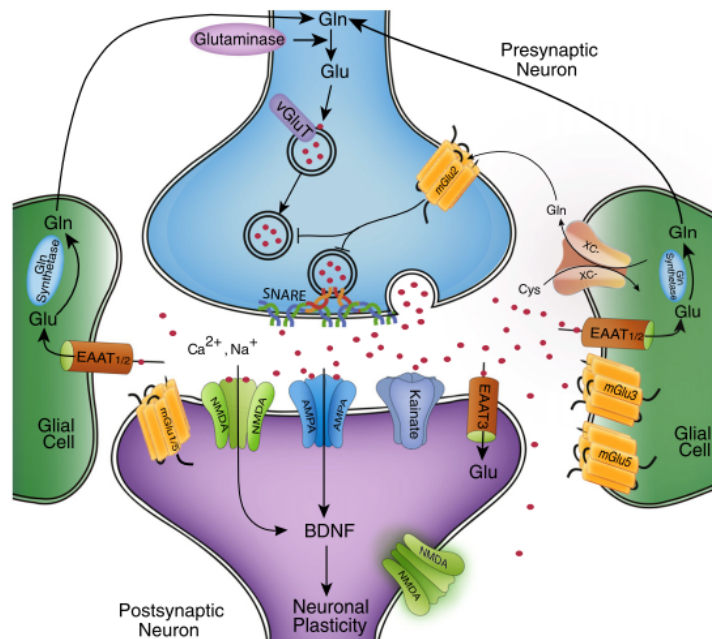


Figura 1. Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica: O glutamato liberado na fenda sináptica interage com seus receptores de membrana (AMPA, KA, NMDA e mGluR). A retirada do glutamato da fenda sináptica ocorre através da atividade de seus transportadores de membrana localizados nos astrócitos (GLT-1, GLAST) e nos neurônios (EAAC1 e EAAT4). Os trocadores de aminoácido (Xc^-) presentes nas células astrocíticas contribuem para a reciclagem do glutamato. Nos astrócitos, o glutamato (Glu) pode ser convertido em glutamina (Gln) pela glutamina sintetase, que é exportada para o espaço extracelular para ser captada pelos neurônios a onde a Gln é novamente convertida em Glu. O Glu então é armazenado nas vesículas sinápticas através da atividade dos transportadores vesiculares de glutamato (vGLUT) para então ser sinápticamente libertado de uma forma dependente da voltagem através da interações vesiculares com proteínas do complexo SNARE (adaptado de (NICIU et al., 2012)).

Os astrócitos também podem controlar a excitabilidade dos neurônios glutamatérgicos através da liberação de glutamato para o espaço extracelular por exocitose dependente de Ca^{2+} (PARPURA et al., 1994). Estas células também utilizam de outros mecanismos para liberar glutamato para o espaço extracelular estes envolvem: a reversão dos transportadores de glutamato; o trocador cisteína/glutamato; canais iônicos regulados por alterações no volume celular (VRACS); receptores purinérgicos do subtipo P2X7; hemicanais (PARPURA et al., 2010).

1.4. Excitotoxicidade glutamatérgica e Isquemia cerebral

O termo excitotoxicidade foi criado para definir a morte neuronal causada pela administração exógena de altas concentrações de glutamato ou compostos com ação agonística nos receptores glutamatérgicos (OLNEY, 1990). Assim, demonstrou-se que além de seu importante papel na transmissão fisiológica, o neurotransmissor excitatório glutamato apresenta um papel crucial no dano neural em condições patológicas. Este efeito neurotóxico é resultado do aumento da concentração de glutamato durante a transmissão sináptica (MELDRUM, 2000). A estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos pode ter inúmeros efeitos prejudiciais, como o influxo maciço de Ca^{+2} , liberação de óxido nítrico (NO), ativação de proteases e aumento da produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (WANG & QIN, 2010).

Os receptores ionotrópicos do subtipo NMDA estão diretamente envolvidos com a excitotoxicidade glutamatérgica (CHOI et al., 1988). A hiperestimulação de receptores NMDA permite a entrada de grandes concentrações de íons Ca^{+2} no interior das células o que pode ativar cascatas de sinalização relacionadas com processos patológicos. Essas cascatas incluem a ativação de enzimas catabólicas como fosfolipases, endonucleases ou proteases como a caspase e calpaína (MATTSON, 2003).

A mitocôndria contribui para a sobrevivência celular, pois possui a capacidade de sequestrar grandes quantidades de Ca^{2+} contribuindo para o tamponamento intracelular deste íon. No entanto, o acúmulo anormal de Ca^{2+} no interior da mitocôndria pode resultar em disfunção mitocondrial uma vez que o Ca^{2+} é sequestrado dentro da matriz mitocondrial através de um gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons resultando em despolarização e consequente perda do potencial de membrana mitocondrial (ATLANTE et al., 2001). Além disso, o influxo de Ca^{2+}

na mitocôndria pode resultar em acidose metabólica, inibição da fosforilação oxidativa, formação de poros de permeabilidade transitória, colapso bioenergético e excessiva produção de EROs (PIVOVAROVA & ANDREWS, 2010).

O evento de excitotoxicidade está associado a diferentes patologias do SNC em doenças neurodegenerativas como nas enfermidades de Parkinson (BOLL et al., 2011) e Alzheimer (CASSANO et al., 2012) e também em doenças neuropsiquiátricas como a depressão (SANACORA et al., 2008), além de ser um evento chave em eventos agudos como na isquemia cerebral (TYMIANSKI, 2011).

Acidentes vasculares cerebrais (AVC) são a segunda maior causa de morte e principal causa de incapacidade na população mundial. Segundo dados do Ministério da Saúde, a taxa de mortalidade para doenças cerebrovasculares foi de 51,8 óbitos por 100 mil habitantes em 2009. Desde a década de 70 as doenças cerebrovasculares são consideradas a primeira causa de morte no Brasil. Dos casos de AVC 85% são isquêmicos e 15% hemorrágicos. A isquemia cerebral consiste na interrupção do fluxo sanguíneo cerebral que resulta em uma grande degeneração das células neurais e conseqüente perda das funções cerebrais (MATTSON et al., 2000). Regiões como o hipocampo e o córtex cerebral são particularmente sensíveis à isquemia (YUE et al., 1997). A privação de energia decorrente da disfunção mitocondrial que acompanha eventos isquêmicos resulta em alterações no gradiente iônico de membrana visto que a sua manutenção depende da atividade de bombas iônicas como a Na^+/K^+ -ATPase que por sua vez são responsáveis por grande parte do consumo de energia no cérebro (DOYLE et al., 2008). A perda do gradiente iônico resulta em despolarização da membrana celular ativando assim uma variedade de canais sensíveis a voltagem e receptores iônicos. A despolarização da membrana juntamente com o prejuízo metabólico e a perda da homeostasia iônica tem como consequência uma maciça liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato podendo ativar a cascata de morte excitotóxica (CAMACHO & MASSIEU, 2006)

Dentre os múltiplos processos deletérios que ocorrem durante a isquemia/reperfusão cerebral, a excessiva produção de EROs tem sido considerado um importante mediador da lesão cerebral decorrente deste evento. O cérebro é particularmente vulnerável a excessiva produção de EROs, pois os neurônios possuem baixos níveis de antioxidantes endógenos (COYLE & PUTTFARCKEN, 1993). No tecido cerebral isquêmico a produção de EROs é acelerada por enzimas citosólicas pró-

oxidantes como a xantina oxidase e a NAPH oxidase, pela atividade mitocondrial, por inativação de sistemas detoxificantes e falha na reposição adequada de antioxidantes (CRACK & TAYLOR, 2005). A geração de EROs intracelular durante a isquemia e reperfusão causa a destruição de macromoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos além de ativar vias de sinalização que culminam em morte celular apoptótica.

1.4.1. Isquemia Cerebral e Inflamação

As vias de sinalização intracelular ativadas por EROs podem induzir uma resposta inflamatória através da ativação do fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B) (GLOIRE et al., 2006). O fator de transcrição NF- κ B é crucial em uma série de processos celulares, tais como a proliferação, inflamação e apoptose. O NF- κ B reside no citoplasma celular e é constituído de três subunidades protéicas uma proteína inibitória denominada I κ B e um dímero que forma o fator de transcrição. A ativação do NF- κ B envolve a fosforilação da subunidade inibitória I κ B que posteriormente é ubiquitinada e subseqüentemente degradada permitindo a liberação do NF- κ B (MAY & GHOSH, 1999). A ativação desse fator de transcrição vem sendo co-relacionada com a morte celular decorrente de eventos isquêmicos (RIDDER & SCHWANINGER, 2009). O NF- κ B é ativado após a oclusão da artéria cerebral média em células neurais e astrocitárias e sua ativação contribui para o dano celular induzido pelo evento isquêmico (ZHANG et al., 2005). A ativação do NF- κ B promove a expressão de uma variedade de genes relacionados com a patologia da isquemia cerebral, incluindo aqueles envolvidos na resposta inflamatória, como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alpha) e enzimas como óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (SETHI et al., 2008). Esta relação já foi observada em fatias de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO), onde a inativação do NF- κ B é acompanhada de redução nos níveis da enzima iNOS e proteção celular (EGEA et al., 2012; MARTIN-DE-SAAVEDRA et al., 2011).

A ativação de iNOS durante a isquemia cerebral resulta em grande produção de óxido nítrico (NO) que deixa de exercer seus efeitos fisiológicos como sinalizador celular tornando-se uma neurotoxina (BAL-PRICE & BROWN, 2001; MORO et al., 2004). O aumento de NO pode resultar em inibição da atividade do complexo-I da cadeia transportadora de elétrons, além de reagir com o ânion superóxido formando peroxinitrito, um potente oxidante, estes eventos

desencadeados pelo NO resultam em redução dos níveis de ATP e morte celular (BROWN, 2010).

Além disso, durante a isquemia ocorre ativação do receptor NMDA que através de proteínas de ancoramento como a proteína de densidade pós-sináptica (PSD-95) permite a interação deste segundo mensageiro com enzimas intracelulares como a óxido nítrico sintase neural (NOS) (SATTLER et al., 1999;). Uma vez que o receptor NMDA permite o influxo de Ca^{2+} , este interage com a calmodulina dando origem ao complexo cálcio-calmodulina (CaM-cinase II), que por sua vez ativa a NOS neuronal. Portanto, o influxo de Ca^{2+} mediados por NMDAR durante o evento isquêmico pode ativar a a NOS neuronal contribuindo para o aumento da na produção de NO e neurotoxicidade.

Assim, o uso de agentes que modulem a morte celular excitotóxica seja através da modulação da atividade dos transportadores de glutamato, reduzindo o excesso da produção de EROs ou minimizando o evento inflamatório é uma importante estratégia neuroprotetora frente a danos isquêmicos no SNC.

1.4.2. Canais de Potássio e Isquemia Cerebral

A modulação da atividade de canais de potássio tem sido sugerida como uma importante ferramenta neuroprotetora durante eventos de isquemia cerebral (SUN & HU, 2010). Os canais de K^+ do tipo sensíveis ao ATP são regulados pela concentração de ATP intracelular, portando o aumento da concentração intracelular de ATP inibe esses canais enquanto o aumento dos níveis de ADP estimula sua abertura (BURG et al., 2006). Quando ocorre uma diminuição dos níveis de energia na célula, por exemplo, durante um evento isquêmico, uma das respostas celulares afim de proteger as células é a abertura dos canais de K^+ sensíveis ao ATP promovendo hiperpolarização da membrana celular diminuindo os níveis do íon Ca^{2+} e proteção celular. Tem sido demonstrado que camundongos transgênicos que não expressam canais de K^+ sensíveis ao ATP apresentam um maior dano neuronal após a oclusão das carótidas (SUN et al., 2006) sendo que a ativação desses canais protege neurônios da região CA1 do hipocampo contra apoptose induzida por hipóxia (HUANG et al., 2006), assim a ativação desses canais é uma importante estratégia protetora em eventos onde ocorre desbalanço iônico e diminuição nos níveis de ATP.

Outro subtipo de canal de potássio envolvido como eventos isquêmicos são os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} . Esses canais são ativados em resposta a um aumento da concentração de íons Ca^{2+} no interior da célula e em decorrência da despolarização da membrana celular (BURG et al., 2006). Os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} de

alta condutância (BK) são ativados durante o potencial de ação, acelerando a repolarização da membrana (SAH & DAVIES, 2000). Esses canais funcionam como reguladores negativos da entrada de Ca^{2+} na célula e regulam a excitabilidade neuronal e a liberação de neurotransmissores podendo ser importantes alvos de proteção celular (GHATTA et al., 2006; HU et al., 2001). Também já foi demonstrado que animais transgênicos que não expressam os canais BK, apresentam maior volume de infarto cerebral bem como apresentam aumento de morte celular em modelos animais de isquemia cerebral tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LIAO et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou através da utilização de um modelo de isquemia cerebral *in vitro*, que a guanosina (GUO) protege neurônios hipocâmpais da privação de glicose e oxigênio via ativação de canais de K^+ (OLESKOVICZ et al., 2008). Através de evidências farmacológicas com o uso de inibidores seletivos, determinamos que os canais de K^+ sensíveis ao ATP não estão envolvidos no efeito protetor da GUO, por outro lado demonstramos a participação dos canais BK como mediadores do papel protetor da GUO tanto sobre a viabilidade celular como sobre a estimulação da captação de glutamato (DAL-CIM et al., 2011). Então, considerando que a GUO modula este subtipo de canal de potássio, a consequente regulação das concentrações de Ca^{2+} na célula e uma possível diminuição na produção de EROs, contribuiria para reverter a vulnerabilidade dos transportadores de glutamato ao dano oxidativo. Além disso, como a manutenção do gradiente iônico transmembrana é fundamental para que ocorra a captação de glutamato (DANBOLT, 2001), a modulação dos canais BK pela GUO favoreceria o restabelecimento do gradiente iônico e consequente funcionalidade dos transportadores de glutamato após um dano isquêmico/oxidativo.

2. Transmissão Purinérgica

As purinas extracelulares derivadas da adenina, representadas pela adenosina-5'-trifosfato (ATP), adenosina-5'-difosfato (ADP), adenosina-5'-monofosfato (AMP) e adenosina e as purinas extracelulares derivadas da guanina, representadas pela guanosina-5'-trifosfato (GTP), guanosina-5'-difosfato (GDP), guanosina-5'-monofosfato (GMP) e guanosina (GUO) são importantes moléculas sinalizadoras intercelulares (CICCARELLI et al., 2001).

Os efeitos extracelulares das purinas são mediados pela ativação de receptores purinérgicos. Duas famílias principais de receptores purinérgicos foram identificadas, os receptores P1 ou de adenosina e receptores P2, que reconhecem primariamente ATP, ADP.

Os receptores P2 são divididos de acordo com a estrutura molecular e o mecanismo de transdução do sinal em P2X, que são uma família de 7 subtipos de receptores do tipo canal iônico, e os P2Y, que são uma família de 8 subtipos de receptores acoplados a proteína-G (BURNSTOCK, 2007). A ativação de receptores P2X torna esses canais permeáveis a íons Na^+ , Ca^{+2} e K^+ , enquanto a ativação dos receptores metabotrópicos P2Y, via ativação de proteínas-G podem ativar segundos mensageiros como a fosfolipase C e desencadear a liberação intracelular de Ca^{+2} ou afetar a atividade da adenilato ciclase alterando os níveis de AMP cíclico (FIELDS & BURNSTOCK, 2006).

Estão bem identificados quatro tipos de receptores de adenosina, A_1R , $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$, $\text{A}_{2\text{B}}\text{R}$ e A_3R , todos acoplados a proteínas-G (FREDHOLM, 1995). O receptor de adenosina mais abundante no SNC é o receptor inibitório A_1R , este receptor tem sua atividade acoplada a uma proteína-G β/γ e sua ativação regula negativamente a atividade da adenilato ciclase diminuindo os níveis de AMP cíclico. O subtipo $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ é predominantemente encontrado no estriado, núcleo accumbens e em menor concentração em outras regiões como o hipocampo e sua atividade é normalmente acoplada a atividade de uma proteína-G α ou *Golf* estimulando a atividade da adenilato ciclase aumentando os níveis de AMP cíclico. Os receptores do tipo $\text{A}_{2\text{B}}\text{R}$ são expressos em baixos níveis no cérebro, já os receptores A_3R apresentam uma expressão aparentemente moderada no cerebelo humano e no hipocampo (PALMER & STILES, 1995).

O efeito mais evidente da adenosina em circuitos neuronais de mamíferos adultos é deprimir seletivamente a transmissão sináptica excitatória (DUNWIDDIE & HAAS, 1985). Isto ocorre através da ativação de A_1R , que estão localizados tanto na região pré-sináptica e pós-sináptica ou em regiões não sinápticas. Este mecanismo de inibição da transmissão excitatória é decorrente da inibição de canais de Ca^{+2} pela ativação de A_1R diminuindo assim os estímulos que evocam a liberação de glutamato nas sinapses no SNC (AMBROSIO et al., 1997). A ativação de receptores A_1R em cultura de neurônios hipocámpais inibe correntes mediadas pela atividade de receptores NMDA (DE MENDONCA et al., 1995). Além disso, a ativação de receptores A_1R leva a abertura de canais de potássio promovendo hiperpolarização da membrana neuronal.

Por modular efeitos celulares, como a liberação de neurotransmissores excitatórios, controlar o influxo de Ca^{+2} , controlar o potencial de membrana celular a ativação de receptores A_1R pode ser uma importante estratégia neuroprotetora frente a eventos

isquêmicos onde é observado alteração de todos os parâmetros celulares acima mencionados. Corroborando com o descrito acima, já foi demonstrado que a ativação de receptores A₁R, bem como a inibição da recaptção de adenosina, diminuem a extensão do dano neural em eventos isquêmicos (GOMES et al., 2011).

A ação da adenosina em receptores A_{2A}R está associada ao desenvolvimento de neurotoxicidade, dano neuronal e morte celular. O bloqueio farmacológico dos A_{2A}R ou a inativação genética destes receptores confere neuroproteção em modelos animais de isquemia *in vivo* (CHEN et al., 1999). Adicionalmente, ativação de receptores A_{2A}R facilita a liberação de glutamato em condições normais e durante eventos isquêmicos. Assim a união da adenosina aos receptores A_{2A}R exerce o efeito contrário: facilita a liberação de glutamato e está envolvida na potenciação dos danos ao tecido nervoso (CUNHA, 2005).

2.1. Derivados da Guanina

As purinas derivadas da guanina são classicamente conhecidas por seus efeitos intracelulares como fonte de energia celular e transdução de sinal. Recentemente, tem se dado grande atenção aos efeitos extracelulares desencadeados pelos derivados da guanina, em especial pelo nucleosídeo GUO, seja através de sua modulação sobre o sistema glutamatérgico ou por seus efeitos tróficos em células neurais e gliais (RATHBONE et al., 2008; SCHMIDT et al., 2007).

No SNC a GUO é liberada para o espaço extracelular pelas células gliais tanto em condições basais com em condições tóxicas (CICCARELLI et al., 2001). Essa liberação pode ocorrer através de transportadores de nucleosídeos presentes nas membranas celulares. Esses transportadores são uma família de proteínas que possuem diferentes afinidades por substratos, diferentes distribuições em tecidos, são espécie-específicos e sensíveis ao bloqueio por agentes farmacológicos. Os transportadores de nucleosídeos podem ser classificados em duas categorias: (i) transportadores equilibrativos, os quais transportam nucleosídeos das purinas e pirimidinas de maneira bidirecional, segundo o gradiente de concentração; (ii) transportadores concentrativos, que medeiam o influxo de nucleosídeos acoplado ao gradiente transmembrana de Na⁺.

A conversão extracelular de GUO a partir de nucleotídeos é outro mecanismo importante para manter as concentrações extracelulares deste nucleosídeo. Em estudo realizado em nosso laboratório, observou-se que o nucleotídeo GTP pode ser captado e armazenado em vesículas sinápticas sugerindo assim um possível mecanismo de liberação deste nucleotídeo para a fenda sináptica (SANTOS et al., 2006). O GTP

presente no espaço extracelular pode dar origem ao nucleosídeo GUO através da ação de ectoenzimas, mantendo as concentrações extracelulares de GUO no espaço sináptico (ZIMMERMANN, 1996).

2.2. Efeitos extracelulares da GUO no SNC

Os efeitos extracelulares da GUO podem ser observados através do seu papel neurotrófico, sobre a proliferação astrocitária, crescimento neurítico e liberação de fatores neurotróficos (CICCARELLI et al., 2001; GYSBERS & RATHBONE, 1996; RATHBONE et al., 1999). Em nosso laboratório foi demonstrado que GMP ou GUO aumentam o número de neurônios cultivados em co-cultura com astrócitos além de alterar a organização de proteínas da matriz extracelular, laminina e fibronectina, promovendo uma melhor adesão dos neurônios sobre o substrato de astrócitos, o que pode ter um importante papel na neurogênese e na migração neuronal (DECKER et al., 2007). Em culturas de neurônios cerebelares, observamos um aumento na sobrevivência neuronal induzida por GUO e GMP, através da interação com os receptores A_{2A}R (TASCA et al., 2010).

Recentemente tem se dado grande atenção ao potencial efeito neuroprotetor do nucleosídeo GUO em modelos experimentais de excitotoxicidade glutamatérgica (RATHBONE et al., 2008; SCHMIDT et al., 2007). Em modelos animais *in vivo* já foi observado que a administração sistêmica de GUO protege contra convulsões induzidas por agonista do receptor NMDA, o Ácido Quinolínico (DE OLIVEIRA et al., 2004; SCHMIDT et al., 2000; VINADE et al., 2003). Além disso, o Ácido Quinolínico pode aumentar a liberação de glutamato em preparações de sinaptossomas e reduzir a captação glial de glutamato (TAVARES et al., 2002), aumentando a concentração extracelular de glutamato, entretanto esse aumento é revertido na presença de GUO (TAVARES et al., 2005). A neuroproteção promovida pela GUO frente a danos excitotóxicos também já foi observada em fatias de hipocampo de ratos submetidas ao tratamento com glutamato (MOLZ et al., 2011). O tratamento com GUO também é capaz de reverter o dano oxidativo cerebral e o prejuízo cognitivo induzido em modelo animal de sepse (PETRONILHO et al., 2012).

O papel neuroprotetor da GUO em eventos isquêmicos também vem sendo investigado na literatura (THAUERER et al., 2012). O tratamento com GUO é capaz de prevenir o prejuízo cognitivo e diminuir o volume de infarto celular em cérebro de ratos submetidos a um modelo animal de isquemia cerebral (CHANG et al., 2008; RATHBONE et al., 2011). Em cultura de células PC12 e neurônios cerebelares submetidos à hipóxia, o tratamento com GUO promove

proteção celular e induz crescimento neurítico (THAUERER et al., 2010). A GUO também protege fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO (OLESKOVICZ et al., 2008). Recentemente foi demonstrado que a administração crônica de GUO em ratos submetidos a um modelo de hipoperfusão cerebral não foi capaz de alterar o prejuízo cognitivo, porém o tratamento com GUO preveniu o dano hipocampal induzido pela hipoperfusão (GANZELLA et al., 2011).

Apesar de muitas evidências apontarem o efeito protetor da GUO, poucos estudos caracterizando os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na neuroproteção promovida pela GUO foram realizados e estes são de fundamental importância para compreensão do mecanismo neuroprotetor da GUO. Alguns estudos sugerem que os efeitos da GUO sobre a proliferação celular, proteção celular e crescimento neurítico envolvem a ativação de receptores de adenosina (CICCARELLI et al., 2000; D'ALIMONTE et al., 2007; TASCIA et al., 2010). No entanto, há evidências de que a GUO e o GTP se unam com baixa afinidade aos receptores das purinas da adenina (MULLER & SCIOR, 1993), sugerindo que a GUO apresenta um sítio de ligação distinto dos receptores clonados e identificados para as purinas da adenina. Estudos que dão embasamento a esta hipótese demonstraram que o GTP une-se a sítios específicos em células de feocromocitoma (PC12) (GYSBERS et al., 2000) e em membranas cerebelares de pintos, sendo que estes sítios não apresentam atividade enzimática (GTPásica) (TASCIA et al., 1999).

A análise de um possível sítio de interação para GUO (proteína receptora na membrana celular) demonstrou que os efeitos neuroprotetores promovidos pela GUO contra a PGO dependem da ativação do canal de potássio de alta condutância ativado por cálcio (canais BK) (DAL-CIM et al., 2011). Estudos prévios já haviam demonstrado que a GUO é capaz de induzir a expressão de canais de potássio retificadores em células astrocitárias (BENFENATI et al., 2006), demonstrando a importância desses canais de potássio nos efeitos desencadeados pela GUO.

O papel da GUO sobre a modulação dos transportadores de glutamato vem sendo implicado como um importante mecanismo de neuroproteção contra eventos de excitotoxicidade. O tratamento com GUO é capaz de prevenir a diminuição da captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos neonatos expostos a hipóxia (MORETTO et al., 2005). Com o intuito de investigar o mecanismo pelo qual a GUO estimula o transporte de glutamato, nosso grupo recentemente demonstrou que a GUO diminui a liberação de glutamato em fatias de

hipocampo submetidas à excitotoxicidade glutamatérgica, através da ativação da via da proteína cinase dependente de fosfatidilinositol (PI3K)/proteína cinase B (AKT) (MOLZ et al., 2011). Adicionalmente, demonstramos que a GUO estimula a captação de glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO através da ativação da via PI3K/AKT e do canal de potássio BK (DAL-CIM et al., 2011; MOLZ et al., 2011).

Como citado anteriormente, a via de sinalização da PI3K/AKT tem sido relacionada com os eventos neuroprotetores promovidos pela GUO (DAL-CIM et al., 2011; MOLZ et al., 2011). A GUO protege astrócitos tratados com estaurosporina (indutor de apoptose) através da ativação e aumento da expressão de fosfo-AKT (DI IORIO et al., 2004). A GUO também diminui a apoptose induzida pelo peptídeo beta-amiloide em cultura de neuroblastomas humanos através da ativação da PI3K e aumento da expressão de fosfo-AKT. A GUO diminui a inflamação e expressão de proteínas pró-inflamatórias em cultura de células da micróglia e este efeito está relacionado com a ativação da via da PI3K (D'ALIMONTE et al., 2007). Além da PI3K/AKT a GUO também exerce efeitos tróficos e neuroprotetores através da ativação da via da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) –proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) (DECKER et al., 2007; OLESKOVICZ et al., 2008; THAUERER et al., 2012).

No presente estudo demonstramos que GUO apresenta efeitos neuroprotetores frente ao dano oxidativo mitocondrial e iquêmico *in vitro*. Os efeitos protetores mediados pela GUO envolvem a modulação do sistema purinérgico através de receptores A_{2A} e A₁ e do canal de potássio do subtipo BK. A GUO ativa a via de sinalização celular PI3K/Akt/GSK3-β e induz a expressão da enzima antioxidante heme oxigenase-1. Além disso, demonstramos que a GUO protege frente a ao dano oxidativo e neuroinflamação induzida pelo dano isquêmico através da inibição do fator de transcrição NF-κB e redução dos níveis da enzima iNOS via ativação da MEK/ERK. O efeito neuroprotetor da GUO envolve a estimulação da captação de glutamato e indução da enzima glutamina sintetase durante o evento isquêmico. A GUO também é capaz de diminuir a liberação de glutamato decorrente da atividade reversa dos transportadores de glutamato. Dessa forma, a GUO apresenta um interessante efeito neuroprotetor frente ao dano isquêmico modulando o sistema glutamatérgico, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio e inflamação decorrente deste dano neuronal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar os mecanismos de ação protetora do nucleosídeo GUO em fatias de hipocampo e em cultura de células neurais submetidas à toxicidade induzida por modelos *in vitro* de isquemia ou dano oxidativo mitocondrial.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito neuroprotetor da GUO em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) submetidas a um dano oxidativo mitocondrial e os mecanismos de neuroproteção através da avaliação do envolvimento da via de sinalização PI3K/AKT e da enzima antioxidante heme oxigenase-1.
- Estudar o mecanismo de ação neuroprotetora da GUO em fatias de hipocampo de ratos submetidas a um modelo de isquemia cerebral *in vitro* (privação de glicose/oxigênio, PGO), analisando a produção de EROs, função mitocondrial, processos inflamatórios e modulação da captação de glutamato.
- Avaliar a participação de canais de potássio BK, dos receptores de adenosina A₁R e A_{2A}R, bem como das vias de sinalização intracelular PI3K/AKT e MAP ERK no efeito neuroprotetor da GUO em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO.
- Avaliar o mecanismo de neuroproteção da GUO em cultura primária de astrócitos corticais submetidas à PGO e seu possível efeito sobre a modulação do transporte de glutamato e envolvimento das vias de sinalização intracelular PI3K/AKT e MAP ERK.
- Avaliar o efeito da GUO e da PGO em fatias de hipocampo de ratos sobre o consumo de Oxigênio e a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

CAPÍTULO 1

*Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against
mitochondrial oxidative stress by inducing Heme oxygenase-1 via*

PI3K/Akt/GSK-3 β pathway

Neurochemistry International



Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway

Tharine Dal-Cim^{a,*}, Simone Molz^{a,1}, Javier Egea^b, Esther Parada^b, Alejandro Romero^{b,c}, Josiane Budni^a, María D. Martín de Saavedra^b, Laura del Barrio^b, Carla I. Tasca^{a,2}, Manuela G. López^{b,2}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^bInstituto Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología y Tóxicología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

^cDepartment of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 November 2011
Received in revised form 17 May 2012
Accepted 23 May 2012
Available online 7 June 2012

Keywords:
Guanosine
Neuroprotection
Reactive oxygen species
Akt phosphorylation
Heme oxygenase-1

ABSTRACT

Mitochondrial perturbation and oxidative stress are key factors in neuronal vulnerability in several neurodegenerative diseases or during brain ischemia. Here we have investigated the protective mechanism of action of guanosine, the guanine nucleoside, in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y, subjected to mitochondrial oxidative stress. Blockade of mitochondrial complexes I and V with rotenone plus oligomycin (Rot/oligo) caused a significant decrease in cell viability and an increase in ROS production. Guanosine that the protective effect of guanosine incubated concomitantly with Rot/oligo abolished Rot/oligo-induced cell death and ROS production in a concentration dependent manner; maximum protection was achieved at the concentration of 1 mM. The cytoprotective effect afforded by guanosine was abolished by adenosine A₁ or A_{2A} receptor antagonists (DPCPX or ZM241385, respectively), or by a large (big) conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (BK) blocker (charybdotoxin). Evaluation of signaling pathways showed that the protective effect of guanosine was not abolished by a MEK inhibitor (PD98059), by a p38^{MAPK} inhibitor (SB203580), or by a PKC inhibitor (chelerythrine). However, when blocking the PI3K/Akt pathway with LY294002, the neuroprotective effect of guanosine was abolished. Guanosine increased Akt and p-Ser-9-GSK-3 β phosphorylation confirming this pathway plays a key role in guanosine's neuroprotective effect. Guanosine induced the antioxidant enzyme heme oxygenase-1 (HO-1) expression. The protective effects of guanosine were prevented by heme oxygenase-1 inhibitor, SnPP. Moreover, bilirubin, an antioxidant and physiologic product of HO-1, is protective against mitochondrial oxidative stress. In conclusion, our results show that guanosine can afford protection against mitochondrial oxidative stress by a signaling pathway that implicates PI3K/Akt/GSK-3 β proteins and induction of the antioxidant enzyme HO-1.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the central nervous system (CNS) guanosine, the endogenous guanine nucleoside, is available extracellularly through release

Abbreviations: BK, large (big) conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels; DPCPX, 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine; GUD, guanosine; GSK-3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; H₂DCFDA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; HO-1, heme oxygenase-1; LY294002, 2-(4-morpholinyl)-5-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-ylhydrochloride; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PD98059, 2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one; PKC, protein kinase C; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; ROS, reactive oxygen species; SB203580, 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfonylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole; SnPP, Sn(IV) protoporphyrin IX dichloride; ZM241385, 4-[[2-[7-amino-2-(2-furyl) [1,2,4] triazol-2,3a]](1,3,5)triazin-5-ylamino]ethylphenol.

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 5046; fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: tharindec@yahoo.com.br (T. Dal-Cim).

¹ These authors contributed equally to this study.

² These authors contributed equally to this study.

0197-0186/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.05.021>

from glial cells. In astrocytic cell cultures it has been reported that guanine nucleotides and guanosine can be released under basal or toxic conditions (Cicarelli et al., 1999, 2001). Alternatively, nucleotides such as GTP, GDP and GMP can be metabolized by ectonucleotidases to produce extracellular guanosine (Caciagli et al., 2000; Ciccarelli et al., 2001). Guanosine and guanine nucleotides have been implicated in neuroprotection by exerting trophic effects (Cicarelli et al., 2001; Decker et al., 2007), as well as by counteracting glutamate excitotoxicity *in vitro* (Molz et al., 2005, 2008; Oleskovicz et al., 2008) and *in vivo* (Schmidt et al., 2000, 2005, 2007). Guanosine also protects cultured rat astrocytes from staurosporine-induced apoptosis (Di Iorio et al., 2004) and SH-SY5Y cells from β -amyloid-induced apoptosis (Pettifer et al., 2004). In both cases, the anti-apoptotic effect of guanosine was mediated by stimulation of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) cell survival pathways.

Despite several evidences on the protective effect of the exact extracellular site of interaction and mechanisms of action for this nucleoside have not yet been fully characterized. Some studies suggest that guanosine participates in cell proliferation, neurite outgrowth and cellular protection by a mechanism that involves activation of adenosine receptors (Ciccarelli et al., 2000; D'Alimonte et al., 2007; Thauerer et al., 2010). However, we have recently demonstrated that guanosine-induced protection in hippocampal slices subject to oxygen/glucose deprivation depends on large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (BK) channels activation (Dal-Cim et al., 2011).

Oxidative stress is a common mechanism of cell death in distinct cytotoxic models such as glutamate (Parfenova et al., 2006), β -amyloid (Tamagno et al., 2006), MPP⁺ (Nicotra and Pavrez, 2000), or hydrogen peroxide-induced cytotoxicity (Kim et al., 2005). Oxidative stress has also been related to neurodegenerative diseases like Alzheimer and Parkinson's diseases (Mattson and Magnus, 2006) or stroke (Saito et al., 2005). Overproduction of reactive oxygen species (ROS) leads to damage of both neurons and astrocytes (Lin and Beal, 2006). In this study, we used an oxidative stress model evoked by mitochondrial activity disruption induced by blockade of mitochondrial complexes I and V, by using the combination of rotenone plus oligomycin-A (Rot/oligo) (Egea et al., 2007).

As mentioned above, the detrimental accumulation of ROS plays an important role in multiple pathologies; therefore, cells have developed an antioxidant armamentarium that includes a group of antioxidant genes termed phase II detoxification genes (Itoh et al., 1999) to maintain redox homeostasis. Among these genes is heme oxygenase-1 (HO-1), which is the rate-limiting enzyme that degrades the pro-oxidant heme group and produces equimolar quantities of carbon monoxide (CO), iron, and biliverdin (BV). Biliverdin is subsequently reduced to bilirubin by biliverdin reductase. These three by-products have been related to cell protection against oxidative stress in distinct cellular models (Kim et al., 2005; Vitali et al., 2005). HO-1 is induced in response to a great variety of stress-inducing pathological conditions (Keyse and Tyrrell, 1987; Nimura et al., 1996). Moreover, studies in HO-1-deficient mice have confirmed that HO system is indispensable for cell protection against oxidative stress (Poss and Tonegawa, 1997). Furthermore, it has been shown that in the post-mortem brains of Alzheimer's disease patients, there was a HO-1 induction in neurons of the cerebral cortex and hippocampus and HO-1 was co-localized with neurofibrillar tangles (Schipper et al., 1995). Therefore, it is generally accepted that HO-1 represents a physiological protective mechanism against oxidative stress.

The purpose of this study was to evaluate how guanosine, a guanine nucleoside that can be secreted under physiological or pathological conditions, could protect cells against oxidative stress caused by disruption of the mitochondrial respiratory chain. Herein we show that guanosine-induced protective effect depends on activation of adenosine receptors and BK channels. Guanosine can afford cytoprotection under circumstances of cell vulnerability caused by mitochondrial disruption through an intracellular biochemical pathway that implicates the activation of PI3K/Akt leading to inactivation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and induction of the antioxidant enzyme HO-1.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Charybdotoxin, DPCPX (1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine), F-12 nutrient mixture, Eagle's minimum essential medium (MEM), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), oligomycin A, rotenone, SB203580 [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-

methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole] and ZM241385 [4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino)ethylphenol] were obtained from Sigma (Madrid, Spain). Chelerythrine and PD98059 [2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one] and LY294002 [2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-hydrochloride] were purchased from Tocris (Biogen Científica, Spain). Sn(IV) protoporphyrin-IX dichloride (SnPP) was obtained from Frontier Scientific Europe (Lancashire, UK). Penicillin/streptomycin was purchased from GIBCO (Madrid, Spain). 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) was obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Madrid, Spain). Pyruvate and heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) were purchased from Invitrogen. Bilirubin was purchased from Analisa Gold.

2.2. Culture and maintenance of SH-SY5Y cells

The neuroblastoma cell line SH-SY5Y was a kind gift from the Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid/Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, Spain). SH-SY5Y cells were maintained in a 1:1 mixture of F-12 nutrient mixture (Ham 12) and Eagle's MEM supplemented with 15 non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10% heat-inactivated FBS, 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen, Madrid, Spain). SH-SY5Y cells were seeded into flasks containing supplemented medium, and they were maintained at 37 °C in 5% CO₂, humidified air. Stock cultures were passaged 1:3 twice weekly; i.e., one plate was divided (subcultured or split) into three plates. This procedure was performed twice a week. For assays, SH-SY5Y cells were subcultured in 48-well plates at a seeding density of 1×10^5 cells per well, or in 96-well plates at a seeding density of 1×10^5 cells per well (Cañas et al., 2007). Cells were treated with the drugs in MEM supplemented with 1% fetal calf serum. Cells were treated with the drugs before confluence in MEM/F-12 with 1% FBS. Cells were used at a passage below 13.

2.3. Induction of cell toxicity and evaluation of cytoprotection induced by guanosine

Cell death was induced by adding a combination of rotenone (30 μ M) plus oligomycin-A (10 μ M) (Rot/oligo) for 24 h. When present, guanosine was added to SH-SY5Y at the same time as Rot/oligo and remained in the culture medium for the duration of experiments (24 h). Bilirubin (50 nM) was added in medium culture as the same time as Rot/Oligo and remained in culture medium for the duration of experiments (24 h). In experiments where enzyme inhibitors, adenosinergic receptors antagonists or potassium channel blocker were tested, SH-SY5Y cells were pretreated with these agents for 30 min prior to the addition of guanosine, which remained in the incubation medium throughout the duration of the experiment. These treatments included: the potent and selective inhibitor of the PI3K (LY294002, 10 μ M); the selective inhibitor of the MAP kinase kinase (MEK) (PD98059, 10 μ M); the inhibitor of PKC (chelerythrine, 0.1 μ M); the inhibitor of p38^{MAPK} (SB203580, 10 μ M); HO-1 inhibitor, Sn(IV) protoporphyrin IX dichloride (SnPP, 3 μ M). Adenosinergic antagonists: A₁ receptor antagonist (DPCPX, 100 nM); A_{2A} receptor antagonist (ZM 241385, 50 nM); BK channel blocker (charybdotoxin, 100 nM). LY294002, PD98059 and chelerythrine were dissolved in and added to the culture medium at a final concentration of 0.01% dimethyl sulfoxide (DMSO).

2.4. Evaluation of cell viability by MTT reduction

SH-SY5Y cell viability was evaluated 24 h after Rot/oligo or Rot/oligo plus guanosine exposure. At the end of each experiment, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide (MTT Sigma Aldrich) was added to each well to a final concentration of

0.5 mg/ml (Mosmann, 1983) and the plates were incubated for 2 h at 37 °C. Then the insoluble formazan was solubilized by adding DMSO, resulting in a colored compound which optical density was measured in an ELISA reader (550 nm). The evaluation of MTT reduction was performed in triplicates of four to five independent experiments.

2.5. Measurement of ROS production

To measure cellular ROS, we have used the molecular probe H₂DCFDA (Ha et al., 1997). SH-SY5Y cells were loaded with 10 μM H₂DCFDA which diffuses through the cell membrane and is hydrolyzed by intracellular esterases to the nonfluorescent form dichlorofluorescein (DCFH). DCFH reacts with intracellular H₂O₂ to form dichlorofluorescein (DCF), a green fluorescent dye. Fluorescence was measured in a fluorescence microplate reader (FLUOstar Galaxy). Wavelengths of excitation and emission were 485 and 520 nm, respectively (Egea et al., 2007). Production of ROS was evaluated in triplicates of four independent experiments.

2.6. Immunoblotting

SH-SY5Y cells were washed once with cold phosphate-buffered saline and lysed in 100 μL of ice-cold lysis buffer (1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 137 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 μg/ml leupeptin, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mmol/L NaF, 1 mmol/L sodium pyrophosphate, and 1 mmol/L Na₂VO₄). Protein (30 μg) from the cell lysates was resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membranes (GE Healthcare). Membranes were incubated with the following antibodies: Anti-Akt at 1:1000, Anti-phospho-Akt at 1:1000, Anti-phospho-Ser-9-GSK3-β at 1:1000, Anti-GSK-3β at 1:1000 (Cell Signaling, Izasa SA, Barcelona, Spain); anti-HO-1 at 1:1000 (Chemicon, Temecula, CA, USA) anti-β-actin at 1:100,000 (Sigma, Madrid, Spain). Appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies at 1:10,000 were used to detect proteins by enhanced chemiluminescence. Immunodetection was performed in triplicates of four to six independent experiments.

2.7. Statistical analysis

Comparison among groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test if necessary, with $p < 0.05$ considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Guanosine protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against Rot/oligo-induced cell death

Treatment of SH-SY5Y neuroblastoma cells for 24 h with 30 μM rotenone plus 10 μM oligomycin A (Rot/oligo) decreased by 70% the cellular viability, measured as MTT reduction, when compared to cultures incubated only with culture medium (basal). Guanosine *per se* (0.03–1 mM) did not alter cellular viability at any of the concentrations tested (Fig. 1A).

As illustrated in the microphotographs of Fig. 1B, Rot/oligo decreased the number of cells when compared to cultures in basal conditions and transformed healthy cells, isolated or grouped in clusters, into rounded shaped cells, with a granular morphology containing debris. SH-SY5Y cells co-incubated with 1 mM guanosine and Rot/oligo greatly recovered their initial density and exhibited a healthier appearance.

Increasing concentrations of guanosine (0.3–1 mM) added to the incubation medium at the same time as Rot/oligo significantly reduced Rot/oligo-induced cell death in SH-SY5Y cells in a concen-

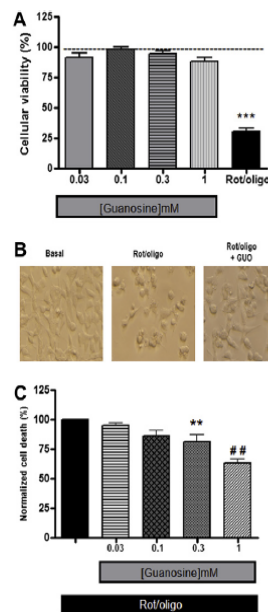


Fig. 1. Guanosine protects against cell death induced by Rot/oligo in SH-SY5Y neuroblastoma cells. (A) SH-SY5Y neuroblastoma cells were incubated for 24 h with culture medium (basal), with increasing concentrations of GUO (0.03–1 mM) or with 30 μM rotenone plus 10 μM oligomycin. Cellular viability was evaluated by MTT reduction assay and was expressed as percentage of control cells representing cells incubated for 24 h in culture medium (100% cellular viability). (B) Photomicrographs of control SH-SY5Y cells (Basal); cells exposed 24 h to Rot/oligo; cells co-incubated 24 h with 1 mM guanosine (Rot/oligo + GUO). Image magnification (40X). (C) Concentration–response curve of GUO co-incubated for 24 h with Rot/oligo. Cell death was normalized in each individual experiment, as percentage of the maximum cell death (Rot/oligo) that was considered as 100% (black column). Data are mean ± SEM from five different cell batches. *** $p < 0.001$, represents means significantly different from control cells; ** $p < 0.01$ represents means significantly different from Rot/oligo and Rot/oligo + GUO 1 mM; # $p < 0.01$ represents means significantly different from all other groups.

tration dependent fashion (Fig. 1C); maximum protection was achieved at the concentration of 1 mM (40%, $p < 0.01$). Thus, this was the concentration selected to study guanosine's protective mechanism of action in the following experiments.

3.2. Guanosine protects against Rot/oligo-induced cell death via BK channels and adenosine receptors modulation

We previously showed that neuroprotection afforded by guanosine against ischemic damage depends on BK channels activation (Dal-Cim et al., 2011). In order to evaluate if this channel is also involved in the protective effect of guanosine against mitochondrial damage, SH-SY5Y cells were incubated with charybdotoxin (100 nM) 30 min prior to the addition of guanosine. Charybdotoxin prevented the protective effect of guanosine against cell damage induced by Rot/oligo (Fig. 2A).

Since it has been suggested that guanosine may also interact with adenosine A_1 receptors in some situations and activation of such receptor subtype is involved in neuroprotective effects (Ciccarelli et al., 2000; Cunha, 2005), we verified the role of adenosine A_1 receptor in the protective effects triggered by guanosine in SH-SY5Y neuroblastoma cells. The presence of A_1 receptor antagonist (DPCPX, 100 nM) abolished neuroprotection induced by guanosine. Interestingly, the A_{2A} receptor antagonist (ZM241385, 50 nM) also blocked guanosine-induced protective effect (Fig. 2A).

3.3. Guanosine protects against Rot/oligo-induced cell death by activation of the PI3K/Akt cell survival pathway and inactivation of GSK-3 β

In order to analyze the signaling pathways participating in the neuroprotective mechanism of guanosine against Rot/oligo-

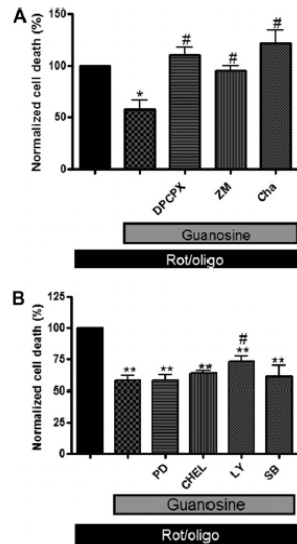


Fig. 2. Evaluation of extracellular interaction sites and signaling pathways involved in guanosine-induced neuroprotection against cell death induced by Rot/oligo in SH-SY5Y neuroblastoma cells. (A) SH-SY5Y neuroblastoma cells were incubated for 24 h with 30 μ M rotenone plus 10 μ M oligomycin A (Rot/oligo) with or without 1 mM guanosine (GUO) or pre-incubated for 30 min with 100 nM DPCPX (A_1 receptor antagonist), ZM241385 50 nM (A_{2A} receptor antagonist) or Charybdotoxin 100 nM (BK channel blocker) and subsequently co-incubated 24 h with 1 mM guanosine and Rot/oligo. Cell death was normalized in each individual experiment as percentage of the maximum cell death (Rot/oligo) which was considered as 100% (black column). (B) SH-SY5Y neuroblastoma cells were incubated for 24 h with 30 μ M rotenone plus 10 μ M oligomycin A (Rot/oligo) with or without 1 mM guanosine (GUO) or pre-incubated for 30 min with 10 μ M PD98059 (MEK inhibitor), 0.1 μ M chelerythrine (chel) (PKC inhibitor), 10 μ M LY294002 (PI3K inhibitor) or 10 μ M SB 5203580 (p38^{MAPK} inhibitor) and subsequently co-incubated 24 h with 1 mM guanosine and Rot/oligo. Cell death was normalized in each individual experiment as percentage of the maximum cell death (Rot/oligo) which was considered as 100% (black column). Data are mean \pm SEM from five different cell batches. * p < 0.05 represents means significantly different from Rot/oligo; ** p < 0.01 represents means significantly different from Rot/oligo; # p < 0.05 represents means significantly different from Rot/oligo + GUO.

induced cell damage in SH-SY5Y cells, we performed experiments with LY294002, an inhibitor of the PI3K; PD98059, an inhibitor of MEK; chelerythrine, an inhibitor of PKC and SB203580, an inhibitor of p38^{MAPK}. As shown in Fig. 2B, only the inhibitor of PI3K (LY294002, 10 μ M) partially blocked the neuroprotective effect of guanosine. Therefore these results indicate that PI3K/Akt, but not ERK1/2, PKC or p38^{MAPK} are participating in guanosine-induced neuroprotection.

To further corroborate the participation of Akt, we incubated SH-SY5Y cells during different time periods with guanosine (1 mM) and thereafter protein extracts were obtained to measure p-Akt by Western blot. The results showed guanosine significantly increased by 2.5-fold p-Akt levels after 30 min incubation; this induction was maintained at 60 min, but it decreased after 24 h incubation (Fig. 3A).

GSK-3 β is tightly regulated by the survival pathway represented by PI3K and its downstream effector, Ser/Thr protein kinase Akt. Akt targets GSK-3 β , also a Ser/Thr protein kinase that phosphorylated at

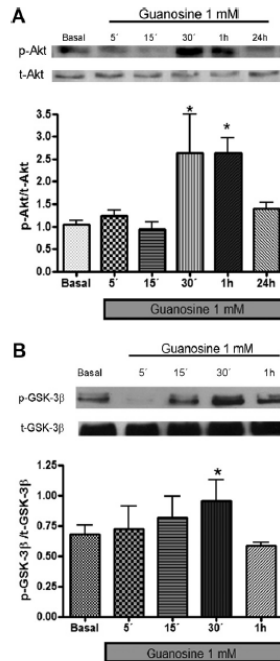


Fig. 3. Guanosine induces Akt phosphorylation and inactivation of GSK-3 β by phosphorylation of its Ser-9. (A) Representative immunoblot of Akt phosphorylation. SH-SY5Y neuroblastoma cells were incubated for 5, 15, 30 min, 1 and 24 h with guanosine 1 mM. The histogram presents the densitometric quantification of p-Akt/total-Akt. (B) SH-SY5Y neuroblastoma cells were incubated for 5, 15, 30 min and 1 h with guanosine 1 mM. The histogram presents the densitometric quantification anti-p-Ser9-GSK-3 β and anti-total-GSK-3 β . Data are mean \pm SEM from four different cell batches. * p < 0.05 indicates significantly different from basal group.

its Ser-9, is inactivated (Rylatt et al., 1980). GSK-3 β phosphorylates and thereby regulates many important metabolic and signaling proteins, structural proteins and transcription factors (Frame and Cohen, 2001). Incubation of SH-SY5Y cells at different time intervals with guanosine (1 mM) gradually increased p-Ser9-GSK-3 β , maximum phosphorylation was also achieved after 30 min (Fig. 3B).

3.4. Participation of HO-1 in the protective mechanism of guanosine

GSK-3 β has been identified as a key mediator regulating the cross-talk between the survival signal elicited by PI3K/Akt and the antioxidant phase II cell response (Salazar et al., 2006). In this context, HO-1 is found among the phase II detoxification genes. Since induction of a moderate intracellular heme catabolism through HO-1 represents an adaptive and protective response to oxidative injury (Doré et al., 1999; Baranano et al., 2002), we investigated whether guanosine could be regulating this enzyme expression. For these experiments, cells were incubated for 24 h with basal medium alone, guanosine (1 mM), or guanosine in the

presence of the PI3K inhibitor LY294002. Then, cell lysates were resolved in SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-HO-1. Twenty-four hours incubation with guanosine increased to almost 3-fold the expression of HO-1. The PI3K inhibitor significantly reduced HO-1 levels induced by guanosine (Fig. 4A). Therefore, guanosine was capable of inducing the antioxidant enzyme HO-1 and PI3K/Akt participated in this induction.

To further analyze the involvement of HO-1 in the protective effect of guanosine, we used a HO-1 inhibitor, Sn(IV) protoporphyrin IX (SnPP) (Marinissen et al., 2006). Indeed, SnPP was able to prevent the protective effect afforded by guanosine (Fig. 4B). Moreover, bilirubin, a HO-1 product, was used to mimic HO-1 activity induction in the neuroprotective effect of guanosine against Rot/oligo. Bilirubin is an end product of heme catabolism and probably the best-known endogenous antioxidant in mammals. Bilirubin (50 nM) also counteracted cytotoxicity in SH-SY5Y exposed to Rot/oligo (Fig. 4C), confirming guanosine induced endogenous antioxidant system of HO-1 which contribute to protective effect triggered by this nucleoside.

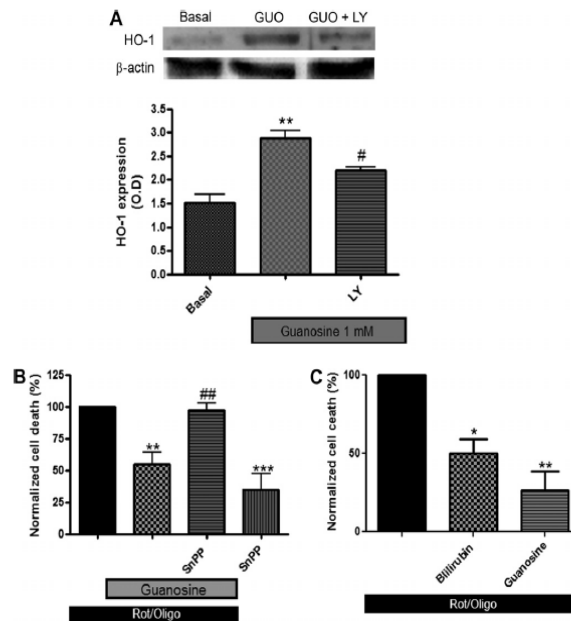


Fig. 4. Guanosine protects SH-SY5Y neuroblastoma cells by inducing HO-1 expression via PI3K/Akt. (A) Representative immunoblot showing HO-1 induction in SH-SY5Y neuroblastoma cells incubated for 24 h with guanosine (GUO) in the presence or in the absence of 10 μ M LY294002. The histogram represents the densitometric quantification of HO-1 protein levels. Data are mean \pm SEM from four different cell batches. ** p < 0.01 represents means significantly different from basal groups. # p < 0.05 indicates significantly different from guanosine group. (B) SH-SY5Y neuroblastoma cells were incubated for 24 h with 30 μ M rotenone plus 10 μ M oligomycin A (Rot/oligo) with or without 1 mM GUO or pre-incubated for 30 min with 30 μ M SnPP (HO-1 inhibitor) and subsequently co-incubated 24 h with 1 mM GUO and Rot/oligo. Cell death was normalized in each individual experiment, as percentage of the maximum cell death (Rot/oligo) which was considered as 100% (black column). Data are mean \pm SEM from five different cell batches. ** p < 0.01, *** p < 0.001, indicates significantly different from Rot/oligo group. # p < 0.01 indicates significantly different from Rot/oligo + GUO group. (C) SH-SY5Y neuroblastoma cells were incubated for 24 h with 30 μ M rotenone plus 10 μ M oligomycin A (Rot/oligo) with 1 mM GUO or with bilirubin 50 nM. Cell death was normalized in each individual experiment, as percentage of the maximum cell death (Rot/oligo) which was considered as 100% (black column). Data are mean \pm SEM from four different cell batches. * p < 0.05, ** p < 0.01, indicates significantly different from Rot/oligo group.

3.5. Guanosine prevents Rot/oligo-induced ROS production

Since Rot/oligo are potent inhibitors of the complex I and V of the respiratory chain, respectively, and cause oxidative stress (Egea et al., 2007), we measured ROS generation with the fluorescent probe H₂DCFDA. At the end of the 24 h period with Rot/oligo, cells were loaded with 10 μ M H₂DCFDA for 20 min. Cells exposed to Rot/oligo increased ROS production to 293%. When cells were co-incubated with guanosine and Rot/oligo for 24 h, the amount of ROS produced by cells was reduced to basal levels. Interestingly, LY294002 abolished the reduction of ROS elicited by guanosine (Fig. 5). Taken together, these results indicate that guanosine protects SH-SY5Y cells from mitochondrial oxidative stress by a mechanism that implicates PI3K/Akt pathway.

4. Discussion

Central to this study is guanosine protects cells from mitochondrial oxidative stress by inducing the antioxidant enzyme HO-1 via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway (Fig. 6).

Mitochondrial dysfunction and bioenergetic deficiency is closely linked to pathogenesis of many neurodegenerative disorders. Mitochondria play a variety of roles by integrating extracellular signals and executing important intracellular events in neuronal survival and death. In this context, the regulation of mitochondrial function via therapeutic approaches may exert some salutary and neuroprotective mechanisms. In this study we have caused interruption of the respiratory chain at complexes I (rotenone) and V (oligomycin-A) that causes mitochondrial depolarization, increases ROS production, and a vicious circle leading to cell death (Egea et al., 2007). The oxidative damage induced by Rot/oligo profoundly affected cellular viability of SH-SY5Y neuroblastoma cells, as observed by a significant impairment in MTT reduction, as well as by morphological alterations consistent with cell death. MTT reduction assay can also be considered an approach to evaluate cell proliferation. However, in a previous study, incubation of SH-SY5Y cells with the same concentration of Rot/oligo and time incubation used in our study, can also induce LDH leakage (Cañas et al., 2007), indicating Rot/oligo induces cell death and does not seem to interfere with cell proliferation. Under these experimental conditions, guanosine was able to reduce cell death in a concentration-dependent manner. Studies evaluating a protective role of guanosine

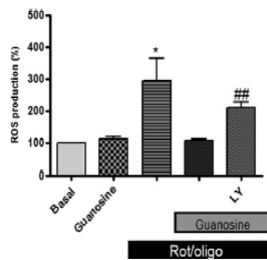


Fig. 5. Guanosine inhibits mitochondrial ROS production elicited by Rot/oligo in SH-SY5Y neuroblastoma cells. SH-SY5Y neuroblastoma cells were incubated for 24 h with 30 μ M rotenone plus 10 μ M oligomycin A (Rot/oligo) with or without 1 mM guanosine (GUO). Cells were pre-incubated for 30 min with 10 μ M LY294002 (PI3K inhibitor) and subsequently co-incubated 24 h with 1 mM guanosine and Rot/oligo. Data are means \pm SEM from four different cell batches. * p < 0.05 represents means significantly different from all other groups. ## p < 0.01 represents means significantly different from Rot/oligo group.

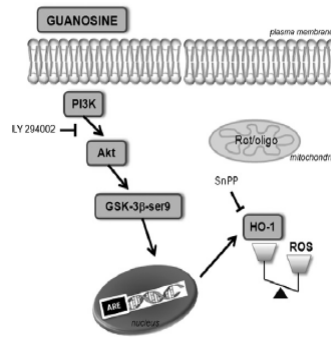


Fig. 6. Schematic representation of putative protective mechanism of guanosine. Guanosine-induced neuroprotection seems to involve modulation of adenosine A₁ and A_{2A} receptors and BK channels activation. Guanosine activates PI3K/Akt/GSK-3 β pathway leading to HO-1 induction which protect against ROS production caused by blockade of mitochondrial complexes I and V with rotenone and oligomycin A, respectively. The PI3K inhibitor (LY294002) and HO-1 inhibitor (SnPP) blocked the protective effect induced by guanosine.

against cell death induced by apoptosis in SH-SY5Y cell culture have shown that this effect is observable at concentrations between 100 μ M and 300 μ M (Di Iorio et al., 2004; Pettifer et al., 2004, 2007). Here we observed that 1 mM guanosine was the most effective concentration of guanosine against cell death induced by Rot/oligo. This concentration can be justified by the high amount of necrotic cell death induced by Rot/oligo after 24 h of treatment (Egea et al., 2007; Parada et al., 2010) and thus a greater concentration of guanosine was necessary to induced protection.

Identification of molecular targets for guanosine is of fundamental relevance, since guanosine receptors are poorly characterized (Tasca et al., 1999; Traversa et al., 2002; Volpini et al., 2011). Astrocytic cells subjected to hypoxia/hypoglycemia release guanosine (Ciccarelli et al., 1999), whose levels remain high for several days afterwards (Uemura et al., 1991). Therefore, in a pathological scenario, guanosine could be released locally from astrocytes to provide protection under circumstances involving neuronal injury. Previous evidence showed guanosine protective effects were mediated by potassium channels (Oleskovicz et al., 2008), which were identified as BK channels in guanosine-induced neuroprotection in hippocampal slices subject to oxygen/glucose deprivation (Da-Cim et al., 2011). The evaluation of a putative interaction site of guanosine in SH-SY5Y cells, in order to trigger this protective effect, also demonstrated dependence on BK channels activity. Since BK channels promote a negative feedback regulation of Ca²⁺ influx via voltage-gated-Ca²⁺ channels, regulation of cellular excitability and neurotransmitter release (Hu et al., 2001; Ghatta et al., 2006), it is feasible guanosine effect on BK channels may contribute to ionic homeostasis and reduction of ROS production.

However, some studies have claimed a putative interaction of guanosine on A₁ adenosine receptors (Thauerer et al., 2012). Adenosine A₁ receptors regulate the activity of cell membrane Ca²⁺ channels, K⁺ channels, adenylate cyclase and phospholipase C (Palmer and Stiles, 1995), and it is associated to control of neurodegenerative process (Cunha, 2005). Thus, the possible interaction of guanosine with A₁ receptors observed here could result in an intracellular signaling leading to cellular protection. Surprisingly, it was observed the A_{2A} receptor antagonist, ZM241385, was also able to

prevent guanosine effect. Despite A_1 and A_{2A} receptors trigger opposing signal transduction and these receptors can interact forming A_1 - A_{2A} receptor heterodimers with antagonistic actions (Ciruela et al., 2006), we have previously observed guanosine-induced trophic effects on cerebellar neurons depend on both A_1 and A_{2A} adenosine receptors activation (Tasca et al., 2010). Therefore, the exact mechanism of interaction or modulation of BK and adenosine receptors through guanosine-induced neuroprotection remains to be unraveled.

In this study, we focused in understanding signaling pathways related to the protective mechanism of action of guanosine. The putative participation of PI3K, MAPKs and PKC cascades was evaluated because they have been described as key elements of signal transduction involved in cell proliferation, differentiation and stress response (Cantley, 2002; Cañas et al., 2007). Guanosine has proven to induce trophic effects by a mechanism that implicates activation of MAPK and PKC (Decker et al., 2007) and promote neuroprotection via PI3K/Akt (Di Iorio et al., 2004; Pettifer et al., 2004; Oleskovicz et al., 2008; Dal-Cim et al., 2011). Based on these evidences, we looked for the involvement of PI3K, MEK, PKC and p38^{MAPK} in the protective effect of guanosine against Rot/oligo-induced cell death. Neither MEK, PKC or p38^{MAPK} inhibition altered the protective effect of guanosine. However, inhibition of PI3K/Akt pathway by LY294002, partially abolished the protective effect of guanosine. Moreover, guanosine induced an increased Akt phosphorylation and LY294002 also prevented reduction of ROS production promoted by guanosine in Rot/oligo treated cells. Taken together, these data reinforce the idea PI3K/Akt pathway is implicated in the protective effect of guanosine.

Akt phosphorylates its substrate GSK-3 β at the position Ser-9 and this phosphorylation inactivates GSK-3 β (Stambolic and Woodgett, 1994). GSK-3 β inhibition has been shown to be protective against a plethora of neurological insults (Manji et al., 1999; Endo et al., 2007), suggesting its inhibition can improve brain cell survival. Guanosine induces increased levels of p-Ser9-GSK-3 β , showing inhibition of its activity. These results agree with previous data from our group, which demonstrate that guanosine protects against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices by activation of PI3K/Akt and subsequent inactivation of GSK-3 β (Molz et al., 2011).

Inhibition of GSK-3 β increases Nrf2 transcriptional activity (Rojo et al., 2008) which, in turn, regulates HO-1 transcription (Alam and Cook, 2003). HO-1 is a stress defense enzyme with anti-inflammatory and antioxidant properties (Lee and Chau, 2002; Salinas et al., 2003). Guanosine increased HO-1 expression, an effect related to guanosine-induced protection, since HO-1 inhibition with SnPP prevented guanosine effect on cell viability. A previous study has also shown that guanosine can promote HO-1 expression, although this effect was related to neurite outgrowth induction in PC12 cells (Bau et al., 2005), but not cellular protection as showed.

Interesting, the upregulation of HO-1 induced by guanosine, as well as its effect on ROS production was fully prevented by a PI3K/Akt inhibitor, indicating this pathway directly participates in induction of this antioxidant enzyme. The participation of PI3K/Akt in regulating HO-1 induction has been previously described (Cañas et al., 2007; Hwang and Jeong, 2010; Parada et al., 2010).

Modest induction of HO-1 activity results in a modest increase in biliverdin/bilirubin levels. Data in the literature have demonstrated a protective role for very low nanomolar concentrations of bilirubin in cultured rat primary hippocampal neurons exposed to H₂O₂ and to ethanol-induced neurotoxicity (Doré et al., 1999; Ku et al., 2006). In this study, bilirubin protected against Rot/oligo-induced cell death, as observed with guanosine. Bilirubin is an important endogenous antioxidant and may be particularly important as a cytoprotectant for tissues with relatively weak

endogenous antioxidant defenses such as the nervous system (Ewing et al., 1992). These findings reinforce the idea that guanosine-induced protection against excessive ROS production elicited by Rot/oligo could be related to its ability to induce HO-1 antioxidant activity and, could thus restore balance between ROS production and scavenging.

In conclusion, guanosine can reduce oxidative stress induced by mitochondrial disruption due to a mechanism involving PI3K/Akt/GSK-3 β pathway and induction of the antioxidant enzyme HO-1. Thus, endogenous compounds that protect against oxidative stress can be considered as new strategies to protect neurons in CNS pathologies.

Acknowledgements

This work was supported by Grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation SAF2009-12150, Ministry of Education PBH2007-0004-PC and the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III) RETICS-RD06/0026 to M.G.L. The Brazilian funding agencies: CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos – IBN-Net# 01.06.0842-00) to C.I. Tasca, T. Dal-Cim and S. Molz were recipient of CAPES/DGU (Project No. 173/2008) predoctoral fellowships. C.I.T. is recipient of CNPq productivity fellowship.

References

- Alam, J., Cook, J.L., 2003. Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. *Curr. Pharm. Des.* 9, 2499–2511.
- Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., Snyder, S.H., 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16093–16098.
- Bau, C., Middlemiss, P.J., Hindley, S., Jiang, S., Ciccarelli, R., Caciagli, F., Di Iorio, P., Werstkiuk, E.S., Rathbone, M.P., 2005. Guanosine stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of heme oxygenase and cyclic GMP. *Putative Signal.* 1, 161–172.
- Caciagli, F., Di Iorio, P., Giuliani, P., Middlemiss, M.P., Rathbone, M.P., 2000. The neuroprotective activity of guanosine involves the production of trophic factors and the outflow of purines from astrocytes. *Drug Dev. Res.* 50, 32.
- Cañas, N., Valero, T., Villarroya, M., Montell, E., Vergés, J., García, A.G., López, M.G., 2007. Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 946–953.
- Cantley, L.C., 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655–1657.
- Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Giuliani, P., D'Alimonte, L., Ballerini, P., Caciagli, F., Rathbone, M.P., 1999. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia* 25, 93–98.
- Ciccarelli, R., Di Iorio, P., D'Alimonte, L., Giuliani, P., Florio, T., Caciagli, F., Middlemiss, P.J., Rathbone, M.P., 2000. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia* 29, 202–211.
- Ciccarelli, R., Ballerini, P., Sabatino, G., Rathbone, M.P., D'Onofrio, M., Caciagli, F., Di Iorio, P., 2001. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 395–414.
- Ciruela, F., Casado, V., Rodrigues, R.J., Lujan, R., Burgueno, J., Canals, M., Borycz, J., Rebola, N., Goldberg, S.R., Mallol, J., Cortes, A., Canela, E.I., Lopez-Gimenez, J.F., Milligan, G., Lluís, C., Cunha, R.A., Ferre, S., Franco, R., 2006. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J. Neurosci.* 26, 2080–2087.
- Cunha, R.A., 2005. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A(1) receptor activation to A(2A) receptor blockade. *Putative Signal.* 1, 111–134.
- Dal-Cim, T., Martins, W.C., Santos, A.R., Tasca, C.I., 2011. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. *Neuroscience* 2, 212–220.
- D'Alimonte, L., Flati, V., D'Auro, T., Toniato, E., Martinotti, S., Rathbone, M.P., Jiang, S., Ballerini, P., Di Iorio, P., Caciagli, F., Ciccarelli, R., 2007. Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells. *J. Immunol.* 178, 720–731.
- Decker, H., Franisco, S.S., Mendes-de-Aguilar, C.B., Romão, L.F., Boeck, C.R., Trentin, A.G., Moura-Neto, V., Tasca, C.I., 2007. Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. *J. Neurosci. Res.* 85, 1943–1951.
- Di Iorio, P., Ballerini, P., Traversa, U., Nicoletti, F., D'Alimonte, L., Kleywegt, S., Werstkiuk, E.S., Rathbone, M.P., Caciagli, F., Ciccarelli, R., 2004. The antiapoptotic

CAPÍTULO 5

Avaliação do efeito da PGO e guanosina sobre o consumo de oxigênio e atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em fatias de hipocampo de ratos

Resultados Parciais

Tharine Dal-Cim, Aline P. Remor, Juliana Camacho-

Pereira, Antônio Galina, Alexandra Latini e Carla I. Tasca

Estes experimentos foram em parte desenvolvidos no laboratório do professor Dr. Antônio Galina, do Depto. Bioquímica Médica da UFRJ, em estágio de pesquisa financiado pelo programa INCT para Excitotoxicidade e Neuroproteção e em parte desenvolvidos sob a supervisão da prof. Dra. Alexandra Latini, do Depto. de Bioquímica da UFSC

Introdução

A mitocôndria é a organela celular responsável pela maior produção líquida de energia. Esta organela contém proteínas envolvidas com a oxidação de nutrientes e com a respiração celular com simultânea geração de energia (KENNEDY & LEHNINGER, 1949;1950; 1951; LEHNINGER & SMITH, 1949). As mitocôndrias são envoltas por duas membranas, interna e a externa, ambas com a composição química semelhante à membrana plasmática. A membrana externa é mais permeável que a membrana interna. No espaço entre essas membranas, denominado intermembranoso, ocorrem reações essenciais ao metabolismo celular. A membrana interna é formada por pregas que se expandem no espaço intramitocondrial (matriz mitocondrial) denominadas cristas mitocondriais.

A maquinaria molecular para a produção energética mitocondrial está constituída por enzimas presentes na matriz mitocondrial (ciclo de Krebs), e na membrana mitocondrial interna (cadeia transportadora de elétrons).

A fosforilação oxidativa, constituída pelo processo acoplado da transferência de elétrons pela cadeia respiratória e pela fosforilação da adenosina-5'-difosfato (ADP), é responsável pela síntese da quase totalidade do ATP gerado nas células do sistema nervoso central (MARKS et al., 1996).

A respiração celular inicia com a oxidação de substratos em várias vias metabólicas com a transferência de elétrons para as coenzimas NAD^+ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FAD (flavina-adenina dinucleotídeo), reduzindo-os em NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida) e FADH_2 (flavina adenina dinucleotídeo reduzida), respectivamente (MARKS et al., 1996).

Os elétrons provenientes do NADH e do FADH_2 são transferidos através da cadeia respiratória por uma sequência de centros redox, fornecendo energia para a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa. Esta energia, segundo a teoria quimiosmótica, origina-se do gradiente de prótons formado através do bombeamento de prótons para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV da cadeia respiratória (MARKS et al., 1996).

A cadeia respiratória é constituída de uma sequência de carreadores de elétrons (pares redox) em sua maioria ligados a proteínas inseridas na membrana mitocondrial interna que receberam elétrons do

par redox anterior transferindo-os para o par redox seguinte até chegarem ao seu acceptor final, o oxigênio, formando água (MARKS et al., 1996).

A cadeia respiratória possui vários complexos protéicos enzimáticos presentes na cadeia respiratória são: NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), complexo citocromo b-c₁ (complexo III), citocromo *c* oxidase (complexo IV) e complexo V ou ATP sintase que é o responsável pela síntese de ATP, além de carreadores móveis que se localizam entre os complexos. Estes elementos são a coenzima Q (KHEYR-POUR et al.), a qual é um componente lipossolúvel que carrega elétrons entre os complexos I e/ou II e o III, e o citocromo *c*, uma pequena proteína localizada na face externa da membrana mitocondrial interna que transfere os elétrons do complexo III para o complexo IV (MARKS et al., 1996).

Além de a atividade mitocondrial ser fundamental para a produção de energia nas células, a mitocôndria pode atuar como reguladora da morte celular. A sobrecarga de Ca²⁺ na mitocôndria e a diminuição da atividade dessa organela, decorrentes do aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular como consequência da excessiva ativação de receptores glutamatérgicos, é um evento primordial e crucial na cascata excitotóxica que sucede uma isquemia cerebral ou um trauma crânio-encefálico (MURPHY et al., 1999). Além disso, é bem documentado que a cadeia transportadora de elétrons é a maior fonte de produção de espécies reativas de oxigênio (SANTARELLI et al.) e estresse oxidativo sendo que a geração de EROs ocorre principalmente nos complexos I e III (BOVERIS & CHANCE, 1973).

A guanosina, um nucleosídeo endógeno, apresenta importantes efeitos neuroprotetores no SNC. A guanosina promove proteção celular frente a danos excitotóxicos em fatias de hipocampo de ratos submetidas ao tratamento com glutamato (MOLZ et al., 2011). Além disso, já foi demonstrado que a guanosina é capaz de proteger fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO) (THOMAZI et al., 2008).

Considerando o descrito acima, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel da guanosina e da PGO em fatias de hipocampo de ratos sobre o consumo de oxigênio, que ocorre na etapa final da cadeia respiratória, acoplado a síntese de ATP, onde o acceptor final de elétrons -O₂ é reduzido a H₂O. Além disso, avaliamos a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

Materiais e Métodos

Animais

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos com idade entre 60 a 90 dias. Os animais foram obtidos no Biotério Central da UFSC com o Protocolo de pesquisa aprovado pela CEUA/UFSC PP0142. Os animais foram mantidos no biotério setorial de Neuroquímica do departamento de Bioquímica, em ciclo claro/escuro por 12 horas e a 25°C com água e ração *ad libitum*.

Preparação de fatias hipocâmpais

Os animais foram decapitados e os hipocâmpos rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) composto por NaCl 11, 22mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH de 7,4. As fatias de 0,4 mm de espessura foram obtidas usando um fatiador de tecidos (McIlwain Tissue Chopper) e pré-incubadas por 30 min a 37°C (MOLZ et al., 2008).

Modelo de isquemia: Privação de glicose e oxigênio

Para obter-se o modelo de isquemia por privação de glicose e oxigênio (PGO) em fatias hipocâmpais, a glicose do tampão KRB foi substituída por 10 mM de 2-deoxi-glicose (um análogo não utilizável da glicose) com intuito de substituir o oxigênio o tampão foi gaseificado com nitrogênio (STRASSER & FISCHER, 1995). As fatias foram incubadas neste tampão em PGO por 15 minutos. O tampão da PGO foi substituído por tampão KRB gaseificado com carbogênio (fisiológico) e as fatias foram mantidas por um período de 2 horas de reoxigenação na presença de ou ausência de GUO (100 μM).

Preparação do tecido para a medida da atividade dos complexos da cadeia respiratória.

As fatias de hipocampo (8 fatias) foram homogeneizadas como anteriormente descrito por LATINI e colaboradores (2005). Resumidamente, as fatias foram homogeneizadas em 20 volumes de tampão fosfato de potássio 4,4 mM, pH 7,4 contendo 0,3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1 mM de EGTA e 0,1% de albumina sérica bovina. Os homogenatos foram centrifugados a 3000 x g durante 10 min a 4°C. O sedimento obtido foi novamente suspenso no mesmo tampão. Para a preparação desta suspensão rica em mitocôndrias foi utilizada uma centrífuga de Eppendorf 5415 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Medida da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória

A atividade do complexo I foi medido pela taxa de redução do ferrocianeto dependente de NADH 420 nm ($1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), como descrito por (CASSINA & RADI, 1996) A atividade da succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP)-oxidoreductase (complexo II) foi determinado de acordo com o método de FISCHER e colaboradores (1985). A atividade do citocromo c oxidase (complexo IV) foi avaliada de acordo com (RUSTIN et al., 1994). Os métodos descritos acima para medir a atividade dos complexos foram ligeiramente modificados como previamente descrito (LATINI et al., 2005). A atividade dos complexos da cadeia respiratória foi calculada e expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$. As atividades enzimáticas foram medidas utilizando um espectrofotômetro com controle de temperatura VarianCary 50 (Varian Inc., Palo Alto, CA, EUA).

Medida do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi medido a 37°C por respirometria de alta resolução utilizando o oxígrafo Oroboros® com volumes fixados nas câmaras em 2mL [42]. O programa DatLabsoftware (OroborosInstruments, Innsbruck, Áustria) foi utilizado para aquisição e análise de dados. O experimento foi iniciado avaliando-se a respiração basal, após observar o fluxo respiratório entre 15-30 min a atividade da ATP sintase foi inibida pela adição de oligomicina ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) seguida do desacoplamento da fosforilação oxidativa através da titulação com de FCCP (fluorocarbonil-cianeto fenilidrazona) como pulsos de 100 nM. O consumo de oxigênio foi calculado como $\text{pmol} \text{ oxigênio} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ tecido}^{-1}$.

Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Lowry et al. (1975).

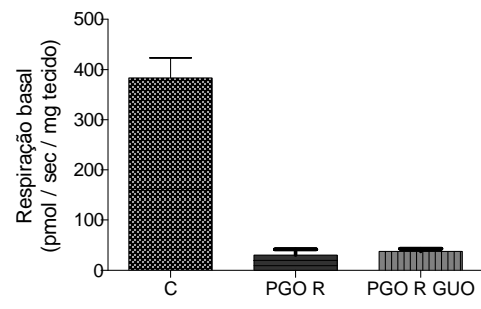
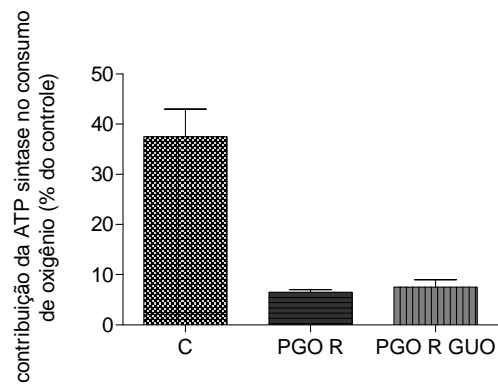
Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do Teste de Tukey's.

Resultados

Iniciamos a avaliação do consumo de oxigênio em fatias de hipocampo de ratos através da respirometria de alta resolução. Os parâmetros avaliados da fisiologia respiratória mitocondrial nas fatias de hipocampo foram a respiração basal do tecido, a contribuição da ATP sintase no consumo basal de oxigênio observado pela adição de oligomicina, e a respiração máxima induzida pela adição do ionóforo de prótons FCCP. Para esta análise foram utilizadas fatias de hipocampo mantidas na condição controle, submetidas a 15 min de privação de glicose e oxigênio seguidas de 2h de reoxigenação (PGO-R) e fatias submetidas a 15 min de PGO-R seguidas de 2h de reoxigenação na presença de GUO (100 μ M).

Em nosso estudo preliminar, observamos que nas fatias submetidas à PGO-R houve uma marcada redução no consumo de oxigênio basal comparado com as fatias controle. Ainda, este efeito não foi alterado pela presença da GUO (Fig. 1A). Através da adição de oligomicina observamos que as fatias de hipocampo submetidas à PGO-R apresentaram visível redução na síntese de ATP acoplada a atividade da ATP sintase. Não foi observada alteração no tratamento com GUO (Fig. 1B). As fatias de hipocampo submetidas à PGO-R apresentam uma clara diminuição da atividade de transferência de elétrons induzida pelo FCCP e o mesmo efeito foi observado no grupo que recebeu GUO (Fig. 1C). Adicionalmente, a relação entre a respiração máxima e a síntese de ATP acoplada à ATP sintase possibilitou a avaliação do controle respiratório das fatias de hipocampo. Observamos que a PGO-R reduziu a capacidade respiratória das células hipocâmpais e este efeito não foi alterado pela GUO.

A**B**

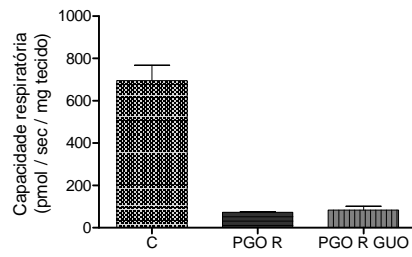
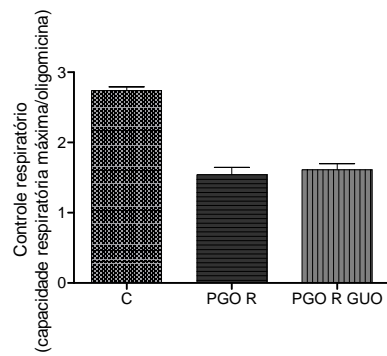
C**D**

Figura 1. Consumo de oxigênio em fatias de hipocampo submetidas à PGOR e/ou GUO. As fatias de hipocampo de ratos foram mantidas na situação controle (C), submetidas à 15 min de privação de glicose e oxigênio seguidas de 2h de reoxigenação (PGOR) e submetidas à 15 min de PGOR seguidas de 2h de reoxigenação tratadas com GUO 100 μ M (PGOR GUO). O consumo de oxigênio foi avaliado através da respiração

basal (**A**), contribuição da ATP sintase ao consumo basal de oxigênio (**B**), respiração máxima (**C**) e capacidade respiratória (**D**), conforme descrito no material e métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 2 experimentos.

A capacidade máxima respiratória (Fig. 1C) encontra-se intimamente relacionada com a transferência de elétrons a partir de substratos energéticos. Uma redução neste parâmetro de fisiologia mitocondrial envolve, portanto, inibição em pelo menos um complexo enzimático da cadeia respiratória. Assim, a seguir foi avaliada a atividade dos complexos mitocondriais I, II e IV. Como pode ser observado na Figura 2, as fatias de hipocampo submetidas à PGOR apresentaram uma redução significativa da atividade do complexo II (Figura 3; até 39% de inibição). A PGOR também promoveu uma diminuição de até 19% na atividade do complexo IV, porém este efeito não foi significativo (Fig. 3). Curiosamente, não observamos alteração da atividade do complexo I nas fatias submetidas ao dano isquêmico (Fig. 2). No entanto, como a metodologia empregada para determinar esta atividade enzimática avalia também a atividade NADH desidrogenase, incluindo aquela do complexo I, esta falta de inibição pode ser devido a uma compensação ocasionada por outras desidrogenases mitocondriais ou citosólicas. Ainda, pode ser observado na Figura 2B que o tratamento com GUO durante o período de reoxigenação não protegeu da inibição da atividade do complexo II mitocondrial provocado pela PGO.

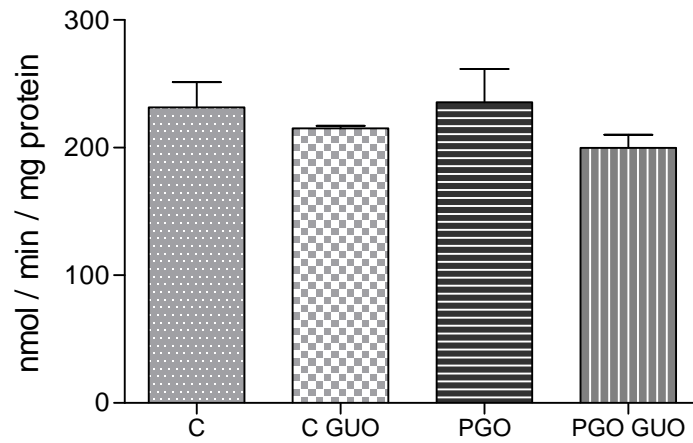


Figura 2. Efeito da privação de glicose e oxigênio e do tratamento com GUO sobre a atividade NADH desidrogenase. As fatias de hipocampo de ratos foram mantidas na situação controle (C), controle tratadas com CGUO 100 μ M, submetidas à 15 min de PGO seguidas de 2h de reoxigenação (PGOR) e submetidas à 15 min de PGO seguidas de 2h de reoxigenação tratadas com GUO 100 μ M (PGOR GUO). Os valores representam a média \pm erro padrão da média padrão de 3 experimentos.

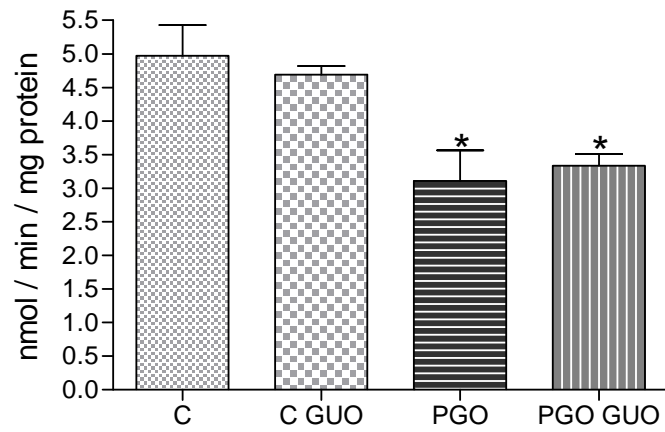


Figura3. Efeito da privação de glicose e oxigênio e do tratamento com GUO sobre a atividade do complexo II. As fatias de hipocampo de ratos foram mantidas na situação controle (C), controle tratadas com GUO 100 μ M (C GUO), submetidas à 15 min de PGO seguidas de 2h de reoxigenação (PGO) e submetidas à 15 min de PGO seguidas de 2h de reoxigenação tratadas com GUO 100 μ M (PGO GUO). Os valores representam a média \pm erro padrão da média padrão de 3 experimentos. * Indica médias significativamente diferentes do grupo controle, $p < 0.05$. ANOVA seguido do teste de Tukey.

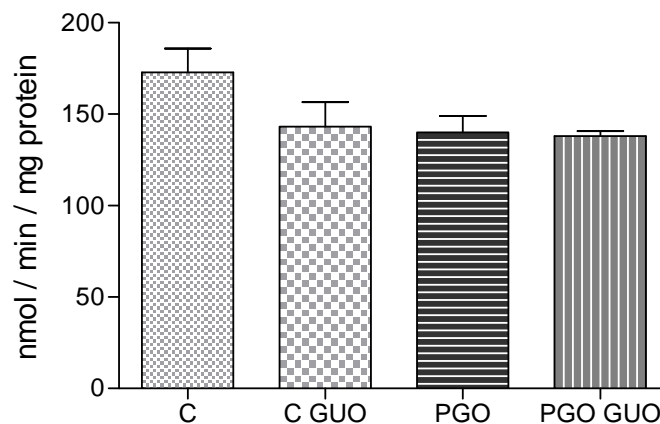


Figura4. Efeito da privação de glicose e oxigênio e do tratamento com GUO sobre a atividade do complexo IV. As fatias de hipocampo de ratos foram mantidas na situação controle (C), controle tratadas com GUO 100 μ M (C GUO), submetidas à 15 min de PGO seguidas de 2h de reoxigenação (PGO) e submetidas à 15 min de PGO seguidas de 2h de reoxigenação tratadas com GUO 100 μ M (PGO GUO). Os valores representam a média \pm erro padrão da média padrão de 3 experimentos.

Estes dados preliminares indicam que o dano induzido pela PGO e reoxigenação causa uma queda na respiração celular e tratamento com GUO não resulta em mitoproteção (Fig. 1A). A redução do consumo de oxigênio parece estar relacionada, por um lado, com uma queda na capacidade de síntese de ATP, visto que a contribuição da ATP sintase à respiração basal foi significativamente reduzida pelo PGOR (Fig. 1B; uso de oligomicina). Por outro lado, a redução na respiração celular também estaria relacionada com uma inibição no transporte de elétrons na cadeia respiratória (Fig. 1C; estado IV de respiração celular induzido pelo uso de oligomicina). Este resultado está de acordo com a significativa inibição do complexo II mitocondrial (Fig. 2C) e com a redução de até 19% do complexo IV (Fig. 2C). Estas inibições estão também de acordo com a redução significativa observada na transferência de elétrons sob o efeito do ionóforo FCCP, parâmetro que estima a capacidade oxidativa máxima da mitocôndria (Fig. 1C). O comprometimento no transporte de elétrons observado nestes experimentos preliminares, certamente induzirá uma perda do potencial

de membrana mitocondrial, fenômeno que repercutirá na capacidade de síntese mitocondrial de ATP (Fig. 1B), e dessa forma no grau de acoplamento mitocondrial ou capacidade respiratória (Fig. 1D).

Os dados apresentados neste capítulo, embora preliminares, apresentam um perfil que sugerem um severo comprometimento da respiração celular provocado pelo PGOR sendo que o tratamento com GUO não alterou nenhum dos parâmetros avaliados. Entretanto, considerando que a GUO notavelmente apresenta efeito neuroprotetor contra à PGO é provável que o tratamento com GUO recupere de alguma forma a energética celular através do metabolismo anaeróbico. Portanto, futuramente iremos avaliar os níveis de lactato um importante substrato energético que poderia estar suprimindo a necessidade energética das células nas fatias de hipocampo submetidas à PGO e tratadas com GUO.

REFERÊNCIAS

- BOVERIS, A. B. CHANCE. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**,134,(3): 707-716,1973.
- CASSINA, A. R. RADI. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxy nitrite on mitochondrial electron transport. **Arch Biochem Biophys**,328,(2): 309-316,1996.
- FISCHER, J. C., W. RUITENBEEK, J. A. BERDEN, J. M. TRIJBELS, J. H. VEERKAMP, A. M. STADHOUDERS, R. C. SENGERS A. J. JANSSEN. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin Chim Acta**,153,(1): 23-36,1985.
- KENNEDY, E. P. A. L. LEHNINGER. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. **J Biol Chem**,179,(2): 957-972,1949.
- KENNEDY, E. P. A. L. LEHNINGER. The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. **J Biol Chem**,185,(1): 275-285,1950.
- KENNEDY, E. P. A. L. LEHNINGER. Activation of fatty acid oxidation by dihydrodiphosphopyridine nucleotide. **J Biol Chem**,190,(1): 361-368,1951.
- KHEYR-POUR, A., K. BANANEJ, G. A. DAFALLA, P. CACIAGLI, E. NORIS, A. AHOONMANESH, H. LECOQ B. GRONENBORN. Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: Sequence Comparisons and Identification of a Whitefly-Transmission Determinant. **Phytopathology**,90,(6): 629-635,2000.
- LATINI, A., M. RODRIGUEZ, R. BORBA ROSA, K. SCUSSIATO, G. LEIPNITZ, D. REIS DE ASSIS, G. DA COSTA FERREIRA, C. FUNCHAL, M. C. JACQUES-SILVA, L. BUZIN, R. GIUGLIANI, A. CASSINA, R. RADI M. WAJNER. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience**,135,(1): 111-120,2005.
- LEHNINGER, A. C. M. NELSON D (2004). Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: Principles of Biochemistry. New York.
- LEHNINGER, A. L. S. W. SMITH. Efficiency of phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. **J Biol Chem**,181,(1): 415-429,1949.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR R. J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**,193,(1): 265-275,1951.

MARKS, D. B., A. D. MARKS C. M. SMITH (1996). Basic Medical Biochemistry: a clinical approach.

MOLZ, S., T. DAL-CIM, J. BUDNI, M. D. MARTIN-DE-SAAVEDRA, J. EGEA, A. ROMERO, L. DEL BARRIO, A. L. RODRIGUES, M. G. LOPEZ C. I. TASCA. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3 β pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. J Neurosci Res, 89,(9): 1400-1408,2011.

MOLZ, S., D. C. THARINE, H. DECKER C. I. TASCA. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. Brain Res, 1231,(113-120,2008.

RUSTIN, P., D. CHRETIEN, T. BOURGERON, B. GERARD, A. ROTIG, J. M. SAUDUBRAY A. MUNNICH. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta, 228,(1): 35-51,1994.

SANTARELLI, R., I. DEL CASTILLO, M. RODRIGUEZ-BALLESTEROS, P. SCIMEMI, E. CAMA, E. ARSLAN A. STARR. Abnormal cochlear potentials from deaf patients with mutations in the otoferlin gene. J Assoc Res Otolaryngol, 10,(4): 545-556,2009.

STRASSER, U. G. FISCHER. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. J Neurosci Methods, 57,(2): 177-186,1995.

THOMAZI, A. P., B. BOFF, T. D. PIRES, G. GODINHO, C. E. BATTU, C. GOTTFRIED, D. O. SOUZA, C. SALBEGO S. T. WOFCHUK. Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: developmental aspects and protection by guanosine. Brain Res, 1188,(233-240,2008.

DISCUSSÃO

Os efeitos extracelulares da GUO têm sido alvo de investigação pela comunidade científica. Esses efeitos estão relacionados com a modulação da transmissão glutamatérgica, bem como sobre a memória, comportamento e ainda efeitos tróficos em célula neurais (SCHMIDT et al., 2007). Neste estudo nós objetivamos avaliar os mecanismos neuroprotetores promovidos pela GUO, em células neurais, frente ao dano isquêmico e oxidativo.

Com intuito de investigar possíveis sítios de ação extracelular para a GUO, utilizamos dados prévios do nosso laboratório, que sugeriram que os efeitos protetores e neurotróficos da GUO envolviam a ativação de receptores de adenosina e modulação da atividade de canais de potássio, mais especificamente os canais de potássio dependentes de cálcio de alta condutância (BK) (DAL-CIM et al., 2011; OLESKOVICZ et al., 2008; TASCA et al., 2010). Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que os efeitos neuroprotetores da GUO em uma cultura de neuroblastoma humano submetida a um dano oxidativo, envolvem a modulação de receptores de adenosina dos subtipos A₁R e A_{2A}R e dos canais de potássio BK. Entretanto, quando avaliamos a participação desses sítios de interação em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO, observamos que a ativação de A₁R é capaz de conter o dano oxidativo e inflamatório decorrente da isquemia. Já a participação do canal BK parece mediar os efeitos sobre a viabilidade celular e captação de glutamato (DAL-CIM et al., 2011) não apresentando efeito sobre a atividade mitocondrial e o dano inflamatório. Por fim, observamos que a ativação de A_{2A}R, em fatias de hipocampo submetidas à PGO, bloqueia os efeitos protetores da GUO, sugerindo que a modulação dos possíveis sítios de interação extracelular pela GUO depende do tipo celular ou do dano aos quais as células foram submetidas.

Em relação à modulação de A_{2A}R por GUO, foi previamente demonstrado que a GUO promove crescimento neurítico em células PC12 (THAUERER et al., 2012b) e aumenta o número de neurônios cerebelares mantidos em cultura primária através da ativação de A_{2A}R (TASCA et al., 2010). Estes dados sugerem que os A_{2A}R podem estar mediando os efeitos desencadeados pela GUO em células neurais.

Os efeitos da ativação do A_{2A}R no SNC são bastante contraditórios, podendo ter sua ativação associada a eventos de morte e de proteção celular. A ativação de A_{2A}R diminui as correntes induzidas pelo receptor NMDA em neurônios estriatais ((NORENBERG et al.,

1997; WIRKNER et al., 2000). O uso de agonistas de A_{2A}R promove proteção contra trauma crânio-encefálico (OKONKWO et al., 2006) e em danos isquêmicos na medula espinhal (CASSADA et al., 2001; REECE et al., 2004). Por outro lado, como a ativação de A_{2A}R é definida como facilitatória, ou seja, aumenta a liberação de neurotransmissores como o glutamato e promove aumento dos níveis de cálcio intracelular, a ativação deste receptor em eventos de dano celular poderia contribuir para a morte celular (CUNHA, 2005). Nossos dados também corroboram com essa ideia, uma vez que a ativação de A_{2A}R em fatias de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio impede que a GUO promova aumento da captação de glutamato e exerça seus efeitos neuroprotetores.

Já é bem descrito na literatura que tanto a inibição farmacológica como a deleção genética dos A_{2A}R está relacionada com proteção em modelos animais de isquemia cerebral (CHEN et al., 1999; MARCOLI et al., 2003; MELANI et al., 2003). Estes efeitos neuroprotetores da inibição do A_{2A}R em eventos de excitotoxicidade podem ser relacionados com o fato de que a inibição do A_{2A}R diminui a liberação vesicular de glutamato (LI et al., 2001; NISHIZAKI et al., 2002). Além disso, estudo demonstrou que o uso de antagonistas de A_{2A}R previne completamente o aumento nos níveis extracelulares de glutamato decorrente da inibição dos transportadores de glutamato (PINTOR et al., 2004). Os pesquisadores do referido estudo sugeriram que este mecanismo de proteção pode ser devido à remoção da influência inibitória exercida pelo A_{2A}R sobre os transportadores de glutamato permitindo a atividade destes transportadores. Corroborando esta idéia, um recente estudo demonstrou que a ativação de A_{2A}R em cultura de astrócitos resulta em diminuição na expressão e atividade dos transportadores de glutamato (GLAST e GLT-1) (MATOS et al., 2012). Estes dados contribuem para entender o mecanismo de ação da GUO visto que, em fatias de hipocampo que foram previamente incubadas com o agonista do A_{2A}R o tratamento com GUO não foi capaz de estimular a captação de glutamato. Provavelmente a ativação de A_{2A}R inibe drasticamente a atividade dos transportadores de glutamato e este efeito, que juntamente com o efeito exercido pela PGO sobre a captação de glutamato, impedem que a GUO exerça seus efeitos neuroprotetores.

Estes efeitos paradoxos da ativação de A_{2A}R sobre os danos cerebrais podem refletir a complexa interação entre esses receptores com outros sistemas de neurotransmissão (como o sistema glutamatérgico) no cérebro. Uma das hipóteses para explicar este efeito dual do A_{2A}R sugere que a ativação pré-sináptica destes receptores

parece ser deletéria, enquanto que a estimulação de A_{2A}R pós-sináptico evocaria eventos protetores (BLUM et al., 2003). Outro estudo demonstrou que dependendo das concentrações extracelulares de glutamato, a ativação de A_{2A}R pode ser protetora (baixas concentrações de glutamato) ou exacerbar (altas concentrações de glutamato) o dano celular decorrente do traumatismo crânio encefálico *in vivo* (DAI et al., 2010). Isto mostra que a complexidade dos eventos celulares desencadeados pela ativação de A_{2A}R está relacionada com sua localização celular e aparentemente depende também dos níveis extracelulares do neurotransmissor glutamato.

Em nosso estudo, também observamos a participação de A₁R na neuroproteção promovida pela GUO em células do neuroblastoma humano SH-SY5Y submetidas ao dano mitocondrial bem como em fatias de hipocampo submetidas à PGO. A ativação de A₁R parece ser uma importante estratégia neuroprotetora em eventos de isquemia cerebral uma vez que sua ativação controla o influxo de cálcio, o metabolismo celular e a liberação de glutamato (FREDHOLM et al., 2005; PALMER & STILES, 1995). O uso de agonista de A₁R ou de drogas que inibem a receptação de adenosina diminuem o dano cerebral decorrente da isquemia (DE MENDONCA et al., 2000). Assim a ativação desses receptores pela GUO poderia controlar os níveis de Ca²⁺ intracelular e conseqüentemente diminuir o estresse oxidativo. Além disso, a ativação de A₁R poderia contribuir diminuindo a liberação vesicular de glutamato para o espaço sináptico, contendo a cascata excitotóxica de morte celular.

Outro ponto a ser discutido aqui é a possível interação da GUO com os oligômeros dos receptores de adenosina, como o heterômero A₁R-A_{2A}R. A ocorrência dos heterômeros de A₁R-A_{2A}R já foi demonstrada em células HEK293 transfectadas com estes receptores e em tecido nativo, nos terminais glutamatérgicos presentes no estriado, sendo que a presença desses complexos funcionais modula a neurotransmissão glutamatérgica nesta estrutura cerebral (CIRUELA et al., 2006). Além disso, o A_{2A}R pode atuar controlando a funcionalidade do A₁R. Tem sido proposto que, quando A₁R e A_{2A}R estão formando um oligômero, ocorre uma ativação hierárquica de A_{2A}R sobre A₁R que modulará a transmissão purinérgica (CIRUELA et al., 2012). No presente estudo não avaliamos diretamente se a GUO desencadeia seu papel neuroprotetor através da modulação desses heterômeros, porém, observamos nas fatias de hipocampo de ratos submetidos à PGO, uma complexa interação da GUO com A₁R e A_{2A}R. Demonstramos que antagonistas dos A₁R ou A_{2A}R não bloqueiam o efeito da GUO sobre a

captação de glutamato, mas a ativação do A_{2A}R bloqueia este efeito da GUO. No entanto, o bloqueio farmacológico de A₁R ou a ativação de A_{2A}R impedem a melhora da viabilidade celular desencadeada pela GUO. Dados não publicados de nosso laboratório demonstraram que a GUO interage com A_{2A}R transfectados para células HEK293 e promove um pequeno aumento de cálcio intracelular em células co-transfectadas com A₁R e A_{2A}R (Tasca e colaboradores, comunicação pessoal). Tomados em conjunto, estes resultados nos indicam um provável efeito antagonístico do receptor A_{2A}R sobre o papel protetor da GUO, já que a ativação deste receptor inibe os efeitos neuroprotetores da GUO nas fatias de hipocampo de ratos. Por outro lado, este efeito não foi observado em neuroblastomas, células que podem ter seus mecanismos de proteção diferenciados, por se tratar de uma linhagem celular e provavelmente apresentar mais resistência que células normais. Desta forma, estas diferenças entre tipos celulares e o real envolvimento dos receptores de adenosina nos efeitos protetores da GUO, merecem ainda atenção em estudos futuros.

O envolvimento dos canais BK no efeito protetor da GUO também foi avaliado neste estudo. A inibição do canal BK pela caribdotoxina preveniu o efeito protetor da GUO frente ao dano oxidativo mitocondrial nas células SH-SY5Y. Por outro lado, nas fatias de hipocampo de ratos o bloqueio dos canais BK reverteu o efeito da GUO em diminuir a produção ROS na região CA1 do hipocampo, não apresentando efeito sobre a atividade mitocondrial ou sobre os mediadores inflamatórios analisados. Em estudo realizado anteriormente, demonstramos que a GUO estimula a captação de glutamato através da ativação de canais BK (DAL-CIM et al., 2011). Adicionalmente, estudo prévio demonstrou que a GUO aumenta a expressão de canais de potássio em astrócitos (BENFENATI et al., 2006) e a avaliação eletrofisiológica da atividade dos canais BK transfectados em células HEK293, demonstrou que a GUO ativa os BK, promovendo uma corrente de potássio (Tasca e colaboradores, comunicação pessoal). Desta forma, se a GUO ativa os BK, isto poderia resultar em uma diminuição dos níveis intracelulares de Ca²⁺, contribuindo com a manutenção da viabilidade celular. Adicionalmente, a modulação dos canais BK poderia prevenir a perda do potencial de membrana celular e estes eventos resultariam na manutenção da atividade dos transportadores de glutamato (DANBOLT, 2001).

Apesar de nossos dados indicarem fortemente uma interação entre a GUO, os receptores de adenosina e (não em todos os efeitos observados) com o canal de potássio BK, não podemos excluir a

possibilidade de a GUO estar agindo através de um receptor próprio e secundariamente modulando a atividade dos receptores de adenosina e do canal de potássio BK. Ainda não existem ferramentas farmacológicas para demonstrar uma interação direta da GUO com seu possível receptor de membrana visto que o mesmo não foi identificado e clonado. Estudos que dão embasamento a esta hipótese demonstraram que o GTP une-se a sítios específicos em células (PC12) (GYSBER et al., 2000) e em membranas cerebelares de pintos (TASCA et al., 1999). Estudo realizado por TRAVERSA colaboradores 2002 demonstrou que a GUO apresenta um sítio de união de alta afinidade em preparações de membranas de cérebros de ratos. Recentemente demonstrou-se que a GUO se une a um possível receptor acoplado a proteína-G que segundo os autores é distinto dos receptores já caracterizados das purinas da adenina (VOLPINI et al., 2011), apesar de o detalhamento metodológico suscitar dúvidas quanto a esta conclusão. No entanto, em relação à dependência de interação com proteínas-G, nossos dados demonstram que a inibição de proteínas-G da família das *Gi/Go* pela toxina Pertussis, reverte o efeito da GUO sobre a viabilidade celular e a captação de glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Desta maneira, observamos que o efeito da GUO depende da interação com um receptor (ou receptores) acoplado a uma proteína-*Gi/Go*.

Em relação às vias de sinalização intracelular, vários estudos vêm apontando que o efeito neuroprotetor da GUO depende da ativação da via PI3K/AKT (DI IORIO et al., 2004; MOLZ et al., 2011; OLESKOVICZ et al., 2008). Nosso grupo demonstrou que a GUO promove proteção e estimulação da captação de glutamato frente à PGO via ativação da via de sinalização PI3K/AKT (DAL-CIM et al., 2011). Os efeitos protetores da GUO em células de neuroblastoma humano expostos a um dano oxidativo mitocondrial envolvem a ativação da via de sinalização PI3K/AKT e inibição da via da GSK-3 β . Neste mesmo estudo, observamos que o papel da GUO sobre a diminuição da produção de EROs depende da ativação da via PI3K/AKT. Além disso, demonstramos que a ação neuroprotetora da GUO contra o dano oxidativo mitocondrial resulta em aumento de expressão da enzima antioxidante heme oxigenase-1 (HO-1). A HO-1 é uma enzima de defesa celular com papel antioxidante e anti-inflamatório (SALINAS et al., 2003). O aumento da atividade dessa enzima resulta em modesta indução nos níveis intracelulares de bilirrubina e biliverdina e estudos demonstram que baixas concentrações de bilirrubina é neuroprotetora em cultura de neurônios expostos a danos tóxicos (DORE & SNYDER, 1999; KU et al., 2006). Assim, como observamos que o tratamento com

bilirrubina exerce efeitos neuroprotetores da mesma maneira que o tratamento com GUO em cultura de neuroblastoma humano podemos sugerir que o papel protetor da GUO contra o aumento excessivo de EROs é devido a seu papel sobre a atividade da enzima HO-1. Em culturas de astrócitos corticais submetidas à PGO o inibidor da via da PI3K/AKT previne parcialmente o aumento da produção de EROs decorrentes do insulto isquêmico, sugerindo que a via de sinalização PI3K/AKT possa estar mais relacionada a um efeito protetor da GUO em células neuronais, apesar de também ser ativada em células astrocitárias.

Recentemente tem se dado atenção ao papel da via da MEK/ERK no papel protetor dos nucleosídeos da purina frente a danos isquêmicos (THAUERER et al., 2012). Como comentado acima, a ativação da via da MEK/ERK está envolvida na regulação dos níveis de EROs intracelulares e na regulação da atividade mitocondrial observada em fatias de hipocampo. A perda do potencial de membrana mitocondrial é símbolo da disfunção mitocondrial e contribui para a morte celular através da redução na produção de ATP, aumento da produção de EROs e liberação de moléculas sinais reguladoras da morte celular apoptótica (CHRISTOPHE & NICOLAS, 2006). Desta forma a manutenção do potencial de membrana mitocondrial é essencial para que as células mantenham seu metabolismo e função. Neste trabalho observamos que a PGO desencadeia despolarização da membrana mitocondrial, sendo que a GUO é capaz de manter o potencial de membrana mitocondrial aos níveis basais e reduzir a produção de EROs promovida pela PGO. Este efeito da GUO é de grande relevância levando-se em consideração que o tecido cerebral é particularmente sensível ao estresse oxidativo gerado durante a isquemia cerebral. Desta forma o papel da GUO sobre a modulação da atividade mitocondrial e manutenção do status redox celular é de crucial importância para seu efeito neuroprotetor.

Sabe-se que em eventos de isquemia cerebral a excessiva produção de EROs resulta em ativação do fator de transcrição NF- κ B que é o principal mediador inflamatório em tecidos neurais. Essa ativação pode resultar em transcrição de genes relacionados com inflamação, como os que codificam citocinas pró-inflamatórias e a enzima iNOS (MADRIGAL et al., 2006). No presente estudo demonstramos que a PGO induz a ativação do fator de transcrição NF- κ B em fatias de hipocampo. Um estudo prévio demonstrou que o tratamento com GUO (300 μ M) é capaz de inibir a fosforilação da

subunidade ativa do NF- κ B p65, induzida pelo peptídeo beta-amilóide (D'ALIMONTE et al., 2007). Demonstramos também que uma menor concentração de GUO (100 μ M) diminui a translocação da subunidade p65 (que contém o domínio de ativação transcricional) no núcleo de células hipocâmpais submetidas ao protocolo de PGO. Além disso, avaliamos a expressão da enzima iNOS, que é um dos alvos de regulação de expressão do NF- κ B, e demonstramos que o tratamento com a GUO diminui os níveis de expressão de iNOS induzidos pelo dano isquêmico. O aumento dos níveis de NO através da indução da enzima iNOS pode resultar em inibição da atividade do complexo-I da cadeia transportadora de elétrons, além de reagir com o ânion superóxido formando peroxinitrito, um potente oxidante. (BROWN, 2010). Assim, a inibição de iNOS tem sido considerada uma importante estratégia neuroprotetora contra insultos isquêmicos (IADECOLA & ROSS, 1997; MORO et al., 2004).

Neste estudo, também demonstramos a importância da ativação da via ERK1/2 na modulação da captação de glutamato promovida pela GUO. A PGO reduz a captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos e o tratamento com GUO reverte este efeito. A inibição da ERK 1/2 previne o efeito da GUO sobre o transporte de glutamato. Este mesmo efeito apresentado pela GUO foi observado nas culturas de astrócitos corticais, onde a inibição da via da ERK1/2 também bloqueia o aumento da captação de glutamato promovida pela GUO. A participação da via de sinalização ERK1/2 na modulação dos transportadores de glutamato astrocitários já foi demonstrada em estudos anteriores (GEGELASHVILI et al., 2000; ZELENIAIA et al., 2000) e a ativação de ERK1/2 está relacionada com aumento da atividade dos transportadores astrocitários de glutamato (LEE et al., 2009). Então, possivelmente o tratamento com GUO leva à ativação de ERK1/2 em células astrocitárias, o que resulta em aumento da atividade dos transportadores de glutamato astrocitários, que são os mais efetivos na retirada do glutamato extracelular (NIEOULLON et al., 2006), e dessa forma, finaliza a cascata de morte excitotóxica decorrente do dano isquêmico.

Ainda em relação às vias de sinalização envolvidas na modulação do transporte de glutamato, poderíamos sugerir que, a participação da via de PI3K/AKT pela GUO aumentando a atividade dos transportadores de glutamato, demonstrada previamente por nosso grupo (DAL-CIM et al., 2011), possa estar acontecendo em células neuronais uma vez que a inibição dessa via não compromete os efeitos

estimulatórios da GUO sobre o transporte de glutamato em cultura de astrócitos corticais. Além disso, em estudo realizado por SIMS e colaboradores (2000), foi demonstrado que a inibição da via PI3K bloqueia os efeitos do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em aumentar a atividade e disponibilidade do transportador neuronal de glutamato EAAC1 na membrana celular.

Além de estimular a captação de glutamato, a GUO é capaz de diminuir a liberação de glutamato em fatias de hipocampo submetidas a danos excitotóxicos como foi demonstrado aqui e em estudos prévios (MOLZ et al., 2011). A diminuição da liberação de glutamato promovida pela GUO parece ocorrer devido a sua capacidade de neutralizar o transporte reverso de glutamato. Estes efeitos da GUO sobre os transportadores de glutamato são de extrema importância, uma vez que alteração no transporte de glutamato seja por uma diminuição da atividade desses transportadores ou por uma ação reversa dos mesmos é associada com doenças neurodegenerativas crônicas como Alzheimer, Parkinson e em eventos crônicos como o trauma crânio-encefálico e acidente vascular cerebral (SHELDON & ROBINSON, 2007).

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram um importante papel da GUO sobre as células astrocitárias. Cultura de astrócitos submetidos à PGO apresentaram diminuição da viabilidade celular, aumento de EROs e diminuição da captação de glutamato e todos esses parâmetros foram melhorados com o tratamento com GUO. Adicionalmente, demonstramos pela primeira vez que a GUO aumenta a atividade da glutamina sintetase (GS) em fatias de hipocampo de ratos submetidas ao dano isquêmico. A atividade da GS constitui um mecanismo endógeno de proteção contra a neurotoxicidade do glutamato por catalisar a conversão de um aminoácido tóxico (glutamato) para um aminoácido não tóxico (glutamina), assim a manutenção da atividade da GS pode ser uma interessante estratégia neuroprotetora (HOSHI et al., 2006; STELMASHOOK et al., 2007; ZHANG et al., 2011). Além disso, visto a capacidade da GUO em promover aumento da captação de glutamato e a manutenção da atividade da GS, podemos sugerir que a GUO pode afetar diretamente o “turnover” de glutamato durante eventos excitotóxicos. Reforçando essa idéia, nosso grupo demonstrou que os derivados da guanina, incluindo a GUO, diminuem a captação de glutamato em vesículas sinápticas (TASCA et al., 2004), reduzindo assim a quantidade de glutamato que pode vir a ser liberado após uma despolarização. Estes dados demonstram que a GUO pode interferir nas etapas de transporte e

metabolização do neurotransmissor glutamato, reforçando seu importante papel sobre a modulação do sistema glutamatérgico.

Considerando que a GUO promoveu proteção contra o dano oxidativo e comprometimento do potencial de membrana mitocondrial durante a PGO, nós objetivamos avaliar o papel da GUO especificamente sobre a atividade dos complexos mitocondriais. Nossos resultados demonstraram que o tratamento das fatias hipocâmpais com GUO não foi capaz de conter a diminuição da atividade do complexo II da cadeia respiratória induzida pela PGO. Adicionalmente, dados preliminares indicam que o dano induzido pela PGO causa uma queda na respiração celular e o tratamento com GUO não foi capaz de reverter esse efeito. Considerando que, *i*) o tratamento com a GUO durante a isquemia é capaz de melhorar eventos celulares que dependem da manutenção do estado energético, como a captação de glutamato ou a atividade da enzima GS (capítulos 2,3 e 4); *ii*) a GUO não apresenta efeito sobre manutenção da atividade dos complexos da cadeia respiratória; *iii*) a GUO não previne a inibição da fosforilação oxidativa, podemos inferir que a GUO estimularia a glicólise anaeróbica com produção final de lactato, com o intuito de manter a funcionalidade celular. O lactato é o subproduto metabólico da glicólise, um processo que, apesar de ser menos eficiente do que a oxidação completa da glicose ao dióxido de carbono e água ocorre em todo o cérebro. É proposto na literatura que o lactato sintetizado nas células astrocíticas é repassado para os neurônios onde é utilizado como substrato metabólico (PELLERIN et al., 2007). Então, o tratamento com GUO poderia estar contribuindo para manutenção da síntese de lactato astrocítico que seria utilizado para manter a atividade neural durante eventos de baixa disponibilidade energética como ocorre durante a isquemia cerebral.

Finalmente, os dados apresentados nesta tese de doutorado demonstraram que a GUO é neuroprotetora contra o dano oxidativo e isquêmico em células neurais. O estudo do mecanismo neuroprotetor da GUO demonstrou que os efeitos desencadeados por esse nucleosídeo envolvem a modulação de receptores purinérgicos (A_1R e A_2AR), do canal de potássio BK e a ativação das vias de sinalização PI3K/AKT e ERK1/2. Através de sua ação protetora, GUO diminui a produção de EROs e contem eventos inflamatórios. Além disso, a GUO exerce efeitos sobre os transportadores de glutamato estimulando a sua atividade, bem como reduzindo sua ação reversa, o que poderia contribuir para a retirada do excesso de glutamato extracelular durante a isquemia (Fig. 2). Considerando que avaliamos diferentes eventos que estão envolvidos com a patogênese de doenças neurodegenerativas

agudas e crônicas e o tratamento com GUO foi efetivo em conter as respostas celulares desencadeadas por esses eventos, o nucleosídeo GUO apresenta potencial utilização como uma estratégia farmacológica frente à neurodegeneração.

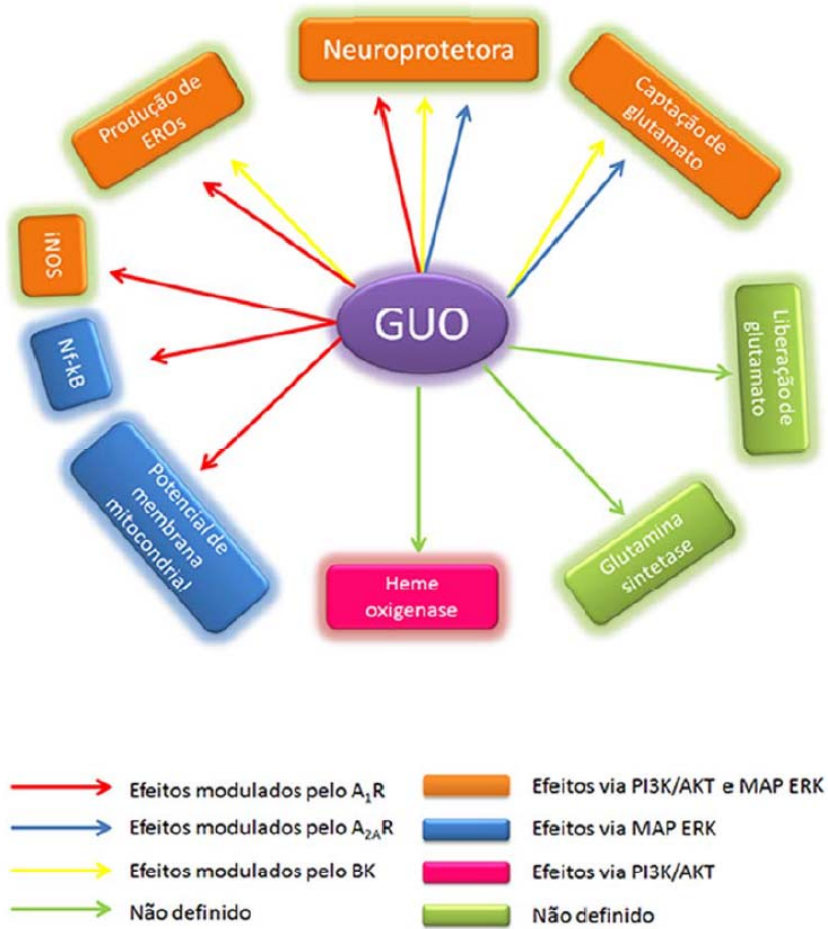


Figura 1. Resumo dos mecanismos neuroprotetores da GUO em células neurais e as possíveis vias de sinalização e sítios de interações envolvidos.

CONCLUSÕES

- A GUO é neuroprotetora contra o dano isquêmico e o dano oxidativo mitocondrial em células neurais.
- A neuroproteção promovida pela GUO em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y submetidas ao dano oxidativo decorrente da inibição da atividade mitocondrial envolve a ativação da via PI3K/AKT inibição da GSK-3 β e indução da enzima antioxidante heme oxigenase-1.
- A GUO protege fatias de hipocampo de ratos da privação de glicose e oxigênio (PGO) através da diminuição da produção de EROs, limitação do evento inflamatório e estimulação da captação de glutamato, eventos mediados pela ativação de receptores A₁R e pela via MAPK-ERK.
- O efeito da GUO sobre a atividade dos transportadores de glutamato nas fatias de hipocampo depende da inibição do receptor A_{2A}.
- O tratamento com GUO diminui a liberação de glutamato através da modulação da atividade reversa dos transportadores de glutamato.
- A GUO mantém a atividade da enzima glutamina sintetase após o evento isquêmico.
- O tratamento com GUO protege culturas de astrócitos contra o aumento da produção de EROs e diminuição da captação de glutamato induzido pela PGO.
- Os efeitos da GUO sobre as células astrocíticas são mediados pelas vias de sinalização PI3K e MAPK-ERK.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSIO, A. F., J. O. MALVA, A. P. CARVALHO C. M. CARVALHO. Inhibition of N-,P/Q- and other types of Ca²⁺ channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A1 receptor. **Eur J Pharmacol**,340,(2-3): 301-310,1997.
- ANDERSON, C. M. R. A. SWANSON. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**,32,(1): 1-14,2000.
- ATLANTE, A., P. CALISSANO, A. BOBBA, S. GIANNATTASIO, E. MARRA S. PASSARELLA. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. **FEBS Lett**,497,(1): 1-5,2001.
- BAL-PRICE, A. G. C. BROWN. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. **J Neurosci**,21,(17): 6480-6491,2001.
- BEART, P. M. R. D. O'SHEA. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. **Br J Pharmacol**,150,(1): 5-17,2007.
- BENFENATI, V., M. CAPRINI, M. NOBILE, C. RAPISARDA S. FERRONI. Guanosine promotes the up-regulation of inward rectifier potassium current mediated by Kir4.1 in cultured rat cortical astrocytes. **J Neurochem**,98,(2): 430-445,2006.
- BREZZI, P., GUNDERSEN, V., GALBETE, J.L., SEIFERT, G., STEINHÄUSER, C., PILATI, E., VOLTERRA, A. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. **Nature**, 7:613-620,2004
- BLUM, D., M. C. GALAS, A. PINTOR, E. BROUILLET, C. LEDENT, C. E. MULLER, K. BANTUBUNGI, M. GALLUZZO, D. GALL, L. CUVELIER, A. S. ROLLAND, P. POPOLI S. N. SCHIFFMANN. A dual role of adenosine A2A receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: implications for the neuroprotective potential of A2A antagonists. **J Neurosci**,23,(12): 5361-5369,2003.
- BOLL, M. C., M. ALCARAZ-ZUBELDIA C. RIOS. Medical management of Parkinson's disease: focus on neuroprotection. **Curr Neuropharmacol**,9,(2): 350-359,2011.
- BROWN, G. C. Nitric oxide and neuronal death. **Nitric Oxide**,23,(3): 153-165,2010.
- BURG, E. D., C. V. REMILLARD J. X. YUAN. K⁺ channels in apoptosis. **J Membr Biol**,209,(1): 3-20,2006.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol Life Sci**,64,(12): 1471-1483,2007.

- CAMACHO, A. L. MASSIEU. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. **Arch Med Res**,37,(1): 11-18,2006.
- CASSADA, D. C., J. J. GANGEMI, J. M. RIEGER, J. LINDEN, A. K. KAZA, S. M. LONG, I. L. KRON, C. G. TRIBBLE J. A. KERN. Systemic adenosine A2A agonist ameliorates ischemic reperfusion injury in the rabbit spinal cord. **Ann Thorac Surg**,72,(4): 1245-1250,2001.
- CASSANO, T., G. SERVIDDIO, S. GAETANI, A. ROMANO, P. DIPASQUALE, S. CIANCI, F. BELLANTI, L. LACONCA, A. D. ROMANO, I. PADALINO, F. M. LAFERLA, F. NICOLETTI, V. CUOMO G. VENDEMIALE. Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. **Neurobiol Aging**,33,(6): 1121 e1121-1112,2012.
- CHANG, R., A. ALGIRD, C. BAU, M. P. RATHBONE S. JIANG. Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo. **Neurosci Lett**,431,(2): 101-105,2008.
- CHEN, J. F., Z. HUANG, J. MA, J. ZHU, R. MORATALLA, D. STANDAERT, M. A. MOSKOWITZ, J. S. FINK M. A. SCHWARZSCHILD. A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. **J Neurosci**,19,(21): 9192-9200,1999.
- CHOI, D. W., J. Y. KOH S. PETERS. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. **J Neurosci**,8,(1): 185-196,1988.
- CHRISTOPHE, M. S. NICOLAS. Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. **Curr Pharm Des**,12,(6): 739-757,2006.
- CICCARELLI, R., P. BALLERINI, G. SABATINO, M. P. RATHBONE, M. D'ONOFRIO, F. CACIAGLI P. DI IORIO. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **Int J Dev Neurosci**,19,(4): 395-414,2001.
- CICCARELLI, R., P. DI IORIO, I. D'ALIMONTE, P. GIULIANI, T. FLORIO, F. CACIAGLI, P. J. MIDDLEMISS M. P. RATHBONE. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. **Glia**,29,(3): 202-211,2000.
- CIRUELA, F., V. CASADO, R. J. RODRIGUES, R. LUJAN, J. BURGUENO, M. CANALS, J. BORYCZ, N. REBOLA, S. R. GOLDBERG, J. MALLOL, A. CORTES, E. I. CANELA, J. F. LOPEZ-GIMENEZ, G. MILLIGAN, C. LLUIS, R. A. CUNHA, S. FERRE R.

- FRANCO. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. **J Neurosci**, 26,(7): 2080-2087, 2006.
- CIRUELA, F., V. FERNANDEZ-DUENAS, J. LLORENTE, D. BORROTO-ESCUELA, M. L. CUFFI, L. CARBONELL, S. SANCHEZ, L. F. AGNATI, K. FUXE C. I. TASCA. G protein-coupled receptor oligomerization and brain integration: Focus on adenosinergic transmission. **Brain Res** 2012.
- COYLE, J. T. P. PUTTFARCKEN. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, 262,(5134): 689-695, 1993.
- CRACK, P. J. J. M. TAYLOR. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. **Free Radic Biol Med**, 38,(11): 1433-1444, 2005.
- CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. **Purinergic Signal**, 1,(2): 111-134, 2005.
- D'ALIMONTE, I., V. FLATI, M. D'AURO, E. TONIATO, S. MARTINOTTI, M. P. RATHBONE, S. JIANG, P. BALLERINI, P. DI IORIO, F. CACIAGLI R. CICCARELLI. Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells. **J Immunol**, 178,(2): 720-731, 2007.
- DAI, S. S., Y. G. ZHOU, W. LI, J. H. AN, P. LI, N. YANG, X. Y. CHEN, R. P. XIONG, P. LIU, Y. ZHAO, H. Y. SHEN, P. F. ZHU J. F. CHEN. Local glutamate level dictates adenosine A2A receptor regulation of neuroinflammation and traumatic brain injury. **J Neurosci**, 30,(16): 5802-5810, 2010.
- DAL-CIM, T., W. C. MARTINS, A. R. SANTOS C. I. TASCA. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca(2)+-activated K+ channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neuroscience**, 183,(212-220), 2011.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, 65,(1): 1-105, 2001.
- DE MENDONCA, A., A. M. SEBASTIAO J. A. RIBEIRO. Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. **Neuroreport**, 6,(8): 1097-1100, 1995.
- DE MENDONCA, A., A. M. SEBASTIAO J. A. RIBEIRO. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? **Brain Res Brain Res Rev**, 33,(2-3): 258-274, 2000.

- DE OLIVEIRA, D. L., J. F. HORN, J. M. RODRIGUES, M. E. FRIZZO, E. MORIGUCHI, D. O. SOUZA S. WOFCHUK. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. **Brain Res**,1018,(1): 48-54,2004.
- DECKER, H., S. S. FRANCISCO, C. B. MENDES-DE-AGUIAR, L. F. ROMAO, C. R. BOECK, A. G. TRENTIN, V. MOURA-NETO C. I. TASCA. Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. **J Neurosci Res**,85,(9): 1943-1951,2007.
- DI IORIO, P., P. BALLERINI, U. TRAVERSA, F. NICOLETTI, I. D'ALMONTE, S. KLEYWEGT, E. S. WERSTIUK, M. P. RATHBONE, F. CACIAGLI R. CICCARELLI. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. **Glia**,46,(4): 356-368,2004.
- DORE, S. S. H. SNYDER. Neuroprotective action of bilirubin against oxidative stress in primary hippocampal cultures. **Ann N Y Acad Sci**,890,(167-172),1999.
- DOYLE, K. P., R. P. SIMON M. P. STENZEL-POORE. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**,55,(3): 310-318,2008.
- DUNWIDDIE, T. V. H. L. HAAS. Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. **J Physiol**,369,(365-377),1985.
- EGEA, J., M. D. MARTIN-DE-SAAVEDRA, E. PARADA, A. ROMERO, L. DEL BARRIO, A. O. ROSA, A. G. GARCIA M. G. LOPEZ. Galantamine elicits neuroprotection by inhibiting iNOS, NADPH oxidase and ROS in hippocampal slices stressed with anoxia/reoxygenation. **Neuropharmacology**,62,(2): 1082-1090,2012.
- FAIRMAN, W. A. S. G. AMARA. Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. **Am J Physiol**,277,(4 Pt 2): F481-486,1999.
- FIELDS, R. D. G. BURNSTOCK. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nat Rev Neurosci**,7,(6): 423-436,2006.
- FREDHOLM, B. B. Purinoceptors in the nervous system. **Pharmacol Toxicol**,76,(4): 228-239,1995.
- FREDHOLM, B. B., J. F. CHEN, R. A. CUNHA, P. SVENNINGSSON J. M. VAUGEOIS. Adenosine and brain function. **Int Rev Neurobiol**,63,(191-270),2005.
- GANZELLA, M., E. D. DE OLIVEIRA, D. D. COMASSETTO, F. CECHETTI, V. H. CERESER, JR., J. D. MOREIRA, G. HANSEL, R. F. ALMEIDA, D. B. RAMOS, Y. N. FIGUEREDO, D. G. SOUZA, J.

- P. OSES, P. V. WORM, M. ACHAVAL, C. A. NETTO D. O. SOUZA. Effects of chronic guanosine treatment on hippocampal damage and cognitive impairment of rats submitted to chronic cerebral hypoperfusion. **Neurol Sci** 2011.
- GEGELASHVILI, G., Y. DEHNES, N. C. DANBOLT A. SCHOUSBOE. The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. **Neurochem Int**, 37,(2-3): 163-170, 2000.
- GENDA, E. N., J. G. JACKSON, A. L. SHELDON, S. F. LOCKE, T. M. GRECO, J. C. O'DONNELL, L. A. SPRUCE, R. XIAO, W. GUO, M. PUTT, S. SEEHOLZER, H. ISCHIROPOULOS M. B. ROBINSON. Co-compartmentalization of the astroglial glutamate transporter, GLT-1, with glycolytic enzymes and mitochondria. **J Neurosci**, 31,(50): 18275-18288, 2011.
- GHATTA, S., D. NIMMAGADDA, X. XU S. T. O'ROURKE. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. **Pharmacol Ther**, 110,(1): 103-116, 2006.
- GLOIRE, G., S. LEGRAND-POELS J. PIETTE. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. **Biochem Pharmacol**, 72,(11): 1493-1505, 2006.
- GOMES, C. V., M. P. KASTER, A. R. TOME, P. M. AGOSTINHO R. A. CUNHA. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. **Biochim Biophys Acta**, 1808,(5): 1380-1399, 2011.
- GUILLET, B. A., L. J. VELLY, B. CANOLLE, F. M. MASMEJEAN, A. L. NIEOULLON P. PISANO. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. **Neurochem Int**, 46,(4): 337-346, 2005.
- GYSBERS, J. W. M. P. RATHBONE. Neurite outgrowth in PC12 cells is enhanced by guanosine through both cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Neurosci Lett**, 220,(3): 175-178, 1996.
- HOSHI, A., T. NAKAHARA, H. KAYAMA T. YAMAMOTO. Ischemic tolerance in chemical preconditioning: possible role of astrocytic glutamine synthetase buffering glutamate-mediated neurotoxicity. **J Neurosci Res**, 84,(1): 130-141, 2006.
- HU, H., L. R. SHAO, S. CHAVOSHY, N. GU, M. TRIEB, R. BEHRENS, P. LAAKE, O. PONGS, H. G. KNAUS, O. P. OTTERSEN J. F. STORM. Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. **J Neurosci**, 21,(24): 9585-9597, 2001.

- HUANG, L., W. LI, B. LI F. ZOU. Activation of ATP-sensitive K channels protects hippocampal CA1 neurons from hypoxia by suppressing p53 expression. **Neurosci Lett**,398,(1-2): 34-38,2006.
- HUANG, Y. H. D. E. BERGLES. Glutamate transporters bring competition to the synapse. **Curr Opin Neurobiol**,14,(3): 346-352,2004.
- HUETTNER, J. E. Kainate receptors and synaptic transmission. **Prog Neurobiol**,70,(5): 387-407,2003.
- IADECOLA, C. M. E. ROSS. Molecular pathology of cerebral ischemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection. **Ann N Y Acad Sci**,835,(203-217),1997.
- KANAI, Y. M. A. HEDIGER. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. **Eur J Pharmacol**,479,(1-3): 237-247,2003.
- KENNY, P. J. A. MARKOU. The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. **Trends Pharmacol Sci**,25,(5): 265-272,2004.
- KIM, C. H., J. LEE, J. Y. LEE K. W. ROCHE. Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. **J Neurosci Res**,86,(1): 1-10,2008.
- KU, B. M., Y. JOO, J. MUN, G. S. ROH, S. S. KANG, G. J. CHO, W. S. CHOI H. J. KIM. Heme oxygenase protects hippocampal neurons from ethanol-induced neurotoxicity. **Neurosci Lett**,405,(3): 168-171,2006.
- LEE, E. S., M. SIDORYK, H. JIANG, Z. YIN M. ASCHNER. Estrogen and tamoxifen reverse manganese-induced glutamate transporter impairment in astrocytes. **J Neurochem**,110,(2): 530-544,2009.
- LI, X. X., T. NOMURA, H. AIHARA T. NISHIZAKI. Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors. **Life Sci**,68,(12): 1343-1350,2001.
- LIAO, Y., A. M. KRISTIENSEN, C. P. OKSVOLD, F. A. TUVNES, N. GU, E. RUNDEN-PRAN, P. RUTH, M. SAUSBIER J. F. STORM. Neuronal Ca²⁺-activated K⁺ channels limit brain infarction and promote survival. **PLoS One**,5,(12): e15601,2010.
- LOMAKO, J., W. M. LOMAKO, W. J. WHELAN, R. S. DOMBRO, J. T. NEARY M. D. NOREMBERG. Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen. **FASEB J**,7,(14): 1386-1393,1993.
- MADDEN, D. R. The structure and function of glutamate receptor ion channels. **Nat Rev Neurosci**,3,(2): 91-101,2002.

- MADRIGAL, J. L., B. GARCIA-BUENO, J. R. CASO, B. G. PEREZ-NIEVAS J. C. LEZA. Stress-induced oxidative changes in brain. **CNS Neurol Disord Drug Targets**,5,(5): 561-568,2006.
- MARCAGGI, P. D. ATTWELL. Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics. **Glia**,47,(3): 217-225,2004.
- MARCOLI, M., L. RAITERI, A. BONFANTI, A. MONOPOLI, E. ONGINI, M. RAITERI G. MAURA. Sensitivity to selective adenosine A1 and A2A receptor antagonists of the release of glutamate induced by ischemia in rat cerebrocortical slices. **Neuropharmacology**,45,(2): 201-210,2003.
- MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D., L. DEL BARRIO, N. CANAS, J. EGEA, S. LORRIO, E. MONTELL, J. VERGES, A. G. GARCIA M. G. LOPEZ. Chondroitin sulfate reduces cell death of rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation by inhibiting p38, NFkappaB and iNOS. **Neurochem Int**,58,(6): 676-683,2011.
- MATOS, M., E. AUGUSTO, A. D. SANTOS-RODRIGUES, M. A. SCHWARZSCHILD, J. F. CHEN, R. A. CUNHA P. AGOSTINHO. Adenosine A(2A) receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. **Glia**,60,(5): 702-716,2012.
- MATTSON, M. P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. **Neuromolecular Med**,3,(2): 65-94,2003.
- MATTSON, M. P., C. CULMSEE Z. F. YU. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. **Cell Tissue Res**,301,(1): 173-187,2000.
- MAY, M. J. S. GHOSH. I kappa B kinases: kinsmen with different crafts. **Science**,284,(5412): 271-273,1999.
- MELANI, A., L. PANTONI, F. BORDONI, M. GIANFRIDDO, L. BIANCHI, M. G. VANNUCCHI, R. BERTORELLI, A. MONOPOLI F. PEDATA. The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 reduces striatal transmitter outflow, turning behavior and ischemic brain damage induced by permanent focal ischemia in the rat. **Brain Res**,959,(2): 243-250,2003.
- MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**,130,(4S Suppl): 1007S-1015S,2000.
- MOLZ, S., T. DAL-CIM, J. BUDNI, M. D. MARTIN-DE-SAAVEDRA, J. EGEA, A. ROMERO, L. DEL BARRIO, A. L. RODRIGUES, M. G. LOPEZ C. I. TASCA. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase

- kinase 3beta pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. **J Neurosci Res**,89,(9): 1400-1408,2011.
- MORETTO, M. B., N. S. ARTENI, D. LAVINSKY, C. A. NETTO, J. B. ROCHA, D. O. SOUZA S. WOFCHUK. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. **Exp Neurol**,195,(2): 400-406,2005.
- MORO, M. A., A. CARDENAS, O. HURTADO, J. C. LEZA I. LIZASOAIN. Role of nitric oxide after brain ischaemia. **Cell Calcium**,36,(3-4): 265-275,2004.
- MULLER, C. E. T. SCIOR. Adenosine receptors and their modulators. **Pharm Acta Helv**,68,(2): 77-111,1993.
- NICIU, M. J., B. KELMENDI G. SANACORA. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**,100,(4): 656-664,2012.
- NIEOULLON, A., B. CANOLLE, F. MASMEJEAN, B. GUILLET, P. PISANO S. LORTET. The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? **J Neurochem**,98,(4): 1007-1018,2006.
- NISHIZAKI, T., K. NAGAI, T. NOMURA, H. TADA, T. KANNO, H. TOZAKI, X. X. LI, T. KONDOH, N. KODAMA, E. TAKAHASHI, N. SAKAI, K. TANAKA N. SAITO. A new neuromodulatory pathway with a glial contribution mediated via A(2a) adenosine receptors. **Glia**,39,(2): 133-147,2002.
- NORENBERG, W., K. WIRKNER P. ILLES. Effect of adenosine and some of its structural analogues on the conductance of NMDA receptor channels in a subset of rat neostriatal neurones. **Br J Pharmacol**,122,(1): 71-80,1997.
- OKONKWO, D. O., T. B. REECE, J. J. LAURENT, A. S. HAWKINS, P. I. ELLMAN, J. LINDEN, I. L. KRON, C. G. TRIBBLE, J. R. STONE J. A. KERN. A comparison of adenosine A2A agonism and methylprednisolone in attenuating neuronal damage and improving functional outcome after experimental traumatic spinal cord injury in rabbits. **J Neurosurg Spine**,4,(1): 64-70,2006.
- OLESKOVICZ, S. P., W. C. MARTINS, R. B. LEAL C. I. TASCA. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. **Neurochem Int**,52,(3): 411-418,2008.
- OLNEY, J. W. Excitotoxicity: an overview. **Can Dis Wkly Rep**,16 Suppl 1E,(47-57; discussion 57-48,1990.

- OZAWA, S., H. KAMIYA K. TSUZUKI. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**,54,(5): 581-618,1998.
- OZKAN, E. D. T. UEDA. Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. **Jpn J Pharmacol**,77,(1): 1-10,1998.
- PALMER, T. M. G. L. STILES. Adenosine receptors. **Neuropharmacology**,34,(7): 683-694,1995.
- PARPURA, V., B. J. BAKER, M. JERAS R. ZOREC. Regulated exocytosis in astrocytic signal integration. **Neurochem Int**,57,(4): 451-459,2010.
- PARPURA, V., T. A. BASARSKY, F. LIU, K. JEFTINIJA, S. JEFTINIJA P. G. HAYDON. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**,369,(6483): 744-747,1994.
- PELLERIN, L., A. K. BOUZIER-SORE, A. AUBERT, S. SERRES, M. MERLE, R. COSTALAT P. J. MAGISTRETTI. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. **Glia**,55,(12): 1251-1262,2007.
- PETRONILHO, F., S. R. PERICO, F. VUOLO, F. MINA, L. CONSTANTINO, C. M. COMIM, J. QUEVEDO, D. O. SOUZA F. DAL-PIZZOL. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. **Brain Behav Immun**,26,(6): 904-910,2012.
- PINTOR, A., M. GALLUZZO, R. GRIECO, A. PEZZOLA, R. REGGIO P. POPOLI. Adenosine A_{2A} receptor antagonists prevent the increase in striatal glutamate levels induced by glutamate uptake inhibitors. **J Neurochem**,89,(1): 152-156,2004.
- PIVOVAROVA, N. B. S. B. ANDREWS. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. **FEBS J**,277,(18): 3622-3636,2010.
- QUTUB, A. A. C. A. HUNT. Glucose transport to the brain: a systems model. **Brain Res Brain Res Rev**,49,(3): 595-617,2005.
- RATHBONE, M., L. PILUTTI, F. CACIAGLI S. JIANG. Neurotrophic effects of extracellular guanosine. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**,27,(6): 666-672,2008.
- RATHBONE, M. P., P. J. MIDDLEMISS, J. W. GYSBERS, C. ANDREW, M. A. HERMAN, J. K. REED, R. CICCARELLI, P. DI IORIO F. CACIAGLI. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Prog Neurobiol**,59,(6): 663-690,1999.
- RATHBONE, M. P., T. M. SALEH, B. J. CONNELL, R. CHANG, C. SU, B. WORLEY, M. KIM S. JIANG. Systemic administration of

- guanosine promotes functional and histological improvement following an ischemic stroke in rats. **Brain Res**,1407,(79-89,2011.
- REECE, T. B., J. D. DAVIS, D. O. OKONKWO, T. S. MAXEY, P. I. ELLMAN, X. LI, J. LINDEN, C. G. TRIBBLE, I. L. KRON J. A. KERN. Adenosine A2A analogue reduces long-term neurologic injury after blunt spinal trauma. **J Surg Res**,121,(1): 130-134,2004.
- RIDDER, D. A. M. SCHWANINGER. NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. **Neuroscience**,158,(3): 995-1006,2009.
- SAH, P. P. DAVIES. Calcium-activated potassium currents in mammalian neurons. **Clin Exp Pharmacol Physiol**,27,(9): 657-663,2000.
- SALINAS, M., R. DIAZ, N. G. ABRAHAM, C. M. RUIZ DE GALARRETA A. CUADRADO. Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. **J Biol Chem**,278,(16): 13898-13904,2003.
- SANACORA, G., C. A. ZARATE, J. H. KRYSTAL H. K. MANJI. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov**,7,(5): 426-437,2008.
- SANTARELLI, R., I. DEL CASTILLO, M. RODRIGUEZ-BALLESTEROS, P. SCIMEMI, E. CAMA, E. ARSLAN A. STARR. Abnormal cochlear potentials from deaf patients with mutations in the otoferlin gene. **J Assoc Res Otolaryngol**,10,(4): 545-556,2009.
- SANTOS, T. G., D. O. SOUZA C. I. TASCA. GTP uptake into rat brain synaptic vesicles. **Brain Res**,1070,(1): 71-76,2006.
- SCHMIDT, A. P., D. R. LARA, J. DE FARIA MARASCHIN, A. DA SILVEIRA PERLA D. ONOFRE SOUZA. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Res**,864,(1): 40-43,2000.
- SCHMIDT, A. P., D. R. LARA D. O. SOUZA. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacol Ther**,116,(3): 401-416,2007.
- SCHOUSBOE, A. H. S. WAAGEPETERSEN. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. **Neurotox Res**,8,(3-4): 221-225,2005.
- SCIMEMI, A., H. TIAN J. S. DIAMOND. Neuronal transporters regulate glutamate clearance, NMDA receptor activation, and synaptic plasticity in the hippocampus. **J Neurosci**,29,(46): 14581-14595,2009.

- SETHI, G., B. SUNG B. B. AGGARWAL. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. **Exp Biol Med (Maywood)**,233,(1): 21-31,2008.
- SHELDON, A. L. M. B. ROBINSON. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. **Neurochem Int**,51,(6-7): 333-355,2007.
- SIMS, K. D., D. J. STRAFF M. B. ROBINSON. Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem**,275,(7): 5228-5237,2000.
- SATTLER, R.; XIONG, Z.; LU, W.Y.; HAFNER, M.; MACDONALD, J.F.; TYMIANSKI, M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. **Science**, 11, p.1845-1848, 1999.
- STELMASHOOK, E. V., N. K. ISAEV D. B. ZOROV. Paraquat potentiates glutamate toxicity in immature cultures of cerebellar granule neurons. **Toxicol Lett**,174,(1-3): 82-88,2007.
- SUN, H. S., Z. P. FENG, T. MIKI, S. SEINO R. J. FRENCH. Enhanced neuronal damage after ischemic insults in mice lacking Kir6.2-containing ATP-sensitive K⁺ channels. **J Neurophysiol**,95,(4): 2590-2601,2006.
- SUN, X. L. G. HU. ATP-sensitive potassium channels: a promising target for protecting neurovascular unit function in stroke. **Clin Exp Pharmacol Physiol**,37,(2): 243-252,2010.
- TAMAHARA, S., INABA, M., SATO, K., MATSUKI, N., HIKASA, Y., ONO, K. Nonessential roles of cysteine residues in functional expression and redox regulatory pathways for canine glutamate/aspartate transporter based on mutagenic analysis. **Biochem J**,367:107-111,2002.
- TASCA, C. I., J. S. BURGOS, A. BARAT, D. O. SOUZA G. RAMIREZ. Chick kainate binding protein lacks GTPase activity. **Neuroreport**,10,(9): 1981-1983,1999.
- TASCA, C. I., T. G. SANTOS, R. G. TAVARES, A. M. BATTASTINI, J. B. ROCHA D. O. SOUZA. Guanine derivatives modulate L-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles. **Neurochem Int**,44,(6): 423-431,2004.
- TAVARES, R. G., A. P. SCHMIDT, J. ABUD, C. I. TASCA D. O. SOUZA. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. **Neurochem Res**,30,(4): 439-444,2005.
- TAVARES, R. G., C. I. TASCA, C. E. SANTOS, L. B. ALVES, L. O. PORCIUNCULA, T. EMANUELLI D. O. SOUZA. Quinolinic acid

- stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. **Neurochem Int**,40,(7): 621-627,2002.
- THAUERER, B., S. ZUR NEDDEN G. BAIER-BITTERLICH.Vital role of protein kinase C-related kinase in the formation and stability of neurites during hypoxia. **J Neurochem**,113,(2): 432-446,2010.
- THAUERER, B., S. ZUR NEDDEN G. BAIER-BITTERLICH.Purine nucleosides: endogenous neuroprotectants in hypoxic brain. **J Neurochem**,121,(3): 329-342,2012a.
- TRAVERSA, U., G. BOMBI, P. DI IORIO, R. CICCARELLI, E. S. WERSTIUK M. P. RATHBONE.Specific [(3)H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. **Br J Pharmacol**,135,(4): 969-976,2002.
- TROTTI, D., ROSSI, D., GJESLAD, O., LEVY, L.M., RACAGNI, G., DANBOLT, N.C.,VOLTERRA A. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. **J Biol Chem** 271:5976–5979,1996.
- TYMIANSKI, M.Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. **Nat Neurosci**,14,(11): 1369-1373,2011.
- VINADE, E. R., A. P. SCHMIDT, M. E. FRIZZO, I. IZQUIERDO, E. ELISABETSKY D. O. SOUZA.Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. **Brain Res**,977,(1): 97-102,2003.
- VOLPINI, R., G. MARUCCI, M. BUCCIONI, D. DAL BEN, C. LAMBERTUCCI, C. LAMMI, R. C. MISHRA, A. THOMAS G. CRISTALLI.Evidence for the existence of a specific g protein-coupled receptor activated by guanosine. **ChemMedChem**,6,(6): 1074-1080,2011.
- WANG, Y. Z. H. QIN.Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis**,15,(11): 1382-1402,2010.
- WIRKNER, K., H. ASSMANN, L. KOLES, Z. GEREVICH, H. FRANKE, W. NOREMBERG, R. BOEHM P. ILLES.Inhibition by adenosine A(2A) receptors of NMDA but not AMPA currents in rat neostriatal neurons. **Br J Pharmacol**,130,(2): 259-269,2000.
- YUE, X., H. MEHMET, J. PENRICE, C. COOPER, E. CADY, J. S. WYATT, E. O. REYNOLDS, A. D. EDWARDS M. V. SQUIER.Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia. **Neuropathol Appl Neurobiol**,23,(1): 16-25,1997.
- ZELENAIA, O., B. D. SCHLAG, G. E. GOCHENAUER, R. GANEL, W. SONG, J. S. BEESLEY, J. B. GRINSPAN, J. D. ROTHSTEIN M. B. ROBINSON.Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through

pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. **Mol Pharmacol**,57,(4): 667-678,2000.

ZHANG, W., Y. MIAO, S. ZHOU, J. JIANG, Q. LUO Y. QIU. Neuroprotective effects of ischemic postconditioning on global brain ischemia in rats through upregulation of hippocampal glutamine synthetase. **J Clin Neurosci**,18,(5): 685-689,2011.

ZHANG, W., I. POTROVITA, V. TARABIN, O. HERRMANN, V. BEER, F. WEIH, A. SCHNEIDER M. SCHWANINGER. Neuronal activation of NF-kappaB contributes to cell death in cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**,25,(1): 30-40,2005.

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