



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

**ESTUDO DO MECANISMO NEUROPROTETOR DA  
GUANOSINA EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE  
RATOS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE GLICOSE E  
OXIGÊNIO**

**SCHEYLA PAULA BOLLMANN OLESKOVICZ NOGUEIRA**

**Orientadora: Dra. Carla Inês Tasca**

**Departamento de Bioquímica**

**Florianópolis, fevereiro de 2007.**

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

**ESTUDO DO MECANISMO NEUROPROTETOR DA  
GUANOSINA EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE  
RATOS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE GLICOSE E  
OXIGÊNIO**

**SCHEYLA PAULA BOLLMANN OLESKOVICZ NOGUEIRA**

**Orientadora: Dra. Carla Inês Tasca**

**Departamento de Bioquímica**

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

**Florianópolis, fevereiro de 2007.**

Dedico este trabalho às minhas amigas Karina Brongholi e  
Melissa de Medeiros Braz, pois sem seu apoio e incentivo,  
nada disso teria acontecido

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado. Muito obrigada por tudo o que eu sou e por tudo o que conquistei!

Aos meus pais, Salvador e Maristella, que sempre me apoiaram e me estimularam a buscar meus sonhos. Amo vocês!

À minha irmã, Fernanda, por ser tão especial e por sempre estar ao meu lado nos momentos mais especiais e mais difíceis. Eu te amo muito!

Ao meu *amore* Ricardo, por toda paciência, ajuda e incentivo nesses dois anos de mestrado e de casamento. Agora vamos poder curtir mais tranquilos!!! Te amo!

À minha orientadora, professora Carla Inês Tasca, pela confiança depositada em mim nesses dois anos, além da paciência, ensinamentos e atenção, mesmo estando vivendo um momento tão especial em sua vida. Que vocês sejam muito felizes!

Aos meus amigos de laboratório: Bruno (que com seus goles de soluções nos fez rir muito), Carina (por me ensinar algumas coisinhas básicas como pipetar e pesar), Cristiane (por me ensinar a abrir cérebros de ratos), Denis, Ellen, Helena (que tá lá longe...), Marina (que muito me ajudou, principalmente na reta final), Ronan (por fazer algumas leituras), Samuel (com sua risada engraçada), Simone (pela ajuda nos cálculos e amizade), Tetsadê, Tharine (que me ajudou a dissecar hipocampos) e meu braço direito Wagner (por toda ajuda durante os experimentos). Todos vocês, de uma maneira ou de outra, me ensinaram um pouquinho a cada dia. MUITO OBRIGADA por tudo!

Aos meus colegas do Curso de Pós-graduação em Neurociências, em especial as alunas do professor Rodrigo e da professora Ana Lúcia.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Neurociências, todos professores excelentes, fazendo com que as disciplinas se tornassem sempre interessantes e estimulantes.

Ao secretário da Pós-graduação em Neurociências, Nivaldo, que sempre esteve disposto a nos ajudar e nos atender.

Ao Biotério Central da UFSC e seus funcionários, especialmente à Jô e ao Gilmar, pelo fornecimento de animais.

Ao Gabriel, por toda paciência em esperar o fevereiro chegar para poder usar o computador novamente. Fevereiro chegou!

Aos meus amigos e familiares, por todo o apoio nesses 2 anos e o meu pedido de desculpas pelos momentos em que não pude estar presente.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. ISQUEMIA CEREBRAL E DESEQUILÍBRIO IÔNICO.....	1
1.1.1 Importância da neurotransmissão glutamatérgica na isquemia.....	5
1.2. PURINAS.....	9
1.2.1. Derivados da Guanina.....	13
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIAIS.....	18
3.1.1. Reagentes.....	18
3.1.2. Equipamentos.....	18
3.2. ANIMAIS.....	19
3.3. PREPARAÇÃO E PRÉ-INCUBAÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS.....	19
3.4. MODELO DE ISQUEMIA: FATIAS DE HIPOCAMPO SUBMETIDAS À PGO.....	19
3.4.1. Fatias de hipocampo submetidas à PGO na presença de Guo e GMP.....	20
3.4.2. Avaliação do mecanismo de ação da Guanosina.....	20

3.4.3. Avaliação das vias de sinalização.....	22
3.5. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	22
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
4.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE GLICOSE E OXIGÊNIO SEGUIDA DE REPERFUSÃO.....	24
4.1.1. O papel da Guanosina.....	24
4.1.2. O papel do GMP.....	26
4.2. MECANISMO DE AÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA GUANOSINA.....	28
4.2.1. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e antagonistas de receptores de adenosina e inibidor do transporte de nucleosídeos.....	29
4.2.2. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e antagonistas de receptores de glutamato.....	31
4.2.3. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e inibidores de captação de glutamato.....	33
4.2.4. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e inibidores de transporte reverso de glutamato.....	35
4.2.5. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e o papel do Cálcio.....	37
4.2.5.1. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e o papel do EGTA, um quelante de Cálcio extracelular.....	37
4.2.5.2. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e Flunarizina.....	39
4.2.5.3. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e Nifedipina.....	41
4.2.6. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e bloqueador de canal de	

Potássio.....	43
4.3. AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NA NEUROPROTEÇÃO INDUZIDA PELA GUO EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDAS À PGO.....	45
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morte excitotóxica induzida pelo glutamato.....	2
Figura 2: Captação extracelular de glutamato.....	8
Figura 3: Representação esquemática dos receptores de purinas expressos por astrócitos e neurônios.....	11
Figura 4: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença ou não de Guanosina.....	25
Figura 5: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença ou não de GMP.....	27
Figura 6: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina, antagonistas de receptores de ADO e inibidor de transporte de nucleosídeos.....	30
Figura 7: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina e antagonistas de receptores de glutamato.....	32
Figura 8: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina e inibidores da captação de glutamato.....	34
Figura 9: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina e inibidores de transporte reverso de glutamato.....	36
Figura 10: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina e EGTA.....	38
Figura 11: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina e Flunarizina.....	40
Figura 12: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina e Nifedipina.....	42

Figura 13: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina e 4-AP.....	44
Figura 14: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina e inibidores específicos de vias de sinalização intracelulares.....	46
Figura 15: Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina e inibidores específicos de vias de sinalização intracelulares.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

**4-AP** – 4- aminopiridina

**ADA** – adenosina deaminase

**ADO** - adenosina

**ADP** – adenosina 5`difosfato

**AMPA** – alfa-amino-3-hidroxi-metilisoxazolepropionato

**ATP** – adenosina 5` trifosfato

**Ca<sup>++</sup>** - cálcio

**CA1** – área CA1 do hipocampo

**CA3** – área CA3 do hipocampo

**CaMKII** – proteína quinase ativada por cálcio e calmodulina

**Che** - queleretrine

**DG** – derivados da guanina

**DL-TBOA** - DL-treo-beta-benziloxiaspartato

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**DPCPX** – 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina

**EGTA** - etileno glicol-bis (beta-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacetico ácido

**ERK** – proteína quinase regulada por sinal extracelular

**Flu** - flunarizina

**GAMS** - gamma-D-glutamilamino-metilsulfonato

**GDP** - guanosina 5`-difosfato

**Glu** – glutamato

**GMP** – guanosina 5`-monofosfato

**GTP** – guanosina 5`-trifosfato

**Guo** - guanosina

**K<sup>+</sup>** - potássio

**K<sub>ATP</sub>** – Canais de potássio dependentes de ATP

**KN** – KN62

**L-PDC** - L-trans-2,4-pirrolidina dicarboxilato

**MAPK** – proteína quinase ativada por mitógeno

**MCPG** - alpha-metil-4-carboxi-fenilglicina

**Mg<sup>++</sup>** - magnésio

**MK-801** – (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo(a,b)ciclohepteno-5,10-imina

**MP** – membrana plasmática

**MTT** – (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo = Azul de Tiazolil)

**Na<sup>+</sup>** - sódio

**Nif** - nifedipina

**NMDA** – N-metil-D-aspartato

**PC12** – linhagem celular Feocromocitoma 12

**PD** – PD98059

**PGO** – Privação de Glicose e Oxigênio

**PI3-K** – quinase de fosfatidilinositol

**PKA** – proteína quinase dependente de AMPc

**PKC** – proteína quinase C

**PLC** – fosfolipase C

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**Wo** - wortmanina

## RESUMO

Os derivados da guanina (DG) desempenham um importante papel extracelular na modulação da transmissão glutamatérgica, pois inibem a união do glutamato aos seus receptores, protegendo contra a neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos. Eles são liberados no meio extracelular espontaneamente em meio de cultura de astrócitos sendo o mesmo observado em condições de privação de glicose e oxigênio (PGO). O objetivo de nosso trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos no papel neuroprotetor da Guanosina (Guo) em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO identificando os possíveis sítios de ação extracelular e as vias de sinalização intracelular envolvidas na sua ação. Observamos que a Guo (100  $\mu\text{M}$ ) e o GMP (100  $\mu\text{M}$ ) previnem a diminuição da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão. A ação da Guo se manteve mesmo na presença de antagonistas de receptores de adenosina (ZM241385, DPCPX); de antagonista de transporte de nucleosídeo (dipiridamol); de antagonistas de receptor de glutamato (MK-801, GAMS, MCPG), de inibidores de transporte de glutamato (DL-TBOA, L-PDC), inibindo tanto o transporte reverso como a captação de glutamato; e da flunarizina (bloqueador de canal de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ ). Ao utilizarmos o EGTA, um quelante de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, a Guo perdeu sua ação neuroprotetora; na presença da nifedipina (bloqueador de canal de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Na}^+$ ), a Guo teve uma potencialização de seu efeito neuroprotetor; e o 4-AP, bloqueador de canal de  $\text{K}^+$ , reverteu o efeito protetor da Guo. Ao avaliarmos as vias de sinalização intracelular envolvidas na neuroproteção mediada pela Guo, observamos o envolvimento das vias da PKA, PKC, MEK e PI3-K. Estes resultados demonstram que a Guo atua via canal de  $\text{K}^+$ , de forma dependente dos níveis extracelulares de íons  $\text{Ca}^{++}$ , e com ação dependente da ativação das vias de PKA, PKC, MEK E PI3-K.

## ABSTRACT

Guanine derivatives (GD) have been implicated in many important extracellular mechanisms, such as modulation of glutamate transmission, protecting the neurons against excitotoxic damage induced by glutamate. GD are spontaneously released to the extracellular space from cultured astrocytes and, during oxygen-glucose deprivation (OGD). The aim of this study was evaluating the mechanisms involved on the neuroprotective role of Guanosine (Guo) in rat hippocampal slices submitted to OGD and, identifying a putative extracellular binding site and intracellular signaling pathways related to Guo neuroprotection. Cell death was prevented by addition of Guo (100  $\mu$ M) or GMP (100  $\mu$ M) in hippocampal slices submitted to 15 minutes of OGD followed by 2 hours of reperfusion. The neuroprotective effect of Guo was not altered in the presence of adenosine receptor antagonists (ZM241385, DPCPX); nucleoside transport inhibitor (dipyridamole); glutamate receptor antagonists (MK-801, GAMS, MCPG); glutamate transport inhibitors (DL-TBOA, L-PDC) inhibiting reverse glutamate transport and glutamate uptake; and flunarizine ( $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{++}$  channel blocker). In the presence of EGTA, a  $\text{Ca}^{++}$  ions chelator, Guo was ineffective. Nifedipine (a  $\text{Ca}^{++}$  channel blocker), increased the neuroprotective effect of Guo and, 4-aminopyridine (4-AP), a  $\text{K}^+$  channel blocker, reverted Guo effect. The evaluation of intracellular signaling pathways related to Guo neuroprotection showed the involvement of PKA, PKC, MEK and PI3K pathways. Therefore, this study suggests Guo is acting via  $\text{K}^+$  channels activation, depending on extracellular  $\text{Ca}^{++}$  levels, and via PKA, PKC, MEK and PI3K pathways activation.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ISQUEMIA CEREBRAL E DESEQUILÍBRIO IÔNICO

A isquemia cerebral resulta da interrupção completa do fluxo sanguíneo cerebral, como por exemplo, durante uma parada cardíaca. Quando o fluxo cerebral diminui, duas áreas de dano neuronal são formadas. A área isquêmica central é caracterizada por infarto com um centro necrótico, onde todas as células morrem rapidamente. Na área ou zona de penumbra, adjacente à área isquêmica, as células morrem em dias ou semanas (MATTSON, 2000; CAMACHO & MASSIEU, 2006).

Durante a isquemia, há um prejuízo metabólico decorrente da hiperativação de receptores glutamatérgicos. O excesso de glutamato extracelular leva a um desequilíbrio iônico relacionado à excessiva entrada de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) através dos canais sensíveis à voltagem e dependentes de ligantes. O aumento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular seguido da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) levam à ativação de várias enzimas (como proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintase ou endonucleases) que podem danificar proteínas, DNA e lipídeos, o que contribui para a morte neuronal necrótica e apoptótica (WALLIN et al., 1999; MELDRUM, 2000; WHITE et al., 2000; CAMACHO & MASSIEU, 2006). Além destes fatores, foi observado que durante a fase de reperfusão, após um insulto, ocorre uma aceleração no dano da estrutura celular conseqüente à geração excessiva de ROS seguida por peroxidação lipídica que resulta em morte celular (WHITE et al., 2000) (Figura 1).

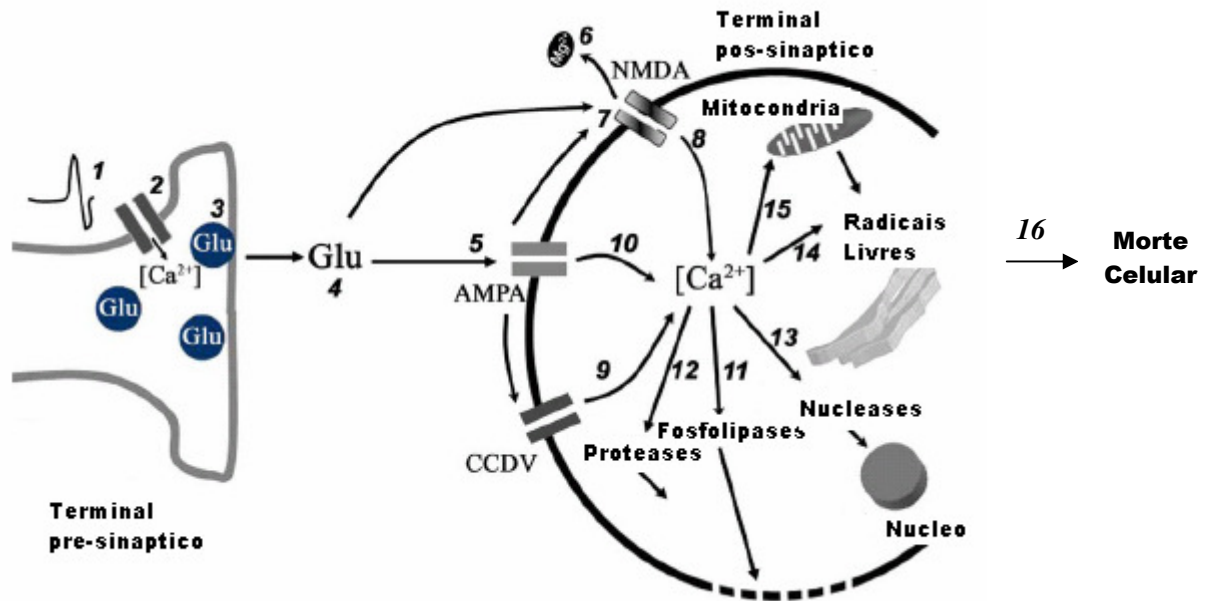


Figura 1: **Morte excitotóxica induzida pelo glutamato.** 1.chegada do potencial de ação; 2. despolariza a membrana plasmática (MP) e ativa canais de Ca<sup>++</sup> dependentes de voltagem; 3. ancoramento das vesículas sinápticas; 4. liberação de glutamato (Glu) e aumento da concentração de Glu na fenda sináptica; 5. ativação de receptores AMPA com influxo de Na<sup>+</sup> e despolarização da MP; 6. o Mg<sup>++</sup> é liberado do receptor NMDA; 7. ativação de receptor NMDA; 8. influxo de Ca<sup>++</sup> e Na<sup>++</sup>; 9. influxo de Ca<sup>++</sup> via canais de Ca<sup>++</sup> voltagem-dependentes; 10. entrada de Ca<sup>++</sup> via receptor AMPA; 11. aumento na concentração de Ca<sup>++</sup> induz a ativação de fosfolipase, 12.proteases, 13. nucleases, 14. produção de ROS que geram estresse oxidativo com prejuízo metabólico mitocondrial com 15. falência energética resultando em 16. morte neuronal (modificada e adaptada a partir de CAMACHO & MASSIEU, 2006).



O gradiente iônico transmembrana é mantido por bombas na membrana dependentes de ATP ( $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ ,  $\text{Ca}^{++} - \text{ATPase}$ ), por sistema de troca iônica (como a troca  $\text{Ca}^{++} - \text{Na}^+$ ), e pelo fluxo passivo de íons através de canais iônicos dependentes de voltagem e de ligantes (como canais de  $\text{Na}^+$ , canais de glutamato) (LOPACHIN et al., 2001). Durante a isquemia, flutuações na oferta de metabólitos modificam a função neuronal pela regulação dos canais iônicos, responsáveis por controlar a homeostase iônica no cérebro de mamíferos (VELASCO et al., 2006) e também leva a disfunção dos transportadores de glutamato dependentes de  $\text{Na}^+$  e do consumo de ATP (CAMACHO & MASSIEU, 2006). Com poucos minutos de privação de glicose e oxigênio (PGO), a diminuição dos níveis de ATP, a liberação de aminoácidos excitatórios e o colapso dos gradientes celulares iônicos resultam na despolarização celular (SIESJO, 1992; MARTIN et al., 1994).

Em condições fisiológicas, o aumento no metabolismo da glicose estimula a produção de ATP e posterior fechamento dos canais de  $\text{K}^+$  dependentes de ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), levando a uma rápida despolarização da membrana. Porém, a depleção energética causada pela hipóxia ou isquemia resulta na hiperpolarização com abertura dos canais  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , o que pode prevenir o influxo de cálcio e a excitotoxicidade (FUJIMURA et al., 1997; VELASCO et al., 2006). Com isso, sugere-se que os canais  $\text{K}_{\text{ATP}}$  possam estar envolvidos em mecanismos citoprotetores em neurônios hipocampais (HEURTEAUX et al., 1995).

Os canais de  $\text{K}^+$  podem ainda ser ativados pelo acúmulo intracelular de íons como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ , sendo estes últimos mais bem caracterizados (BHATTACHARJEE & KACZMAREK, 2005), sendo ambos importantes na repolarização da membrana. Estes canais são conhecidos como canais de  $\text{K}^+$  de baixa condutância sensíveis ao  $\text{Ca}^{++}$  (canais SK) e canais de  $\text{K}^+$  de alta condutância sensíveis ao  $\text{Ca}^{++}$  (canais BK) (YUAN E CHEN, 2006; STOCKER, 2004).

Por este e outros fatores, a manutenção da homeostase intracelular de cálcio é crucial para a sobrevivência neuronal, e sua perda pode estar envolvida em muitas enfermidades do

sistema nervoso central (SNC), incluindo a isquemia. Se ocorrer um aumento da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  no citoplasma, o conseqüente aumento na concentração do  $\text{Ca}^{++}$  na matriz mitocondrial pode induzir a um fenômeno chamado permeabilidade transitória mitocondrial, caracterizada por uma permeabilização da membrana interna mitocondrial, redução da síntese de ATP, edema da organela, rompimento da membrana externa e liberação de diferentes fatores apoptogênicos no citoplasma. Estes fatores incluem citocromo c, fator indutor de apoptose e pro-caspases (MATTSON, 2000; MACIEL et al., 2001). Porém, um moderado aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  diminui a morte neuronal em neurônios hipocâmpais submetidos à PGO (BICKLER & FAHLMAN, 2004). Isto pode ocorrer, pois um moderado aumento na concentração de  $\text{Ca}^{++}$  ativa importantes vias de sobrevivência, incluindo a proteína quinase B (Akt; CHENG et al., 2003), a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos p42/44 (MAPK / ERK de 42 e 44 KDa; FAHLMAN et al., 2002) e o fator de crescimento derivado do cérebro (CHEN et al., 2003).

A via da quinase de fosfatidilinositol (PI3-K) e da proteína quinase B (PKB ou Akt) apresenta importante papel na sinalização de sobrevivência celular. Em cultura de neurônios hipocâmpais submetida à hipóxia, a ativação de PI3-K/Akt preveniu a apoptose através da inibição de genes e proteínas pró-apoptóticas (YAMAGUCHI et al., 2001).

Os membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), em particular a JNK, a  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e a ERK apresentam um importante papel na transdução de sinais relacionados ao estresse em células eucarióticas (KYRIAKIS & AVRUCH, 1996). Estudos sugerem que JNK e  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  estejam ativadas após isquemia e reperfusão, sugerindo que a sinalização através destas quinases seja importante e responsável pela lesão tecidual após isquemia-reperfusão (HU & WIELOCH, 1994; MIZUKAMI et al., 1997; YIN et al., 1997; HERDEGEN et al., 1998; WALTON et al., 1998). A  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  (MAPK de 38 KDa), está envolvida na morte celular apoptótica, sendo que sua inibição pode levar à

neuroproteção contra PGO moderada mas não contra PGO severa, sugerindo que outras vias possam estar envolvidas na morte celular mediada por excitotoxicidade severa (LEGOS et al., 2002). Esta via pode ainda estar ativada em modelos de pré-condicionamento com PGO via óxido nítrico produzido durante o estresse oxidativo, sendo esta uma importante via para o desenvolvimento da tolerância isquêmica (GONZALEZ-ZULUETA et al., 2000).

A via da proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina (CaMKII) está presente nas sinapses glutamatérgicas, podendo atuar tanto pré como pós-sinapticamente, fosforilando muitas proteínas sinápticas, além de estar envolvida na síntese e na liberação do glutamato (FINK & MEYER, 2001). A baixa concentração de glutamato extracelular observada em culturas submetidas à PGO, pode resultar da redução de liberação de glutamato do terminal pré-sináptico mediada pela CaMKII, levando à neuroproteção (TAUSKELA et al., 2003).

Propõe-se que a via da proteína quinase C (PKC) seja uma das vias de sinalização envolvidas na morte celular induzida pela PGO, pois está relacionada com o dano neuronal durante e após o infarto. A utilização de inibidores desta via durante a reperfusão reduziu a morte celular apoptótica e aumentou a sinalização de sobrevivência celular sugerindo que a morte celular induzida pela reperfusão após isquemia seja mediada, pelo menos em parte, pela via da PKC (BRIGHT et al., 2004).

### **1.1.1. IMPORTÂNCIA DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NA ISQUEMIA**

O aminoácido L-glutamato é considerado o principal mediador de sinais excitatórios no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos e está envolvido na maioria dos aspectos funcionais normais do cérebro, incluindo cognição, memória e aprendizado (OZAWA et al., 1998). Sua diversidade funcional é resultado da existência de uma grande variedade de

receptores, os quais podem ser caracterizados em dois grupos, denominados ionotrópicos e metabotrópicos (GASIC & HOLLMAN, 1992).

Os receptores ionotrópicos são canais iônicos dependentes da ativação por ligantes específicos. São responsáveis pela sinalização excitatória mais rápida do SNC, o que faz com que contribuam para a plasticidade neuronal e que estejam implicados em nossa capacidade de aprendizado e memória. Distintas famílias de receptores ionotrópicos têm sido identificadas farmacologicamente por suas afinidades com agonistas sintéticos. São eles: AMPA (alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato), Kainato e NMDA (N-metil-D-aspartato) (MADDEN, 2002). O receptor AMPA é distribuído igualmente pelo SNC sendo ricamente expresso no hipocampo (área CA1 mais que área CA3). Ele é permeável aos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ . Já o receptor kainato é um potente agonista do AMPA, apresentando substancial permeabilidade ao íon  $\text{Ca}^{++}$ . Sua distribuição pelo SNC se concentra na área CA3 do hipocampo e na camada granular do cerebelo. 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  $\text{Mg}^{++}$ . Correntes iônicas através do receptor ocorrem apenas quando a membrana neuronal é despolarizada. Significante quantidade de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular entra para o interior da célula durante a ativação do receptor (OZAWA et al., 1998).

Os receptores metabotrópicos, que ativam cascatas intracelulares de sinalização via receptores acoplados à proteína G, foram identificados e classificados em 3 grupos (I, II e III), baseados na homologia da seqüência de aminoácidos, vias de transdução de sinais e seletividade farmacológica. O grupo I (mGluR1 e mGluR5) está predominantemente localizado pós-sinapticamente 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 cálcio 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  $G_{i/o}$  regulando a atividade da adenilil ciclase. Finalmente, o grupo III de receptores mGlu (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) está predominantemente localizado pré-sinápticamente onde atua como autoreceptor, e também está acoplado às proteínas G modulando a atividade da adenilil ciclase (KENNY & MARKOU, 2004).

A resposta pós-sináptica está relacionada à concentração de glutamato liberado na fenda sináptica em função do tempo e é cuidadosamente regulada pelos transportadores de glutamato. O glutamato liberado extracelularmente é inativado através da recaptação pelas células gliais e pelos neurônios, por um processo mediado pela família de transportadores de alta afinidade dependentes de  $Na^+$  (GLAST/EAAT1, GLT1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 e EAAT5) (STRUZYNSKA et al., 2005). Dois dos cinco subtipos de transportadores identificados, GLT1 e GLAST, estão predominantemente localizados nos astrócitos, sendo responsáveis pelo maior volume de glutamato captado (VOUTSINOS-PORCHE et al., 2003). A atividade destes transportadores é dependente do gradiente eletroquímico gerado pela  $Na^+/K^+$  ATPase. Uma molécula de glutamato é transportada para o citoplasma junto com 2 íons  $Na^+$ , enquanto um  $K^+$  é expulso para o meio extracelular. A recuperação do gradiente eletroquímico de  $Na^+$  após a captação dos aminoácidos ocorre à custa do consumo de ATP pela  $Na^+/K^+$  ATPase. Portanto, a manutenção dos níveis energéticos é essencial para o controle da transmissão glutamatérgica (CAMACHO & MASSIEU, 2006). Além disso, os transportadores podem ser regulados pelo seu estado redox (BRONGHOLI et al., 2006) e pelo nucleosídeo guanosina (FRIZZO et al., 2001). Alguns destes fatores promovem mudanças no estado catalítico do transportador, que pode estar ligado ao gradiente eletroquímico ou a mudanças no número destes transportadores na membrana celular (BOECK et al., 2005) (Figura 2).

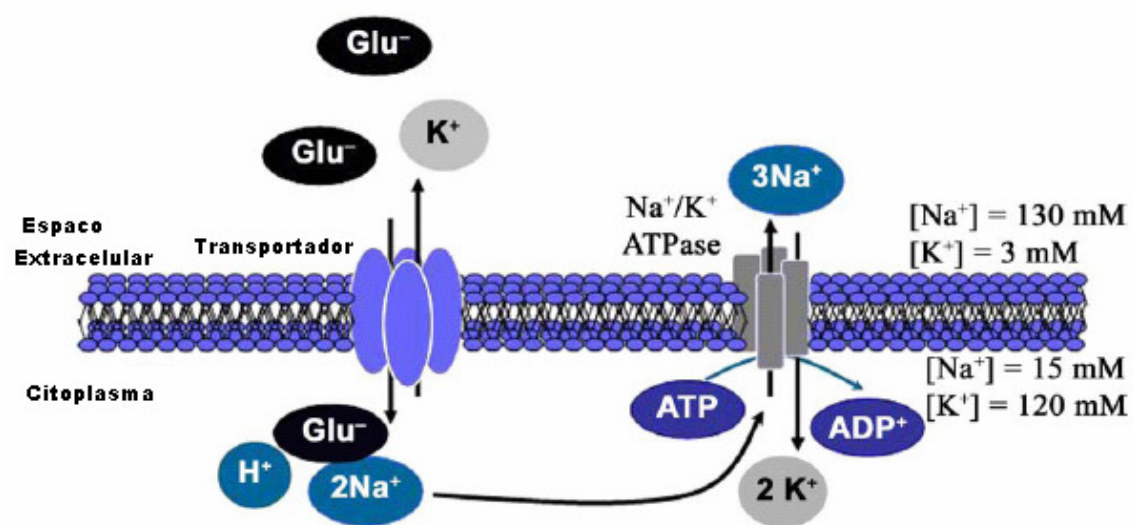


Figura 2: **Captação extracelular de glutamato.** O aumento da concentração extracelular de glutamato é altamente regulado por proteínas transportadoras localizados na membrana plasmática de neurônios e glia (adaptado de CAMACHO & MASSIEU, 2006).

A captação de glutamato é essencial para a finalização da transmissão sináptica durante condições fisiológicas (DANBOLT, 2001; BONDE et al., 2003), pois o acúmulo de glutamato no espaço extracelular pode ser excitotóxico para os neurônios. Assim, o ótimo funcionamento dos transportadores é essencial para manter os níveis extracelulares de glutamato suficientemente baixos a fim de restringir a superestimulação dos receptores glutamatérgicos e prevenir o dano neuronal. A disfunção dos transportadores pode ser o evento que inicia ou participa da cascata que leva à disfunção e à morte celular (STRUZYNSKA et al., 2005).

## **1.2. PURINAS**

As bases purinas, como adenina e guanina, e seus nucleosídeos correspondentes, como adenosina (ADO) e guanosina (Guo) e seus produtos metabólicos apresentam importante papel como neurotransmissores e neuromoduladores no SNC, sistema nervoso periférico e sistema nervoso entérico (RATHBONE et al., 1999). Os astrócitos são a principal fonte de purinas da adenina e da guanina e expressam receptores específicos para estas substâncias (CICCARELLI et al, 1999a; 2001).

Os receptores mais bem caracterizados são os das purinas da adenina (RATHBONE et al., 1999), sendo o receptor do tipo P1 para os receptores de ADO e os receptores P2 para adenosina 5' trifosfato (ATP) e adenosina 5' difosfato (ADP). A família de receptores P1 compreende os receptores de adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> sendo todos acoplados à proteína G. Os receptores P2 são de 2 tipos: P2X é da família de receptor ligado ao canal iônico e o P2Y é o receptor ligado à proteína G. A ativação de receptor A<sub>1</sub> inibe a adenilato ciclase, o que leva a diminuição dos níveis do segundo mensageiro AMPc. Isto resulta na inibição da liberação de neurotransmissores. Já a ativação de receptor A<sub>2A</sub> ativa a adenilato ciclase,

facilitando a liberação de neurotransmissores. Os efeitos biológicos dos receptores  $A_{2B}$  e  $A_3$  não são completamente conhecidos. A ativação de receptor de ATP pode estimular ou inibir a liberação de glutamato de neurônios hipocâmpais de ratos (FIELDS & BURNSTOCK, 2006).

Enquanto os receptores das purinas da adenina são bem caracterizados, não há evidência de sítios específicos de ligação para os derivados da guanina (DG), como Guanosina (Guo) e guanosina 5' trifosfato (GTP) em astrócitos (CHEN et al, 1993) ou outras células (VUORINEN et al, 1991, 1992). Nem GTP nem Guo se ligam aos receptores das purinas da adenina com alta afinidade (MULLER & SCIOR, 1993), sugerindo que os DG apresentam sítios específicos. Foi demonstrado que o GTP une-se a sítios específicos em células de feocromocitoma (PC12) (GYSBERS et al., 2000) e em membranas cerebelares de pintos, sítios estes que não apresentam atividade enzimática (GTPásica) (TASCA et al., 1999a), o que sugere a presença de verdadeiros sítios receptores. Além disso, foram identificados e caracterizados farmacologicamente sítios específicos de união para a Guo em preparações de membrana de cérebro de ratos (TRAVERSA et al., 2002), em cultura de astrócitos (CHEN et al., 1993) e em células PC12 (BAÚ et al., 2005), sendo este sítio acoplado à proteína G (TRAVERSA et al., 2003) (figura 3).



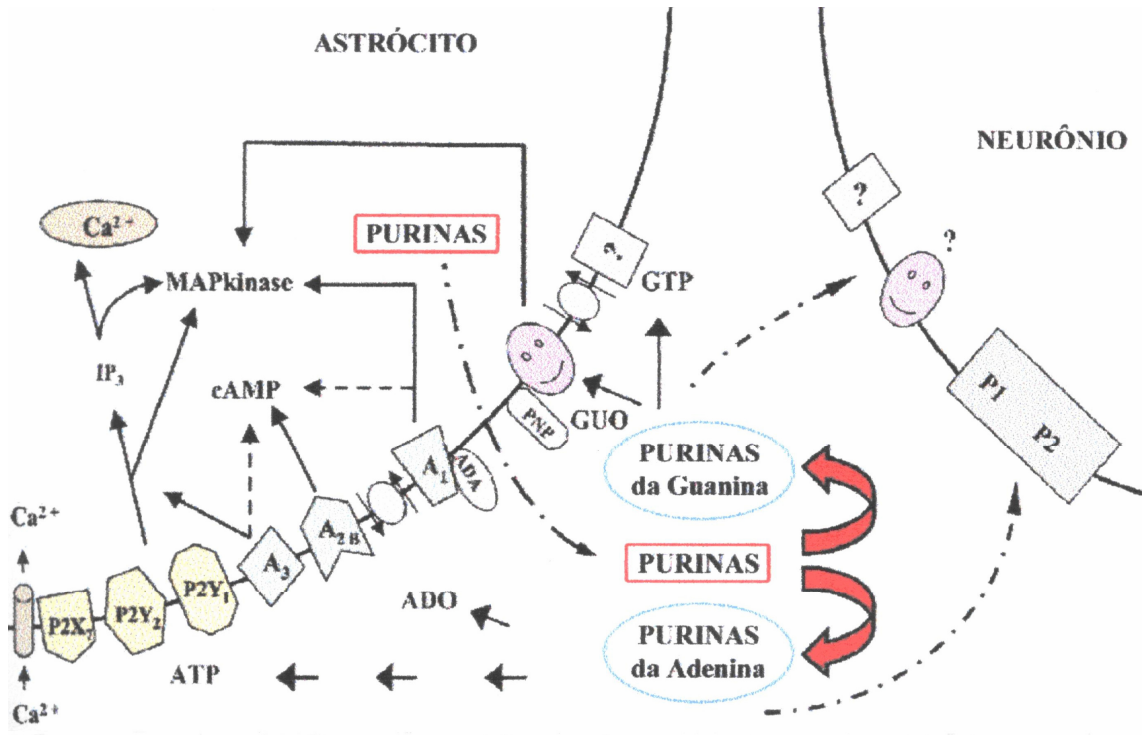


Figura 3: Representação esquemática dos receptores de purinas expressos por astrócitos e neurônios (adaptado de CICCARELLI et al., 2001). Adenosina deaminase (ADA), inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), purina nucleosídeo fosforilase (PNP).

Em condições fisiológicas ocorre liberação espontânea de DG em meio de cultura de astrócitos de ratos em concentrações três vezes maior que das purinas da adenina, que se mantém constante. A concentração de DG, principalmente a Guo, aumenta quando a célula é exposta a um breve período de hipóxia/hipoglicemia. Após este insulto, a concentração de Guo se mantém elevada por 30 minutos. Uma pequena parte é captada por um sistema seletivo para Guo e a maior parte tende a se acumular no meio extracelular (CICCARELLI et al., 1999a).

A concentração extracelular dos nucleosídeos presentes na fenda é modulada, de maneira bidirecional, por transportadores de nucleosídeos. Estes transportadores compreendem uma família de proteínas com afinidade para substratos distintos, distribuição variável pelo tecido cerebral, diferente especificidade entre as espécies e sensibilidade ao bloqueio por agentes farmacológicos. ADO apresenta um sistema específico de transporte que regula a quantidade de ADO para interagir com seus receptores na membrana celular. Nos astrócitos, os transportadores de nucleosídeos apresentam maior capacidade de transportar ADO em relação aos neurônios, exercendo papel mais importante na regulação dos efeitos da ADO no SNC (BENDER et al., 1994; GU et al., 1996).

Além de serem captadas por transportadores, purinas da adenina e guanina são metabolizadas por ecto-enzimas específicas que regulam os efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeos após estes serem liberados por vesículas sinápticas, transportadores, canais iônicos (BODIN & BURNSTOCK, 2001) e astrócitos (CICCARELLI et al., 1999a).

As purinas da adenina, assim como os DG, apresentam importantes efeitos tróficos como mudanças plásticas envolvendo aprendizado e memória, brotamento colateral de terminações nervosas, neuroproteção contra estímulos nocivos e regulação de células através de apoptose (RATHBONE et al., 1999). Os DG regulam também o crescimento neurítico (GYSBERS & RATHBONE, 1996a); a proliferação de células gliais (CICCARELLI et al., 1994), a adesão

de neurônios granulares do cerebelo em cultura (DECKER, 2006), regulam a síntese e liberação de neurotrofinas e pleiotrofinas (MIDDLEMISS et al., 1995b; CICCARELLI et al., 1997), entre outros.

### **1.2.1. Derivados da Guanina**

Os derivados da guanina (DG) – GTP (guanosina 5' trifosfato), GDP (guanosina 5' difosfato) e GMP (guanosina 5' monofosfato) e o nucleosídeo Guanosina (Guo). São reconhecidos como importantes moléculas de sinalização extracelular (NEARY et al., 1996). Os DG são liberados no meio extracelular espontaneamente em meio de cultura de astrócitos juntamente com as purinas da adenina, e em uma concentração muito maior que a de purinas da adenina, sendo o mesmo observado em condições de privação de glicose e oxigênio (PGO). Isto permite que os DG, mais especificamente a Guo, ativem a produção de fatores tróficos nos astrócitos, importante no restabelecimento da transmissão sináptica (CICCARELLI et al., 1999b; 2001).

Intracelularmente, os DG modulam a atividade das proteínas-G, são fonte de energia para a síntese protéica, ativam proteínas na exocitose e constituem os ácidos nucléicos (BOURNE et al., 1990).

Além disso, os DG desempenham um importante papel extracelular, na modulação da transmissão glutamatérgica, pois inibem a união do glutamato aos seus receptores, sem envolvimento de proteínas-G (TASCA et al., 1995; 1998; 1999a), e protegendo contra a neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos (OLIVEIRA et al., 2002; MOLZ et al., 2005).

A Guo aumenta a captação de glutamato por astrócitos em cultura de células, sugerindo estar envolvida com a neuroproteção contra a excitotoxicidade glutamatérgica (FRIZZO et

al., 2001). Em vesículas sinápticas de cérebro de ratos adultos, há uma diminuição da captação de glutamato na presença dos DG, o que pode alterar a força sináptica pela diminuição da quantidade de glutamato liberado na fenda (TASCA et al., 2004). Com isso, a vulnerabilidade celular em processos neurodegenerativos assim como a plasticidade neuronal pode ser influenciada pelos DG. Foi observado que após um insulto de hipóxia-isquemia, a captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos neonatos foi significativamente reduzida e que esta redução foi prevenida pelo tratamento *in vivo* com a Guo (MORETTO et al., 2005).

O GTP, GDP e GMP antagonizam a toxicidade induzida por NMDA e Kainato em cultura de neurônios neocorticais e hipocámpais de ratos, sendo a eficiência dos DG maior que a dos nucleotídeos da adenina (MORCIANO et al., 2004). A inibição da toxicidade pelos DG deve ser mediada pela inibição de receptores glutamatérgicos endógenos ou ainda pela união a sítios específicos para os DG.

Estudos *in vivo* investigaram o efeito protetor da Guo contra a hiperatividade glutamatérgica mostrando que ela previne contra convulsões induzidas por ácido quinolínico, substância que provoca superestimulação do sistema glutamatérgico (LARA et al., 2001; SCHMIDT et al., 2000).

Estudo realizado por DECKER (2006) mostrou que o número de neurônios granulares de cerebelo cultivados em meio condicionado de astrócitos tratados com GMP e Guo, ou cultivados na presença de GMP ou Guo, aumentou de forma significativa quando comparado à situação controle. GTP e Guo também atuam como fatores tróficos para neurônios e como fator de proliferação para astrócitos (KIM et al., 1991; RATHBONE et al., 1992 a,b; GYSBERS & RATHBONE, 1992; 1996a; CICCARELLI et al., 2001).

Além disso, a Guo estimulou a expressão funcional de canais iônicos de  $K^+$  em cultura de astrócitos, sugerindo que seu efeito neuroprotetor possa estar relacionado com a habilidade de regular a homeostase do  $K^+$  via astrócitos (BENFENATI et al., 2006).

A concentração extracelular de Guo é resultado da sua liberação pelos transportadores de membrana bidirecionais equilibrativos, ou da hidrólise do GTP por ectonucleotidases na fenda sináptica após a liberação vesicular do GTP (ZIMMERMANN, 1996). O GTP, que é captado e estocado nas vesículas sinápticas (SANTOS et al., 2006), após ser liberado é hidrolisado à GDP, GMP e posteriormente à Guo.

Em função do exposto, nosso trabalho justificou-se pela necessidade de verificar o efeito neuroprotetor de Guo e GMP em um modelo de isquemia *in vitro*, e identificar um possível sítio de ação para os DG, especificamente a Guo, que é o produto final da degradação dos DG. Também buscamos avaliar as vias de sinalização intracelulares envolvidas na neuroproteção induzida pela Guo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Estudar os mecanismos envolvidos no papel neuroprotetor da Guanosina (Guo) em fatias de hipocampo de ratos submetidas a um modelo de isquemia *in vitro*, a privação de glicose e oxigênio (PGO), identificando os possíveis sítios de ação extracelular e as vias de sinalização intracelular envolvidas na ação da Guo.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar a neuroproteção dos DG, Guo e GMP, em um modelo de isquemia *in vitro*, através da PGO em fatias de hipocampo de ratos;
2. Avaliar a participação dos receptores purinérgicos (adenosinérgicos) na ação neuroprotetora da Guo em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO;
3. Avaliar a participação dos receptores glutamatérgicos na ação neuroprotetora da Guo em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO;
4. Avaliar o envolvimento dos transportadores de nucleosídeos na ação neuroprotetora da Guo em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO;
5. Avaliar o envolvimento da modulação do transporte de glutamato (captação e transporte reverso) na ação neuroprotetora da Guo em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO;
6. Avaliar a participação de canais iônicos (de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{K}^+$ ) na ação neuroprotetora da Guo em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO;

7. Avaliar as vias de sinalização intracelular envolvidas na neuroproteção induzida pela Guo em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

##### 3.1.1. Reagentes:

2-deoxiglicose, 4-AP (4-aminopiridina) (gentilmente cedida pelo professor Dr. Rodrigo Bainy Leal), A23187, Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólico (MTT), Dimetilsulfóxido (DMSO), Dipiridamol, DL-TBOA (DL-treo-beta-benziloxiaspartato), DPCPX (8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina), EGTA (etileno glicol-bis (beta-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacetico ácido), Flunarizina (gentilmente cedida pelo professor Dr. Nelson Horácio Gabilan), GAMS (gamma-D-glutamilamino-metilsulfonato), GMP, Guanosina, H-89 (gentilmente cedida pelo professor Dr. Nelson Horácio Gabilan), KN-62, L-PDC (L-trans-2,4-pirrolidina dicarboxilato), MCPG (alpha-metil-4-carboxi-fenilglicina), MK-801 ((+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imine maleato), Nifedipina, PD98059, Queleretrine, Wortmanina, ZM 241385.

##### 3.1.2. Equipamentos:

Banho Maria Biomatic

Estufa de cultura modelo 002 CB FANEM LTDA

Leitora de Elisa – Labsystems Multiskan MS

Fatiador de tecidos McIlwain – Brinkmann Laboratory<sup>®</sup>



### **3.2. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (60 a 90 dias), provenientes do Biotério Central da UFSC e mantidos no biotério setorial de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica, em ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura entre 22 e 25°C, com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos adotados com os animais seguiram os “Princípios Éticos do COBEA”, conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC.

### **3.3. Preparação e pré-incubação das fatias hipocampais**

Os animais foram mortos por decapitação e os hipocampus foram rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB). Este tampão é composto por: NaCl 122 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, D-glicose 10 mM, sendo gaseificado com carbogênio (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>) por 15 minutos para atingir o pH 7,4 e mantido gelado. As fatias com 0,4 mm de espessura foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain, sendo separadas e colocadas em tubo contendo KRB. Estas foram gaseificadas com carbogênio por aproximadamente 15 segundos para pré-incubação por 30 min a 37 °C. Após a pré-incubação, iniciava-se a incubação, havendo troca de meio do KBR da pré-incubação pelo tratamento escolhido para cada grupo de fatias em triplicata.

### **3.4. Modelo de isquemia: Fatias de hipocampo submetidas à PGO**

Para obter-se o modelo de isquemia, as fatias de hipocampo foram submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO) através da incubação com um tampão de PGO, composto por

NaCl 122 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM e, a glicose utilizada no tampão KRB foi substituída por 10 mM de 2-deoxi-glicose (um análogo não utilizável da glicose) (POCOCK & NICHOLS, 1998).

#### **3.4.1. Fatias de hipocampo submetidas à PGO na presença de Guo e GMP**

As fatias controles foram incubadas na presença do tampão KRB ou tampão KRB associado à Guo ou GMP, gaseificadas com carbogênio por aproximadamente 15 segundos, e mantidas por 1 hora nessas condições. No caso de grupo controle com reperfusão, após 1 hora de incubação com KRB, havia novamente troca do meio por KRB ou KRB associado à Guo ou GMP, a fatia era gaseificada com carbogênio, sendo mantida em reperfusão por 2 horas.

As fatias submetidas à PGO foram incubadas no tampão da PGO ou no tampão de PGO com Guo ou GMP, gaseificadas com nitrogênio por aproximadamente 15 segundos, sendo mantidas nestas condições por 15 ou 60 minutos.

Nos grupos submetidos à PGO e reperfusão, a isquemia inicial era realizada apenas com tampão da PGO, que era substituído por tampão KRB ou tampão KRB na presença ou de Guo ou de GMP, gaseificado por aproximadamente 15 segundos com carbogênio e as fatias foram mantidas por 2 horas nestas condições.

A incubação terminava colocando-se as fatias em banho de gelo (4 °C).

#### **3.4.2. Avaliação do mecanismo de ação da Guanosina**

Para avaliarmos o mecanismo de ação da Guanosina foram utilizados antagonistas de receptores de adenosina e glutamato, inibidores de transportadores de glutamato e

nucleosídeos e bloqueadores de canais iônicos.

Para avaliarmos a relação da Guo com a transmissão das purinas da adenina, utilizamos antagonistas de receptores de adenosina: ZM 241385 (50 nM), antagonista de receptor  $A_{2A}$  e DPCPX (10  $\mu$ M), antagonista de receptor  $A_1$  de adenosina, e o dipiridamol (10  $\mu$ M), um bloqueador de transporte de nucleosídeos.

Para avaliarmos a relação da Guo com a neurotransmissão glutamatérgica, foram utilizados o MK-801 (50  $\mu$ M), antagonista do receptor glutamatérgico NMDA, o GAMS (50  $\mu$ M), antagonista de receptor Kainato e o MCPG (500 $\mu$ M), antagonista de receptor metabotrópico de glutamato.

Também utilizamos inibidores do transporte de glutamato para avaliar se há envolvimento da Guo com estes transportadores. Para isto utilizamos o DL-TBOA (100  $\mu$ M para avaliar inibição de captação de glutamato e 10  $\mu$ M para avaliar inibição de transporte reverso de glutamato) e L-PDC (10  $\mu$ M, inibindo o transporte reverso de glutamato).

O EGTA (1 mM), a flunarizina (50  $\mu$ M) e a nifedipina (10  $\mu$ M) foram utilizados para avaliar o envolvimento da ação neuroprotetora da Guo com canais de  $Ca^{++}$ . O 4-AP (50  $\mu$ M), um bloqueador de canal de  $K^+$ , foi utilizado para avaliar a relação entre o bloqueio deste canal com a ação neuroprotetora da Guo.

Estes fármacos foram utilizados nos grupos controle, 15 minutos de PGO e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão, sendo preparados em tampão fisiológico (KBR) ou em tampão isquêmico (PGO).

Os antagonistas e inibidores foram incubados da mesma forma descrita para Guo e GMP, nos grupos controle, 15 minutos de PGO e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão.

Para avaliarmos um possível bloqueio da ação neuroprotetora da Guo, as drogas foram

adicionadas à reperfusão 10 minutos antes da adição de Guo.

### **3.4.3. Avaliação das vias de sinalização**

As fatias hipocampais submetidas à PGO foram incubadas na presença de inibidores específicos de proteínas quinases: PD98059 – 25  $\mu$ M (inibidor específico da MEK), H89 – 5  $\mu$ M (inibidor específico da PKA), wortmanina – 1  $\mu$ M (inibidor específico da quinase de fosfatidilinositol, PI3-K), KN-62 – 10  $\mu$ M (inibidor específico de quinase dependente de cálcio-calmodulina – CaMKII), queleritrina – 1  $\mu$ M (inibidor específico de PKC).

Os inibidores foram incubados da mesma forma descrita para Guo e GMP, em grupos controle, 15 minutos de PGO e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão.

Os inibidores foram adicionados ao meio de incubação no início da reperfusão, sendo que a Guo apenas após os 10 minutos iniciais para que o inibidor pudesse atuar, inibindo a via de sinalização celular correspondente.

### **3.5. Ensaio de viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo = Thiazolyl blue). O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (JACOBSSON & FOWLER, 1999). Após o período de PGO e reperfusão, as fatias hipocampais foram incubadas com MTT (0,5mg/ml) à 37 °C por 20 minutos e o formazam reduzido foi solubilizado pela adição de DMSO. A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitora de Elisa (550 nm).

**3.6. Análise estatística:** Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do Teste de Duncan, quando necessário. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

O objetivo inicial deste trabalho foi avaliar o papel neuroprotetor do nucleosídeo e nucleotídeo da guanina, Guanosina (Guo) e GMP, respectivamente, frente a um modelo de isquemia cerebral que é obtido pela Privação de Glicose e Oxigênio (PGO) em fatias de hipocampo de ratos.

### **4.1. Avaliação da viabilidade celular de fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio seguida de reperfusão**

#### 4.1.1. O papel da Guanosina

As fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de PGO apresentaram queda significativa da viabilidade celular em relação ao grupo controle. A adição de Guo (concentração de 100  $\mu$ M) aos 15 minutos de PGO, ou a reperfusão por um período de 2 horas após os 15 minutos de PGO, reverteu parcialmente a perda de viabilidade celular induzida pelos 15 minutos de PGO. Entretanto observou-se melhora estatisticamente significativa da viabilidade celular pela presença da Guo (100  $\mu$ M) adicionada ao período de 2 horas de reperfusão, após os 15 minutos de PGO (Figura 4).

Os grupos submetidos a 60 minutos de PGO apresentaram queda significativa de viabilidade celular que não foi revertida pela presença ou não de Guo e/ou reperfusão (Figura 4).

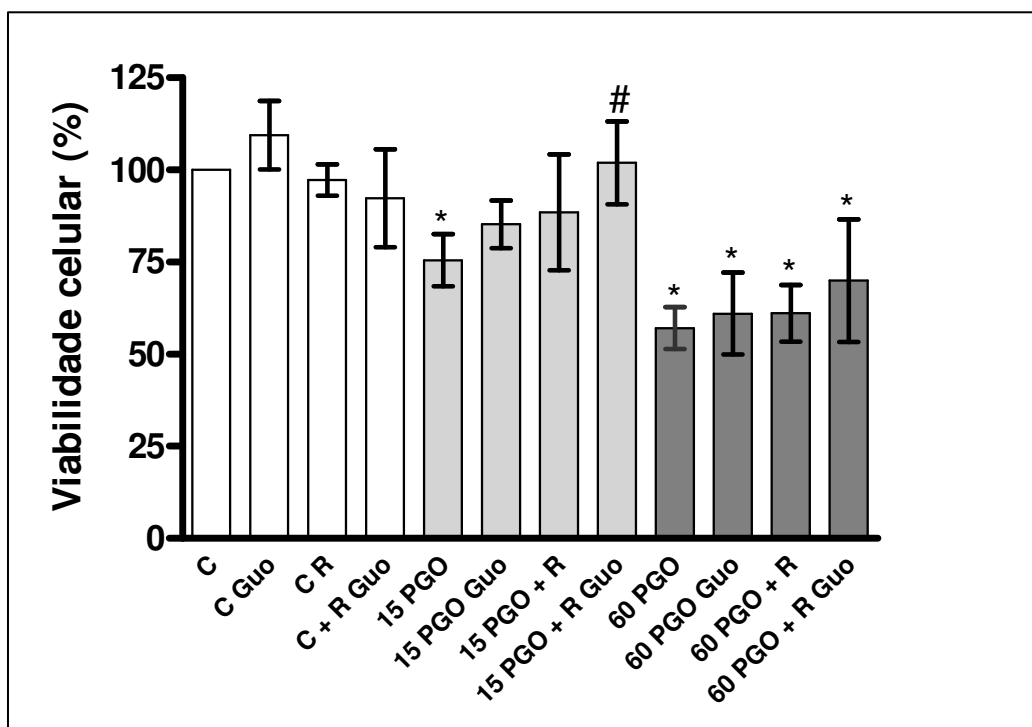


Figura 4. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença ou não de Guanosina ( $100\mu\text{M}$ ). Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e por 60 minutos (60 PGO) de PGO, seguido ou não por 2 horas de reperusão (+ R). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica média diferente de 15 PGO;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).

#### 4.1.2. O papel do GMP

Foi observado que o GMP (100uM), quando adicionado ao período de reperfusão após 15 minutos de PGO, reverteu significativamente à diminuição da viabilidade celular causada pela PGO de 15 minutos. Os demais grupos submetidos à PGO apresentaram diminuição da viabilidade celular que não foi revertida pela presença ou não de GMP e/ou reperfusão (Figura 5).



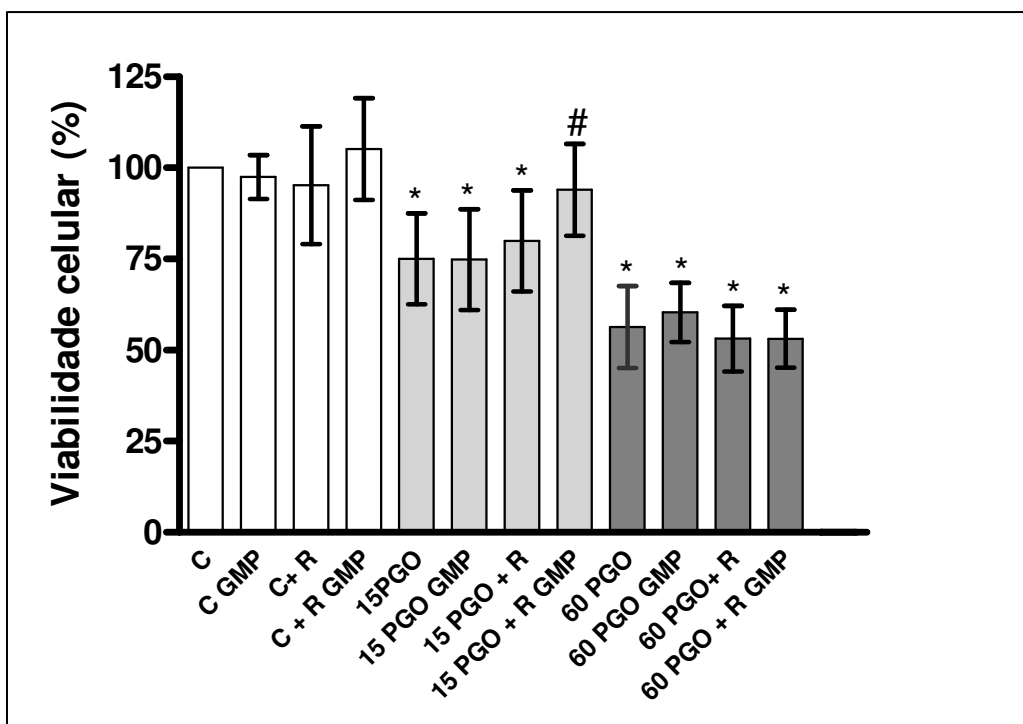


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença ou não de GMP (100 $\mu$ M). Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e por 60 minutos (60 PGO) de PGO, seguido ou não por 2 horas de reperusão (+ R). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica média diferente de 15 PGO;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).

Após este experimento, foi iniciado o estudo sobre o mecanismo de ação da Guo. Sabe-se que a Guo apresenta importante papel na prevenção de crises convulsivas (LARA et al., 2001; SCHMIDT et al., 2000), melhora a captação de glutamato diminuindo a toxicidade glutamatérgica (FRIZZO et al., 2001), estimula a proliferação glial e diferenciação neuronal (CICCARELLI et al., 2001; RATHBONE et al., 1992b; GYSBERS & RATHBONE, 1996a), e é neuroprotetora, como observado nos resultados mostrados anteriormente (Figura 4). Além disto, a concentração extracelular de Guo é resultado da hidrólise do GTP por ectonucleotidases na fenda sináptica após liberação do GTP, onde este último pode ser captado e estocado em vesículas (SANTOS et al., 2006). Entretanto, o mecanismo de ação da Guo, assim como dos demais DG não está elucidado. Portanto, foi investigado o mecanismo de ação da Guo como agente neuroprotetor em modelo de isquemia através da PGO. Para isto foi escolhido o tempo de 15 minutos de PGO para os experimentos seguintes, em decorrência de que no tempo de 60 minutos de PGO não foi observada nenhuma melhora da viabilidade celular.

#### **4.2. Mecanismo de Ação do Efeito Neuroprotetor da Guanosina**

Para avaliar o mecanismo de ação do efeito neuroprotetor da Guo, foi adicionado antagonistas de receptores ou inibidores de transportadores e canais iônicos durante a PGO de 15 minutos e durante a PGO seguida de reperfusão de 2 horas. Na PGO, os antagonistas e inibidores foram adicionados juntamente com o tampão isquêmico. Nos grupos submetidos à reperfusão, nos primeiros 10 minutos da reperfusão os antagonistas e inibidores foram adicionados ao meio junto ao tampão fisiológico e somente após estes 10 minutos a Guo foi adicionada ao meio. Assim pode-se observar se o papel neuroprotetor da Guo era bloqueado

ou não pela inibição destes receptores, transportadores e canais iônicos, sendo possível assim identificar seu mecanismo de ação.

#### 4.2.1. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e antagonistas de receptores de adenosina e inibidor do transporte de nucleosídeos

Evidências mostram que as purinas da guanina se unem aos receptores das purinas da adenina com baixa afinidade (MULLER & SCIOR, 1993). Com isso, ao iniciar a avaliação do mecanismo de ação da Guo, foi escolhido os receptores de adenosina (ADO). Utilizou-se o ZM241385 (50 nM), um antagonista específico de receptor  $A_{2A}$  de adenosina, e o DPCPX (10  $\mu$ M), um antagonista específico de receptor  $A_1$  de adenosina. Foi constatado que os grupos submetidos a 15 minutos de PGO apresentaram diminuição significativa da viabilidade celular, que não foi alterada pela presença das drogas referidas. Os grupos que foram submetidos à reperfusão com Guo não tiveram seu efeito bloqueado pela presença dos antagonistas, não evidenciando a ação da Guo via os receptores de adenosina  $A_{2A}$  e  $A_1$  (Figura 6).

Para caracterizar se o efeito neuroprotetor da Guo ocorria no meio extracelular ou intracelular, foi utilizado o Dipiridamol (10  $\mu$ M), um inibidor de transporte de nucleosídeos. Estes transportadores de nucleosídeos funcionam de forma bidirecional, modulando a concentração de nucleosídeos presentes na fenda sináptica (BENDER et al., 1994; GU et al., 1996). Foi constatado que a Guo mantém seu efeito neuroprotetor mesmo na presença do inibidor de transporte de nucleosídeos (dipiridamol), não sendo evidenciada uma ação intracelular da Guo (Figura 6).

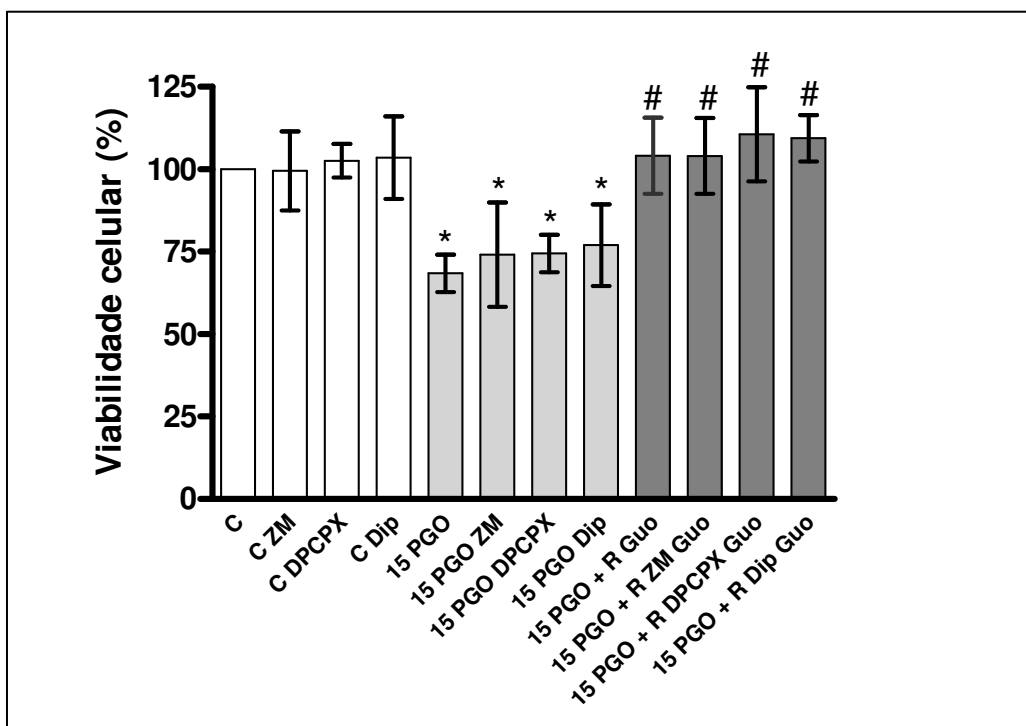


Figura 6. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina (100 $\mu$ M), antagonistas de receptores de ADO e inibidor de transporte de nucleosídeos. Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e 15 minutos seguido de reperfusão com Guo (15 PGO + RGuo). Foram utilizados ZM (antagonista específico de receptor A<sub>2A</sub> de adenosina, 50 nM), DPCPX (antagonista específico de receptor A<sub>1</sub> de adenosina, 10 nM) e Dipiridamol (inibidor de transporte de nucleosídeos, 10 nM) nos três grandes grupos (Controle, 15 PGO, 15 PGO + RGuo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica médias diferentes de 15 PGO; p<0,05 (ANOVA seguido do teste de Duncan).

#### 4.2.2. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e antagonistas de receptores de Glutamato

Para avaliar se o papel neuroprotetor da Guo estava envolvido com receptores de glutamato, foi utilizado um antagonista do receptor ionotrópico NMDA, o MK-801 (50  $\mu$ M), um antagonista do receptor ionotrópico kainato, GAMS (50  $\mu$ M), e um antagonista não-seletivo de receptores metabotrópicos, MCPG (500  $\mu$ M).

Todos os grupos submetidos a 15 minutos de PGO apresentaram queda significativa da viabilidade celular. Os grupos que foram submetidos à reperfusão na presença de Guo, apresentaram reversão da perda da viabilidade celular e a adição dos antagonistas não alterou a ação neuroprotetora da Guo, mostrando que seu efeito não ocorre via ativação de receptores de glutamato (Figura 7).

Os receptores de glutamato, quando bloqueados individualmente por seus antagonistas específicos, não alteraram a função neuroprotetora da Guo. Para avaliar se o bloqueio simultâneo destes receptores alterava a ação neuroprotetora da Guo, foi utilizado um coquetel com os 3 bloqueadores simultaneamente (MK-801, GAMS, MCPG), nas mesmas concentrações que quando utilizados isoladamente. Porém não foi observada nenhuma alteração na ação da Guo (Figura 7).

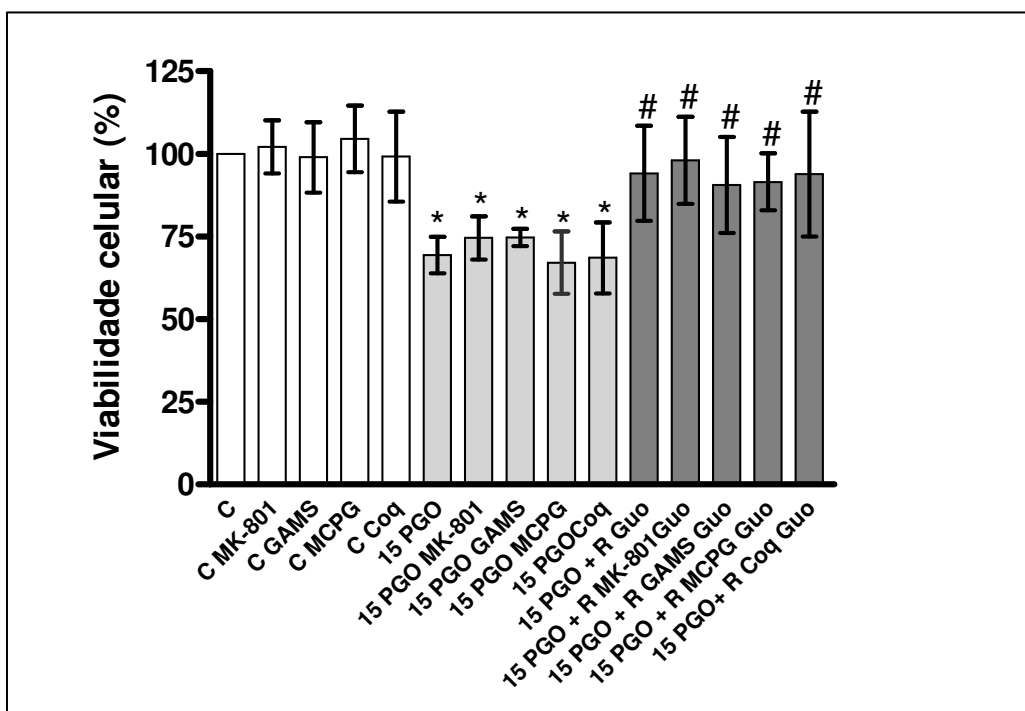


Figura 7. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina (100  $\mu$ M) e antagonistas de receptores de glutamato. Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e 15 minutos seguido de perfusão com Guo (15 PGO + RGuo). Foram utilizados antagonista de receptor NMDA (MK-801, 50  $\mu$ M), antagonista de receptor kainato (GAMS, 50  $\mu$ M), antagonista de receptor metabotrópico (MCPG, 500  $\mu$ M) e um coquetel (Coq, com as mesmas concentrações que as utilizadas individualmente) de antagonistas de receptores de glutamato nos três grandes grupos (C, 15 PGO, 15 PGO + RGuo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica médias diferentes de 15 PGO;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).

#### 4.2.3. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e inibidores de captação de glutamato

FRIZZO et al. (2002) observaram que a Guo, nas concentrações de 1 e 100  $\mu\text{M}$ , aumentam significativamente a captação de glutamato em fatias de córtex submetidas à PGO, sendo que este efeito pode estar envolvido com a neuroproteção contra a excitotoxicidade glutamatérgica.

Segundo BONDE et al. (2003), altas concentrações do DL-TBOA (acima de 50  $\mu\text{M}$ ) induzem a uma marcante neurotoxicidade, por diminuir consideravelmente a captação de glutamato, resultando na ativação de receptores NMDA.

Para avaliar se a ação da Guo se dava via transportadores de glutamato foi utilizado o DL-threo-beta-benziloxiaspartato (DL-TBOA, 100  $\mu\text{M}$ ), um inibidor de transporte de glutamato. A adição do DL-TBOA não aumentou o dano causado pela PGO, e não alterou ação da Guo (Figura 8).

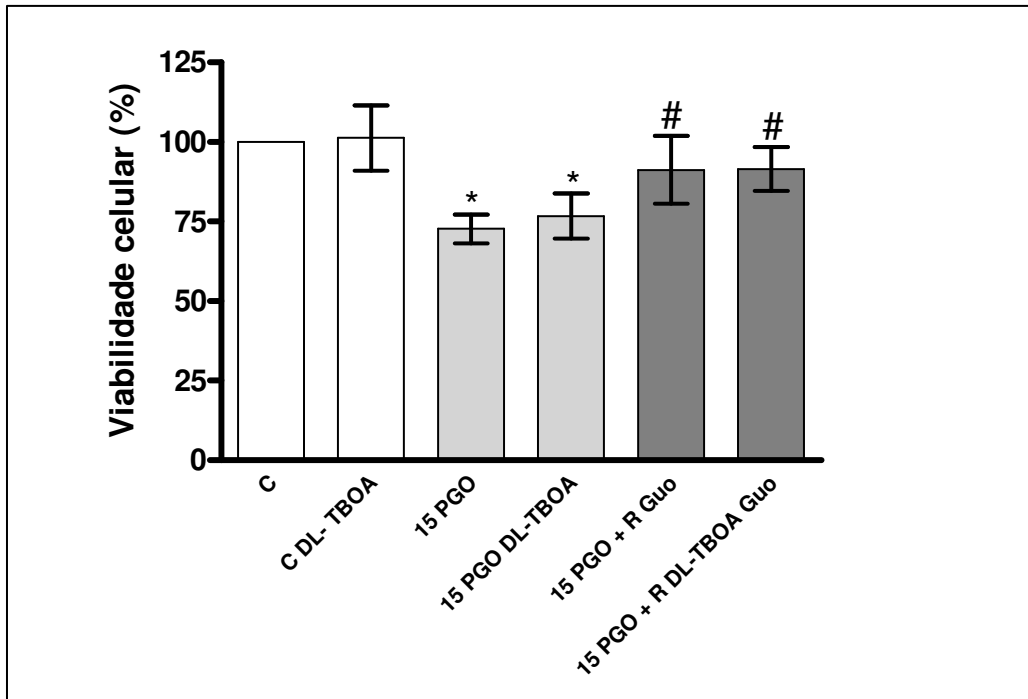


Figura 8. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a PGO na presença de Guanosina (100  $\mu$ M) e inibidores da captação de glutamato. Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e 15 minutos seguido de reperusão com Guo (15 PGO + RGuo). Foi utilizado inibidor de captação de glutamato (DL-TBOA, 100  $\mu$ M) nos três grandes grupos (C, 15 PGO, 15 PGO + RGuo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica médias diferentes de 15 PGO;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).



#### 4.2.4. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e inibidores de transporte reverso de glutamato

Após ser avaliado o papel dos transportadores de Glutamato inibindo a captação de glutamato e observando-se que a Guo não atua via este mecanismo, foi avaliado se o bloqueio do transporte reverso de glutamato interfere na ação da Guo. Segundo BONDE et al. (2003) quando em concentrações subtóxicas (10  $\mu$ M), o DL-TBOA e o L-PDC (L-trans-2,4-pirrolidina dicarboxilato) reduzem significativamente o transporte reverso de glutamato, protegendo neurônios piramidais da área CA1 do hipocampo submetidos à PGO.

A utilização de bloqueadores de transporte de glutamato (DL-TBOA e L-PDC) em uma concentração de 10  $\mu$ M, onde apenas o transporte reverso de glutamato é inibido, não alterou a ação neuroprotetora da Guo, nem o dano causado pela PGO (Figura 9).

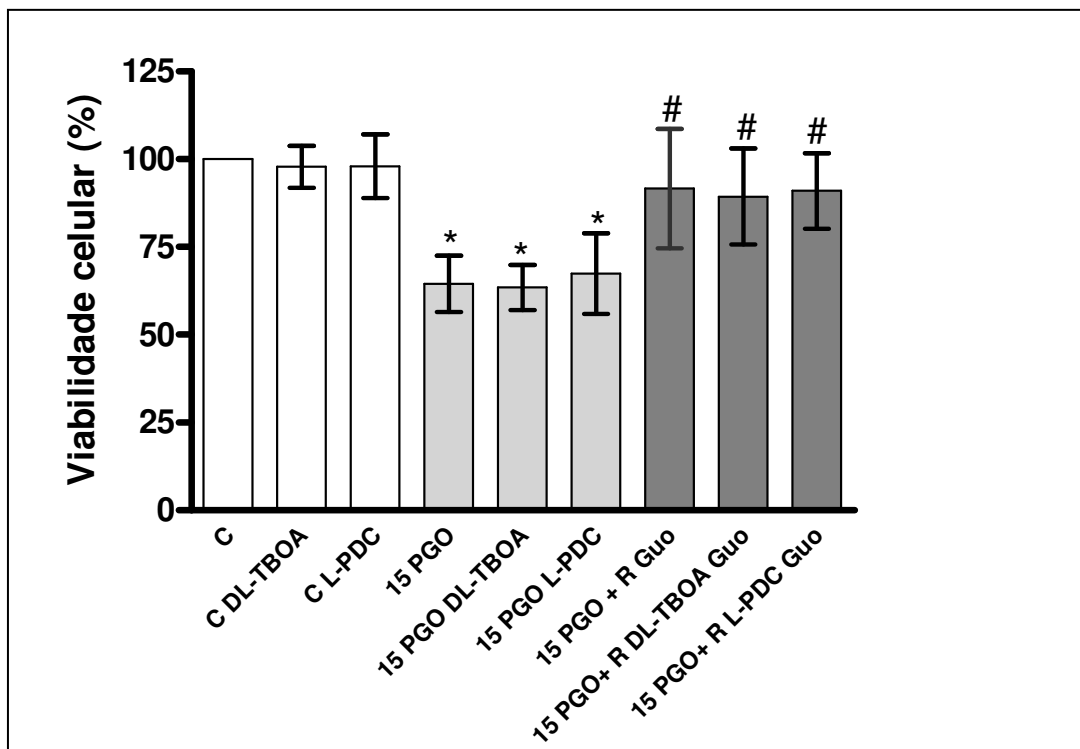


Figura 9. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina (100  $\mu$ M) e inibidores de transporte reverso de glutamato. Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e 15 minutos seguido de reperfusão com Guo (15 PGO + RGuo). Foram utilizados inibidores de transporte reverso de glutamato (DL-TBOA e L-PDC, 10  $\mu$ M) nos três grandes grupos (C, 15PGO, 15 PGO + RGuo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica médias diferentes de 15 PGO;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).

#### 4.2.5. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e o papel do Cálcio

Após ser demonstrado que o papel neuroprotetor da Guo não ocorre via receptores e transportadores de ADO e de glutamato, e depois de constatado que a ação neuroprotetora da Guo é extracelular, pois a utilização do dipiridamol não alterou seu efeito, foi estudado o papel do cálcio na função neuroprotetora da guanosina.

##### 4.2.5.1 Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e o papel do EGTA, um quelante de Cálcio extracelular

As fatias de hipocampo submetidas à PGO e reperfusão em um tampão sem cálcio e na presença de um quelante de cálcio extracelular, EGTA (1 mM), apresentaram uma diminuição significativa da viabilidade celular no grupo submetido à reperfusão na presença de Guo, em relação ao mesmo grupo na presença de íons cálcio. Guo teve seu efeito neuroprotetor abolido na presença do EGTA, ou seja, em um meio extracelular com redução nos níveis de cálcio. Nos 15 minutos de PGO não houve alteração da viabilidade celular na presença de EGTA (Figura 10).

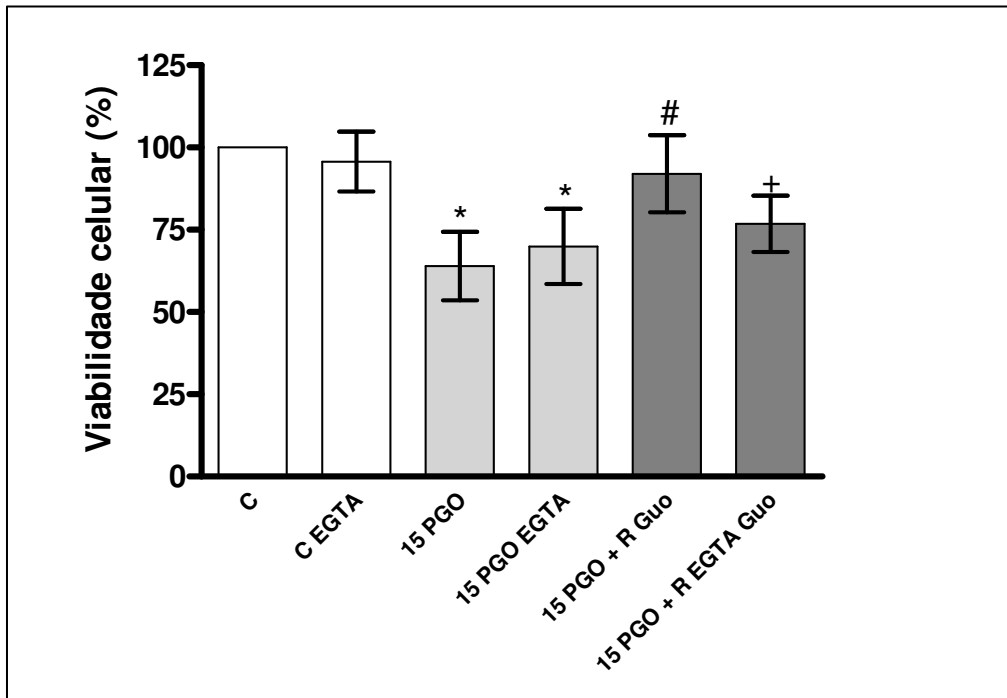


Figura 10. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a PGO na presença de Guanosina (100  $\mu$ M) e EGTA. Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e 15 minutos seguido de reperfusão com Guo (15 PGO + RGuo). Foi utilizado EGTA (quelante de Cálcio, 1 mM) nos três grandes grupos (C, 15 PGO, 15 PGO + RGuo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica média diferente de 15 PGO, + indica média diferente de 15 PGO + RGuo;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).

#### 4.2.5.2. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e Flunarizina

Para dar continuidade à investigação sobre o papel do cálcio na neuroproteção induzida pela Guo observada em fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de PGO e reperfusão de 2 horas, foi utilizada a flunarizina, um bloqueador de canais tipo T de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ , numa concentração de 50  $\mu\text{M}$  em 0,5 % de DMSO. O DMSO 0,5 % não alterou a viabilidade dos grupos controle, na PGO e na reperfusão.

Não foi observada nenhuma alteração na viabilidade celular com a adição da flunarizina no período de reperfusão juntamente com a Guo, constatando que a Guo não atua via estes canais iônicos (Figura 11).

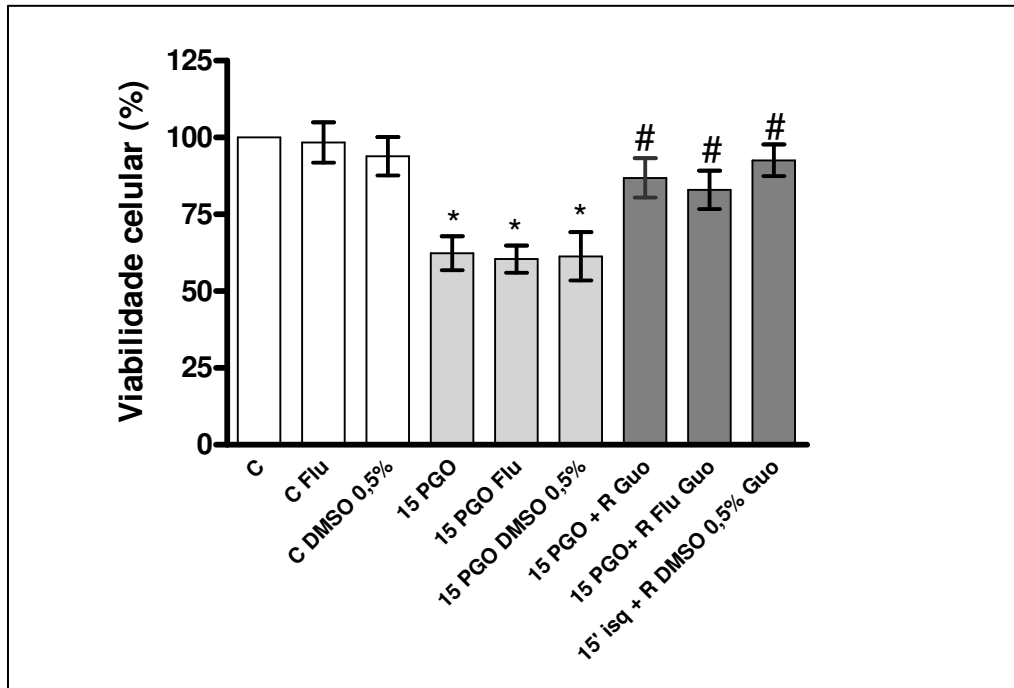


Figura 11. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a PGO na presença de Guanosina (100  $\mu$ M) e Flunarizina. Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e 15 minutos seguido de reperfusão com Guo (15 PGO + RGuo). Foi utilizado Flunarizina (flu, 50  $\mu$ M) e um controle com 0,5% de DMSO nos três grandes grupos (C, 15 PGO, 15 PGO + RGuo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica médias diferentes de 15 PGO;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).

#### 4.2.5.3. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e Nifedipina

Em decorrência da inespecificidade da flunarizina para canais de cálcio, foi utilizado outro bloqueador de canal iônico, a nifedipina, um bloqueador de canal de  $\text{Ca}^{++}$  dependente de voltagem do tipo L.

A adição da nifedipina (10  $\mu\text{M}$  em 0,3 % de DMSO) à reperfusão na presença de Guo, aumentou a viabilidade celular quando comparado à reperfusão com Guo. No entanto, ambos são estatisticamente iguais ao controle, mostrando um efeito parcial do bloqueio de canais de cálcio do tipo L na potencialização do efeito da Guo. Desta forma, observa-se que a Guo não atua diretamente via canais de cálcio do tipo L. Nos grupos submetidos a 15 minutos de PGO, a nifedipina não alterou a redução da viabilidade celular (Figura 12).

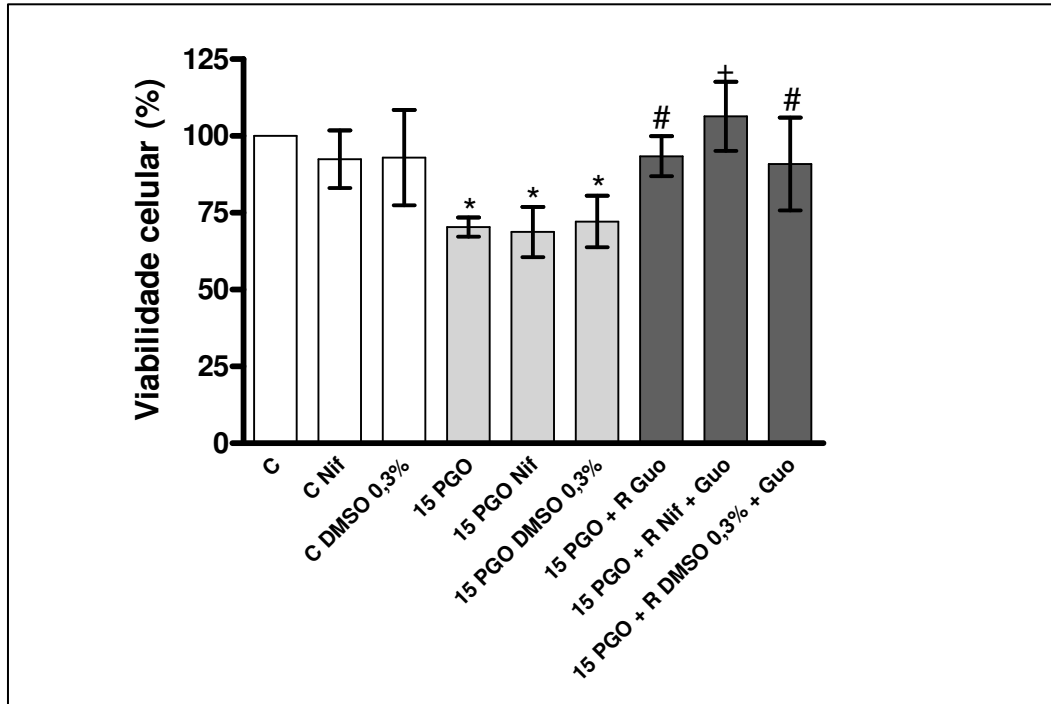


Figura 12. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina (100  $\mu$ M) e Nifedipina. Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e 15 minutos seguido de reperfusão com Guo (15 PGO + RGuo). Foi utilizado Nifedipina (Nif, 10  $\mu$ M) e um controle com 0,3% de DMSO nos três grandes grupos (C, 15 PGO, 15 PGO + RGuo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica médias diferentes de 15 PGO; † indica média diferente de 15 PGO + RGuo;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).



#### 4.2.6. Avaliação da viabilidade celular na presença de Guo e bloqueador de canal de potássio

Considerando que os canais de  $\text{Ca}^{++}$  avaliados não demonstraram o possível sítio de ação extracelular da Guo, foi avaliado o papel dos canais de  $\text{K}^+$ . Para isto foi utilizado o 4-aminopiridina (4-AP, 50  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador de canal de  $\text{K}^+$ .

O 4-AP não alterou a viabilidade nos grupos controle e 15 minutos PGO, porém diminuiu a viabilidade celular quando adicionado à reperfusão com Guo, sugerindo que ao bloquear o canal de  $\text{K}^+$ , a Guo não consegue exercer seu papel neuroprotetor, demonstrando a participação de canais de  $\text{K}^+$  na ação neuroprotetora da Guo (Figura 13).

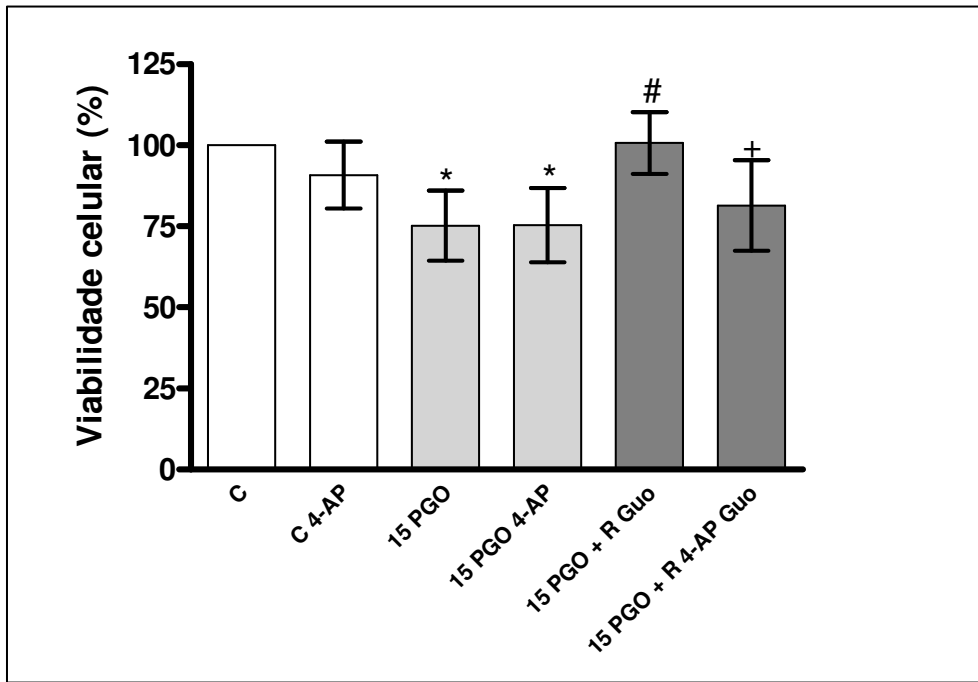


Figura 13. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina (100  $\mu$ M) e 4-AP. Fatias incubadas na situação controle (c), por 15 minutos (15 PGO) e 15 minutos seguido de reperfusão com Guo (15 PGO + RGuo). Foi utilizado o 4 aminopiridina (4-AP, 50  $\mu$ M) nos três grandes grupos (C, 15 PGO, 15 PGO + RGuo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica média diferente de 15 PGO; + indica média diferente de 15 PGO + RGuo;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).

### **4.3 Avaliação das vias de sinalização celular envolvidas na neuroproteção induzida pela Guo em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO**

Para determinar as vias de sinalização envolvidas na neuroproteção mediada pela Guo em fatias de hipocampo submetidas à PGO, foram utilizados inibidores específicos das vias da CaMKII, PKC, PKA, MEK e PI3-K.

Como demonstram as Figuras 14 e 15, a adição da queleritrina (Che, 1  $\mu$ M), inibidor específico da PKC; do H89 (5  $\mu$ M), inibidor específico da PKA; do PD98059 (25  $\mu$ M), inibidor específico da MEK; e da wortmanina (1  $\mu$ M), inibidor específico da PI3-K, diminuiu significativamente o efeito neuroprotetor da Guo durante a reperfusão. A reperfusão com Guo na presença de inibidor específico da via da proteína PI3-K apresentou diminuição significativa da viabilidade celular quando comparado ao grupo submetido à reperfusão na presença de PD98059. Não houve alteração da viabilidade celular na presença do KN-62 (10  $\mu$ M), inibidor específico da proteína CaMKII. Os grupos controle e 15 minutos de PGO não apresentaram alteração de viabilidade celular na presença ou ausência dos inibidores utilizados.

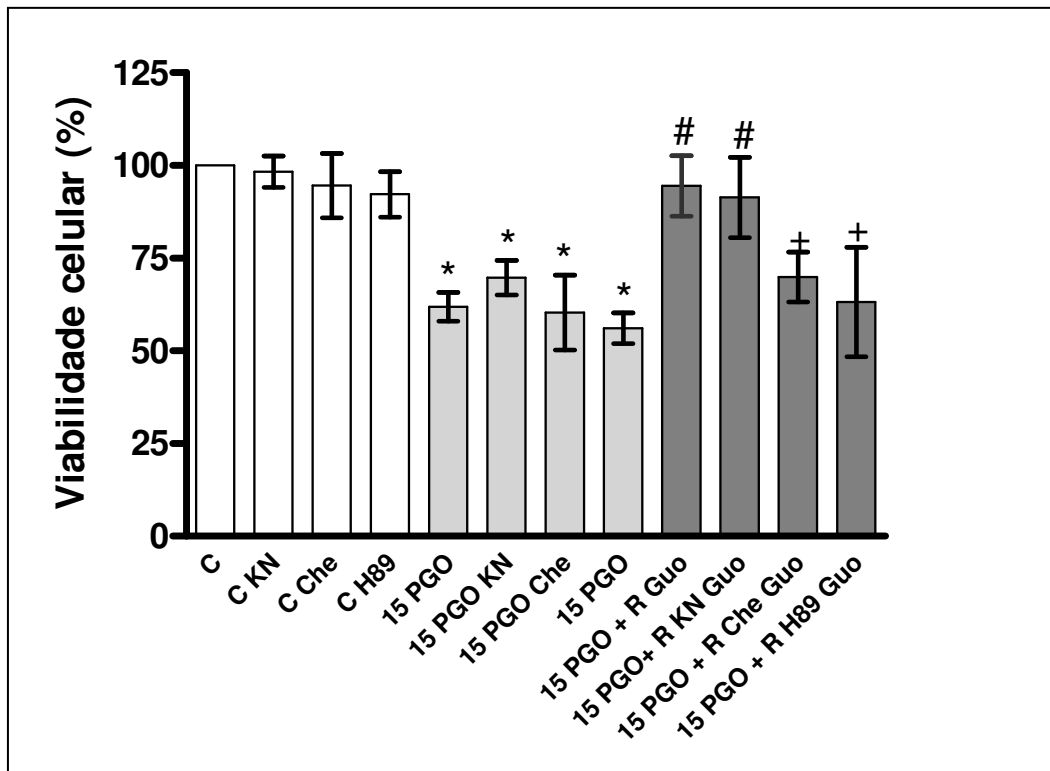


Figura 14. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina (100  $\mu$ M) e inibidores específicos de vias de sinalização intracelulares. Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e 15 minutos seguido de reperusão com Guo (15 PGO + RGuo). Foi utilizado o KN-62 (KN, 10  $\mu$ M), a queleretrina (Che, 1  $\mu$ M) e o H89 (5  $\mu$ M) nos três grandes grupos (C, 15 PGO, 15 PGO + RGuo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3-5 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica médias diferentes de 15 PGO; + indica médias diferentes de 15 PGO + RGuo;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).

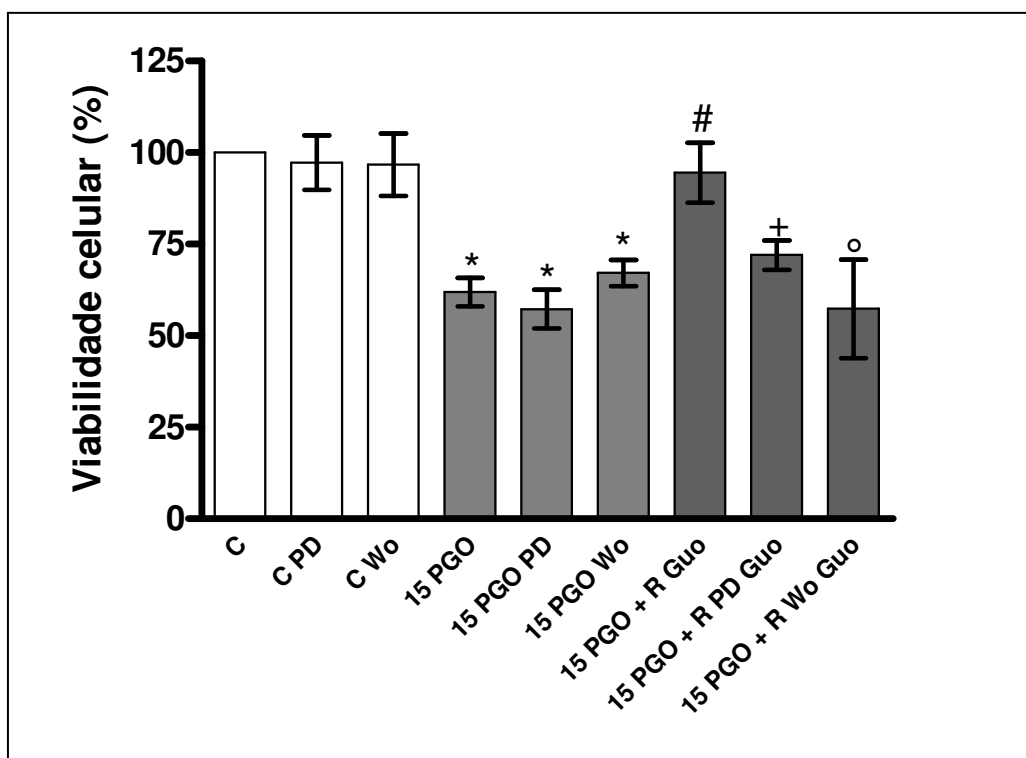


Figura 15. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO na presença de Guanosina (100  $\mu$ M) e inibidores específicos de vias de sinalização intracelulares. Fatias incubadas na situação controle (C), por 15 minutos (15 PGO) e 15 minutos seguido de reperfusão com Guo (15 PGO + RGuo). Foi utilizado o PD98059 (PD, 25  $\mu$ M) e a wortmanina (Wo, 1  $\mu$ M) nos três grandes grupos (C, 15 PGO, 15 PGO + RGuo). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3-4 experimentos realizados em triplicatas. \* indica médias diferentes do controle; # indica média diferente de 15 PGO; † indica média diferente do grupo 15 PGO + R Guo e 15 PGO + R Wo Guo; ° indica média diferente do grupo 15 PGO + R Guo e 15 PGO + R PD Guo;  $p < 0,05$  (ANOVA seguido do teste de Duncan).

## 5. DISCUSSÃO

Os derivados da guanina (DG) e o nucleosídeo guanosina (Guo) são caracterizados em vários estudos como moduladores da transmissão glutamatérgica (SOUZA & RAMIREZ, 1991; TASCA et al., 1995; 1998; 1999b) apresentando importante papel neuroprotetor em isquemias (OLIVEIRA et al., 2002), convulsões (SCHMIDT et al., 2000; LARA et al., 2001; TAVARES et al., 2005) e toxicidade induzida por glutamato (MOLZ et al., 2005). Além disso, apresentam importante papel neurotrófico e estimulam a produção de fatores neuroprotetores em culturas de células neuronais e gliais (RATHBONE et al., 1999; CICARELLI et al., 2001).

A Guo apresenta vários efeitos em células astrogliais que podem estar contribuindo para sua ação neuroprotetora, incluindo a síntese e secreção de neurotrofinas e fatores pleiotróficos (MIDDLEMISS et al, 1995b; RATHBONE et al, 1998; CICARELLI et al, 1999b) e estimulação de captação de glutamato em cultura de astrócitos (FRIZZO et al, 2001). A importância da Guo como molécula protetora é suportada por experimentos *in vivo* onde a administração crônica de Guo previne o aparecimento de crises convulsivas e morte celular em modelos de excitotoxicidade glutamatérgica (LARA et al, 2001; VINADÉ et al, 2003). A Guo afeta ainda parâmetros comportamentais dos ratos, como memória, ansiedade e locomoção (LARA et al., 2001; VINADÉ et al., 2003; 2005).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel neuroprotetor da Guo em fatias de hipocampo de ratos em um modelo de isquemia *in vitro* através da Privação de Glicose e Oxigênio (PGO).

A isquemia cerebral resulta na severa degeneração das células e conseqüente perda das funções cerebrais. Diferentes modelos de isquemia *in vitro* são estudados, entre eles a PGO utilizando fatias de hipocampo. O hipocampo é utilizado por ser a área mais susceptível do

SNC à isquemia, onde neurônios da área CA1 são os mais vulneráveis. As fatias de hipocampo são facilmente estudadas por manterem os circuitos neuronais locais e também pela fácil aplicação de drogas às mesmas (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991; TORP et al., 1992).

No modelo de isquemia através da PGO, observamos uma redução significativa na viabilidade celular após 60 minutos de PGO que não foi revertida pela presença ou não de reperfusão e DG (Figura 4 e 5). Este resultado é semelhante ao encontrado por STRASSER & FISCHER (1995) e BRONGHOLI et al. (2006), onde foi observado dano neuronal de 50 a 60% em fatias de hipocampo submetidas a 60 minutos de PGO.

Já foi demonstrado que a reperfusão após insultos isquêmicos pode ser mais danosa às células neurais (SHARKEY et al., 1997). Nesse período ocorre uma grande oferta de oxigênio às células, causando um desequilíbrio energético intracelular e este pode não ser totalmente reduzido ocorrendo produção de espécies reativas de oxigênio. No entanto, em nosso estudo não observamos efeito adicional da reperfusão ao período de PGO, sugerindo a participação de estresse oxidativo já no período inicial de privação de glicose e oxigênio, como anteriormente demonstrado (BRONGHOLI et al., 2006).

Com 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na presença de GMP ou de Guo, ambos com a concentração de 100  $\mu$ M (Figuras 4 e 5), houve aumento da viabilidade celular quando comparada a 15 minutos de PGO. Tanto a Guo como o GMP já haviam sido demonstrados preservando a viabilidade celular de células gliais e fatias hipocâmpais em experimentos em que as condições causariam morte celular (LITSKY et al, 1999; OLIVEIRA et al., 2002; DI IORIO et al, 2004; MOLZ et al., 2005; YOO et al, 2005).

Observou-se em cultura de astrócitos sob condições basais, que tanto purinas da adenina quanto DG são liberados concomitantemente. Entretanto, a concentração de DG encontra-se mais elevada que a de purinas da adenina. A concentração de DG se mantém constante

durante 3 horas sendo que a concentração de Guo é 3 vezes maior que a de ADO (purina da adenina correspondente). Em condições de hipóxia e hipoglicemia, a quantidade de DG e seus metabólitos aumentam cerca de 2,5 a 3,5 vezes em relação aos valores basais, mantendo estes níveis elevados por até 30 minutos após à hipóxia e hipoglicemia. A concentração final de DG durante e após hipóxia-hipoglicemia permanece constante e substancialmente mais alta que os valores basais, embora a concentração extracelular de Guo aumente progressivamente, podendo ser resultado do metabolismo extracelular do GTP (CICCARELLI et al., 1999a).

Após observarmos que a Guo também apresenta ação neuroprotetora em modelo de isquemia *in vitro* durante a PGO, buscamos identificar seu mecanismo de ação, pois os DG, diferentemente das purinas da adenina, não apresentam seus sítios de ação identificados e caracterizados (RATHBONE et al., 1999).

As purinas da adenina apresentam seus receptores identificados, sendo receptores P1 para ADO e receptores P2 para ATP e ADP (BURNSTOCK, 1978). Os receptores P1 são subdivididos em A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, e os receptores P2 em P2X e P2Y (FIELDS & BURNSTOCK, 2006). Utilizamos o ZM 241385 (antagonista de receptor de A<sub>2A</sub> de adenosina) e o DPCPX (antagonista de receptor A<sub>1</sub> de adenosina) que não influenciaram na ação da Guo (Figura 6). Este resultado vai de acordo com o encontrado por MULLER & SCIOR (1993) que relatam que nem GTP nem Guo se ligam a receptores de purinas da adenina com alta afinidade e com os trabalhos de TRAVERSA et al. (2002; 2003) que demonstrou sítios específicos para a ação da Guo.

Estudos realizados por FRIZZO et al. (2001) e DECKER (2006) já haviam demonstrado que mesmo com a utilização de inibidores de transporte de nucleosídeos, como o dipiridamol, a Guo continuava a exercer seu papel neuroprotetor e trófico, o que caracteriza a ação extracelular da Guo. Em nosso trabalho, o mesmo foi observado (Figura 6), não



havendo diminuição da ação da Guo na presença de dipiridamol, o que vem de acordo com os dados previamente relatados.

A excitotoxicidade induzida pela PGO pode ter sido mediada ou pelo mau funcionamento dos transportadores de glutamato ou pela ativação de receptores glutamatérgicos.

A ausência de oxigênio e glicose leva a depleção de ATP e dissipação do gradiente de  $\text{Na}^{++}$  através da membrana celular, onde a saída de glutamato pode ocorrer por transporte reverso dependente de sódio (ROSSI et al., 2000). Além do transporte reverso, os transportadores podem ser inativados durante a isquemia, fazendo com que a retirada de glutamato do meio extracelular seja ineficaz causando toxicidade. Estes transportadores podem ter sua captação de glutamato regulada pela Guo (FRIZZO et al., 2001).

Sabendo disso, avaliamos o papel dos transportadores de glutamato na neuroproteção mediada por Guo. Para isso utilizamos o DL-TBOA e o L-PDC a 10  $\mu\text{M}$  (inibindo o transporte reverso) e o DL-TBOA a 100  $\mu\text{M}$  (inibindo a captação de glutamato) (BONDE et al., 2003). Entretanto não observamos nenhuma alteração na ação da Guo (Figuras 8 e 9).

A via clássica de excitotoxicidade, mediada pela ativação de receptores ionotrópicos de glutamato, dispara o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  por estes receptores, que levam a mudança letal na homeostase de cálcio, aumentando as espécies reativas de oxigênio e eventualmente levando à morte celular. Esta via pode ser inibida pela presença de antagonistas específicos de receptores glutamatérgicos (TAN et al., 1998). Os receptores ionotrópicos de glutamato AMPA e NMDA apresentam importante papel na isquemia neuronal, sendo que o receptor AMPA é permeável a cátions monovalentes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , e o receptor NMDA é acoplado a canais de alta condutância mediando o fluxo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$  (LOPACHIN et al., 2001). Já os receptores metabotrópicos ativam cascatas intracelulares de sinalização via receptores acoplados às proteínas G (KENNY & MARKOU, 2004).

Na tentativa de avaliarmos se o efeito neuroprotetor da Guo se dá via estes receptores, não conseguimos observar diminuição da ação da Guo na presença dos antagonistas MK-801 (receptor NMDA), GAMS (receptor Kainato) e M-CPG (receptor metabotrópico), quando estes antagonistas foram utilizados individualmente ou em conjunto (Figura 7).

A função neuronal é criticamente dependente da manutenção na distribuição transmembrana dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{++}$ , e a perda desses gradientes iônicos é considerada um gatilho para a fisiopatologia da isquemia cerebral e reperfusão, causando dano neuronal (LOPACHIN et al., 2001).

O gradiente iônico transmembrana é mantido por bombas dependentes de ATP ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase;  $\text{Ca}^{++}$ ATPase); por trocas iônicas através de sistema de antiporter (troca de  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{++}$ ) e por fluxo passivo através de canais iônicos dependentes ou de voltagem ou de ligantes (canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ , canais de glutamato) (LOPACHIN et al., 2001).

Com poucos minutos de PGO, os níveis de ATP celular diminuem, os aminoácidos excitatórios são liberados e o colapso no gradiente iônico resulta em despolarização da membrana (SIESJO, 1992), o que resulta em morte neuronal.

Em estudo realizado por LIMBRICK et al. (2003), a remoção de  $\text{Ca}^{++}$  do meio extracelular resultou na recuperação dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$  após a exposição à excitotoxicidade glutamatérgica. Isto ocorreu, pois a retirada de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, mas não de  $\text{Na}^+$  reduziu a elevação de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular induzida pelo glutamato e capacitou o neurônio a restaurar os níveis de repouso de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, sugerindo que o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  é o maior contribuinte para elevação da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular.

Em nosso trabalho, ao utilizarmos o EGTA (um quelante de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular em um meio sem adição de íons  $\text{Ca}^{++}$ ) nas fatias hipocâmpais submetidas à 15 minutos de PGO seguida de reperfusão e na presença de Guo, observamos uma redução significativa no efeito neuroprotetor da Guo, demonstrando a participação do influxo de  $\text{Ca}^{++}$  no efeito da Guo

(Figura 10). Entretanto, ao utilizarmos a nifedipina (bloqueador de canal de  $\text{Ca}^{++}$  dependentes de voltagem) durante a reperfusão, a Guo teve seu efeito potencializado, demonstrando que o bloqueio dos canais do tipo L também auxilia na recuperação celular promovida pela nova oferta de glicose e oxigênio (reperfusão) (Figura 12). A flunarizina (bloqueador de canal de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem) não exerceu nenhum efeito contrário à ação da Guo (Figura 11).

No SNC, a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade e a plasticidade neuronal, a expressão gênica dependente de atividade, o crescimento de neuritos, a sinaptogênese, a diferenciação e a sobrevivência neuronal são processos dependentes de  $\text{Ca}^{++}$  (PIETROBON, 2005). Entretanto, todas estas funções são realizadas dentro de uma estreita variação na amplitude de concentração de  $\text{Ca}^{++}$ , pois este cátion pode ser tóxico se o seu nível não estiver controlado (BUDDE et al., 2002).

Um moderado aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  diminui a morte neuronal em neurônios hipocâmpais submetidos à PGO (BICKLER & FAHLMAN, 2004). Isto pode ocorrer, pois um moderado aumento na concentração de  $\text{Ca}^{++}$  ativa importantes vias de sobrevivência, incluindo a proteína quinase B (Akt; CHENG et al., 2003), a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos p42/44 (MAPK / ERK de 42 e 44 KDa; FAHLMAN et al., 2002) e o fator de crescimento derivado do cérebro (CHEN et al., 2003).

Estudo recente relatou que tratamento por 48 horas com Guo em cultura de astrócitos corticais promove a expressão funcional de canais de  $\text{K}^+$  retificadores de correntes (Kir), até então não observados neste tipo de células. Com isso, estes canais regulam a homeostase de  $\text{K}^+$ , sugerindo um papel neuroprotetor exercido pela Guo. Entretanto não se sabe por qual mecanismo a Guo é capaz de promover este efeito (BENFENATI et al., 2006).

Além de canais de  $\text{K}^+$  que retificam correntes (os canais Kir ou GIRK), temos os canais de  $\text{K}^+$  dependente de voltagem, como os tipo A, D, M e o retificado com atraso, que

contribuem para a repolarização, e os canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{++}$  que abrem após a despolarização para repolarizar, conhecidos como canais SK (de baixa condutância) e BK (de grande condutância) (YUAN & CHEN, 2006).

Todos os canais com condutância ao  $K^+$  são sensíveis à glicose e ao ATP. Sendo assim, qualquer mudança no estado redox da célula faz com que a condutância através dos canais de  $K^+$  seja alterada (VELASCO et al., 2006).

A área CA1 do hipocampo é a região do cérebro mais vulnerável ao dano induzido por isquemia e reperfusão (SMITH et al., 1984), junto com o fato de que a região CA1 é a região com menor densidade de canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP (KARSCHIN et al, 1997; ZAWAR et al., 1999). Isto suporta a hipótese que os canais de  $K^+$  sensíveis à ATP têm um importante papel na resposta celular ao dano isquêmico.

O estudo realizado por BENFENATI et al (2006) nos impulsionou a buscar um possível mecanismo de ação para a Guo via canais de  $K^+$ , com a utilização do 4-AP, um inibidor de canal de  $K^+$ . O 4-AP bloqueia preferencialmente canal de  $K^+$  tipo A dependente de voltagem, o que resulta num grande potencial de ação dendrítico que algumas vezes leva ao influxo  $Ca^{++}$  (YUAN & CHEN, 2006). Com a utilização do 4-AP, e conseqüente bloqueio de canais de  $K^+$ , observamos uma diminuição da ação neuroprotetora da Guo (Figura 13).

Ao bloquearmos o canal de  $Ca^{++}$  do tipo L com a nifedipina, a Guo tem seu efeito potencializado. Porém, quando utilizamos o 4-AP, que bloqueia o canal de  $K^+$ , a Guo perde seu efeito neuroprotetor. Efeito semelhante ocorre quando utilizamos um quelante de  $Ca^{++}$  extracelular, pois a Guo perde parcialmente o seu efeito. Com isso podemos concluir que a Guo atua via canal de  $K^+$  e de forma dependente das concentrações de  $Ca^{++}$  extracelular.

Isto pode ocorrer, pois o canal de  $K^+$  do tipo SK (dependente de  $Ca^{++}$ ) está colocalizado com o canal de  $Ca^{++}$  do tipo L a uma distância estimada de 50 a 150 nm, na membrana celular de corpos de neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo (MARRION &

TAVALIN, 1998). A entrada de  $\text{Ca}^{++}$  pelo canal do tipo L pode ativar o canal de  $\text{K}^+$ , favorecendo a Guo de exercer sua ação neuroprotetora. Estes canais de  $\text{K}^+$  dependentes de  $\text{Ca}^{++}$  podem ser ativados através da liberação dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$ . Isto resulta num recrutamento diferente destes canais, que depende da frequência de disparo do neurônio e é um importante mecanismo para regulação da excitabilidade da membrana celular de maneira plástica (AKITA & KUBA, 2000).

Como a isquemia e a reperfusão levam a um aumento marcante da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, este se liga à calmodulina e estimula a ativação de uma variedade de enzimas, entre elas a CAMKII (GHOSH & GREENBERG, 1995). A CAMKII é a proteína de sinalização mais abundante na densidade pós-sináptica e uma das quinases mais importantes ativadas durante a isquemia cerebral e início do período de reperfusão (MENG et al., 2003). No entanto, em nosso trabalho, não encontramos correlação direta entre o efeito neuroprotetor da Guo na PGO e a ativação da proteína CAMKII, através da utilização de um inibidor seletivo (Figura 14).

Evidências mostram que a morte neuronal após a isquemia pode ser causada por um desequilíbrio em eventos de sinalização, dentre elas a via da PI3-K-AKT que é uma importante via de sinalização anti-apoptótica em neurônios (LOVE, 2003). Diferentes áreas hipocâmpais apresentam sensibilidade diferente à PI3-K: a área do giro dentado tem a PI3-K como principal via anti-apoptótica, enquanto a área CA1 apresenta outras vias anti-apoptóticas (HORN et al., 2005). Em nosso trabalho, após 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na presença de wortmanina e Guo, a Guo perdeu seu efeito neuroprotetor, demonstrando que a via da PI3-K é uma das vias envolvidas na neuroproteção induzida pela Guo.

Células PC12 tratadas com os nucleosídeos, adenosina e Guo, apresentam aumento da viabilidade celular e no crescimento neurítico após insulto hipóxico. Isto se dá, pois os

nucleosídeos da purina ativam a via da MAPK (TOMASELLI et al., 2005). Estes dados vão de encontro ao resultado encontrado em nosso trabalho, onde a adição de PD98059 à reperfusão com Guo inibiu a ação da Guo, demonstrando que esta via também está envolvida na recuperação da viabilidade celular obtida pela adição de Guo à reperfusão.

Em PGO e outros danos excitotóxicos *in vitro* os níveis e a atividade de PKC encontram-se aumentados precocemente (SELVATICI et al., 2003), estando a ativação da PKC relacionada a insultos isquêmicos. Entretanto a ativação desta via pode estar relacionada à tolerância do cérebro pós-precondicionamento (BRIGHT & MOCHLY-ROSEN, 2005). Em nosso trabalho, a via da PKC está envolvida com a neuroproteção mediada pela Guo, pois sua inibição leva à diminuição da viabilidade celular na presença de queleretrina e Guo.

Outra via avaliada foi a via da PKA, que também está envolvida com a neuroproteção mediada pela Guo em modelo de isquemia *in vitro* através da PGO.

Portanto, a neuroproteção induzida pela Guo se dá via a ativação das vias de sinalização intracelulares PKA, PKC, MEK/MAPK e PI3-K (Figura 14 e 15). A participação destas proteínas quinases, individualmente ou em conjunto, no efeito neuroprotetor da Guo, bem como os mecanismos de ativação destas proteínas decorrente da ação da Guo, permanecem como questões a serem respondidas.

## 6. CONCLUSÕES

1. Os DG, Guo e GMP, são neuroprotetores no modelo de isquemia *in vitro* (PGO) quando fatias de hipocampo são submetidas a 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na presença destes DG;
2. A Guo não atua via receptores purinérgicos (adenosinérgicos), pois a utilização de antagonistas para estes receptores não inibiu seu efeito protetor;
3. A presença de antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos isolados ou em conjunto não interferiram na ação neuroprotetora da Guo, concluindo que a Guo não atua via estes receptores;
4. A Guo atua no meio extracelular, pois a utilização de inibidores de transporte de nucleosídeos não alterou sua ação neuroprotetora em fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão;
5. A ação neuroprotetora da Guo em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO não é alterada pelo bloqueio de transporte de glutamato (captação ou transporte reverso de glutamato);
6. A Guo necessita de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular para atuar como agente neuroprotetor após a PGO em fatias de hipocampo de ratos, pois ao quelarmos o  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, a Guo perde seu efeito;
7. O bloqueio do canal de  $\text{Ca}^{++}$  potencializa parcialmente o efeito da Guo, mostrando que a Guo não atua diretamente via canais de  $\text{Ca}^{++}$  do tipo L;
8. O bloqueio de canal de  $\text{K}^+$  leva à perda do efeito neuroprotetor da Guo, sugerindo que a ação neuroprotetora da Guo ocorre através da ativação de canais de  $\text{K}^+$  dependentes de  $\text{Ca}^{++}$ ;

9. A ação neuroprotetora da Guo durante a PGO em fatias de hipocampo ocorre via ativação das vias da PKA, PKC, MEK e PI3K.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKITA, T., KUBA, K. Functional triads consisting of ryanodine receptors, Ca<sup>2+</sup> channels, and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in bullfrog sympathetic neurons. Plastic modulation of potencial. *J. Gen. Physiol.* 116: 697-720, 2000.

BAÚ, C; MIDDLEMISS, P.J.; HINDLEY, S.; JIANG, S.; CICCARELLI, R.; CACIAGLI, F.; DIORIO, P.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Guanosine stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of heme oxygenase and cyclic GMP. *Purinergic Signaling.* 1:161-172, 2005.

BENDER, A.S., WOODBURY, D.M., WHITE, H.S. Ionic dependence of adenosine uptake into cultured astrocytes. *Brain Res.* 661:1-8, 1994.

BENFENATI, V., CAPRINI, M., NOBILE, M., RAPISARDA, C., FERRONI, S.  
Guanosine promotes the up-regulation of inward rectifier potassium current mediated by Kir4.1 in cultured rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 98:430-45, 2006.

BHATTACHARJEE A, KACZMAREK LK. For K<sup>+</sup> channels, Na<sup>+</sup> is the new Ca<sup>2+</sup>.  
*Trends Neurosci.* 28:422-8, 2005.

BICKLER, P.E., FAHLMAN, C.S. Moderate increases in intracellular calcium activate neuroprotective signals in hippocampal neurons. *Neuroscience.* 127:673-83, 2004.

BODIN, P., BURNSTOCK, G. Purinergic signaling: ATP release. *Neurochem. Res:* 26:

959-69, 2001.

BOECK, C.R., KROTH, E.H., BRONZATTO, M.J., JARDIM, F.M., SOUZA, D.O., VENDITE, D. Effects of glutamate transporter and receptor ligands on neuronal glutamate uptake. *Neurosci Res.* 53:77-83, 2005.

BONDE, C., SARUP, A., SCHOUSBOE, A., GEGELASHVILI, G., ZIMMER, J., NORABERG, J.. Neurotoxic and Neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem. Int.* 43:371-380, 2003.

BOURNE, H.R., SANDERS, D.A., MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature.* 348:125-132, 1990.

BRIGHT, R., RAVAL, A.P., DEMBNER, J.M., PEREZ-PINZON, M.A., STEINBERG, G.K., YENARI, M.A., MOCHLY-ROSEN, D. Protein kinase C delta mediates cerebral reperfusion injury in vivo. *J. Neurosci.* 24: 6880-88, 2004.

BRIGHT, R., MOCHLY-ROSEN, D. The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury. *Stroke.* 36: 2781-90, 2005.

BRONGHOLI, K., SOUZA, D.G., BAINY, A.C., DAFRE, A.L., TASCA, C.I. Oxygen-glucose deprivation decreases glutathione levels and glutamate uptake in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1083: 211-8, 2006.

BUDDE, T., MEUTH, S., PAPE, H.C. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci.* 3:873-83, 2002.

BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for drugs and hormones: A Multidisciplinary Approach* (ed. Straub, R.W. & Bolis, L.) 107-118 (Raven, New York, 1978).

CAMACHO, A., MASSIEU, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res.* 37:11-8, 2006.

CHEN, Y., HERTZ, L., RATHBONE, M.P., CODE, W. Adenosine and guanosine increase free cytosolic calcium concentration in mouse brain astrocytes through different receptors. *Abstr. Soc. Neurosci.* 19, 687, n.285.11, 1993.

CHEN, W.G., CHANG, Q., LIN, Y., MEISSNER, A., WEST, A.E., GRIFFITH, E.C., JAENISCH, R., GREENBERG, M.E. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science.* 302: 885-9, 2003.

CHENG, A., WANG, S., YANG, D., XIAO, R., MATTSON, M.P. Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons. *J Biol Chem.* 278: 7591-9, 2003.

CICCARELLI, R., DI IORIO, P., BALLERINI, P., AMBROSINI, G., GIULIANI, P., TIBONI, G.M., CACIAGLI, F. Effects of exogenous ATP and related analogues on the

proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 39:556-66, 1994.

CICCARELLI, R., SUREDA, F.X., CASABONA, G., DI IORIO, P., CARUSO, A., SPINELLA, F., CONDORELLI, D.F., NICOLETTI, F., CACIAGLI, F. Opposite influence of the metabotropic glutamate receptor subtypes mGlu3 and -5 on astrocyte proliferation in culture. *Glia.* 21:390-8, 1997.

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

CICCARELLI, R., DI IORIO, P., BRUNO, V., BATTAGLIA, G., D'ALIMONTE, I., D'ONOFRIO, M., NICOLETTI, F., CACIAGLI, F. Activation of A(1) adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100beta protein from cultured astrocytes. *Glia.* 27:275-81, 1999b.

CICCARELLI, R., BALLERINI, P., SABATINO, G., RATHBONE, M.P., D'ONOFRIO, M., CACIAGLI, F., DI IORIO, P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19: 395-414, 2001.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65:1-105, 2001.

DECKER, H. O efeito trófico dos derivados da guanina em culturas de astrócitos e neurônios cerebelares. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa

Catarina, Florianópolis, 2006.

DI IORIO, P., BALLERINI, P., TRAVERSA, U., NICOLETTI, F., D'ALIMONTE, I., KLEYWEGT, S., WERSTIUK, E.S., RATHBONE, M.P., CACIAGLI, F., CICCARELLI, R. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia*. 46:356-68, 2004.

FAHLMAN, C.S., BICKLER, P.E., SULLIVAN, B., GREGORY, G.A. Activation of the neuroprotective ERK signaling pathway by fructose-1,6-bisphosphate during hypoxia involves intracellular Ca<sup>2+</sup> and phospholipase C. *Brain Res*. 958:43-51, 2002.

FIELDS, R.D., BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci*. 7:423-36, 2006.

FINK, C.C., MEYER, T. Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 12:293-9, 2002.

FRIZZO, M.E.S., LARA, D.R., DAHM, K.C.S., PROKOPIUK, A.S., SWANSON, R.A., SOUZA, D.O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport*. 12:879-881, 2001.

FRIZZO, M.E.S., LARA, D.R., PROKOPIUK, A.S., VARGAS, C.R., SALBEGO, C.G., WAJNER, M., SOUZA, D.O. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol*. 22: 353-363, 2002.

FUJIMURA, N., TANAKA, E., YAMAMOTO, S., SHIGEMORI, M., HIGASHI, H.

Contribution of ATP-sensitive potassium channels to hypoxic hyperpolarization in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 77:378-85, 1997.

GASIC, G.P., HOLLMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 54:507-536, 1992.

GHOSH, A., GREENBERG, M.E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science.* 268: 239-47, 1995.

GONZALEZ-ZULUETA, M., FELDMAN, A.B., KLESSE, L.J., KALB, R.G., DILLMAN, J.F., PARADA, L.F., DAWSON, T.M., DAWSON, V.L. Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *PNAS.* 97:436-441, 2000.

GU, J.G., NATH, A., GEIGER, J.D. Characterization of inhibitor-sensitive and -resistant adenosine transporters in cultured human fetal astrocytes. *J. Neurochem.* 67: 972-7, 1996.

GYSBERS, J. W., RATHBONE, M.P. Guanosine enhances NGF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroreport.* 3: 997-1000, 1992.

GYSBERS, J.W., RATHBONE, M.P. GTP and guanosine synergistically enhance NGF-induced neurite outgrowth from PC12 cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14: 19-34, 1996a.

GYSBERS, J.W., GUARNIERI, S., MARIGGIO, M.A., PIETRANGELO, T., FANO, G., RATHBONE, M.P. Extracellular guanosine 5`triphosphate enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth via increases in intracellular calcium. *Neuroscience* 96: 817-24, 2000.

HERDEGEN, T., CLARET, F.X., KALLUNKI, T., MARTIN-VILLALBA, A., WINTER, C., HUNTER, T., KARIN, M. Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci.* 18:5124-35, 1998.

HEURTEAUX, C., LAURITZEN, I., WIDMANN, C., LAZDUNSKI, M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:4666-70, 1995.

HORN, A.P., GERHARDT, D., GEYER, A.B., VALENTIM, L., CIMAROSTI, H., TAVARES, A., HORN, F., LENZ, G., SALBERGO, C. Cellular death in hippocampus in response to PI3K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochem. Res.* 30: 355-61, 2005.

HU, B.R., WIELOCH, T. Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in the rat brain following transient cerebral ischemia. *J Neurochem.* 62:1357-67, 1994.

JACOBSSON, S.O.; FOWLER, C.J. Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephali cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO

inhibitors. *Neurochem. Int.* 34: 49-62, 1999.

KARSCHIN, C., ECKE, C., ASHCROFT, F.M., KARSCHIN, A. Overlapping distribution of K(ATP) channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in rodent brain. *FEBS Lett.* 401: 59-64, 1997.

KENNY, P.J., MARKOU, A. The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 25:265-272, 2004.

KIM, J.K., RATHBONE, M.P., MIDDLEMISS, P.J., HUGHES, D.W., SMITH, R.W. Purinergic stimulation of astroblast proliferation: guanosine and its nucleotides stimulate cell division in chick astroblast. *J. Neurosci. Res.* 28: 442-55, 1991.

KYRIAKIS, M., AVRUCH, J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays.* 18:567-77, 1996.

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

LEGOS, J.J., MCLAUGHLIN, B., SKAPER, S.D., STRIJBOS, P.J., PARSONS, A.A., AIZENMAN, E., HERIN, G.A., BARONE, F.C., ERHARDT, J.A. The selective p38 inhibitor SB-239063 protects primary neurons from mild to moderate excitotoxic injury. *Eur. J. Pharmacol.* 447:37-42, 2002.



LIMBRICK Jr., D.D., SOMBATI, S., DeLORENZO, R.J. Calcium influx constitutes the ionic basis for the maintenance of glutamate-induced extended neuronal depolarization associated with hippocampal neuronal death. *Cell Calcium*. 33: 69-81, 2003.

LITSKY ML, HOHL CM, LUCAS JH, JURKOWITZ MS. Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during chemical hypoxia. *Brain Res*. 821:426-32, 1999.

LOPACHIN, R.M., GAUGHAN, C.L., LEHNING, E.J., WEBER, M.L., TAYLOR, C.P. Effects of ion blockade on the distribution of Na, K, Ca and other elements in oxygen-glucose deprived CA1 hippocampal neurons. *Neurosci*: 103, 971-83, 2001.

LOVE, S. Apoptosis and brain ischemia. *Prog. Neuro-Psycoph*. 27: 267-82, 2003.

MACIEL, E.N., VERCESI, A.E., CASTILHO, R.F. Oxidative stress in Ca(2+)-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *J. Neurochem*. 79:1237-1245, 2001.

MADDEN, D. R The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat. Rev. Neurosci*. 3: 91-101, 2002.

MAIER, C.M., CHAN, P.H. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist*. 8:323-334, 2002.

MARRION, N.V., TAVALIN, S.J. Selective activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by

- co-localized Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal neurons. *Nature*. 395: 900-905, 1998.
- MARTIN, R.L., LLOYD, H.G., COWAN, A.I. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci*. 17:251-7, 1994.
- MATTSON, M.P. .Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1:120-129, 2000.
- MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130: 1007S-1015S, 2000.
- MENG, F., GUO, J., ZHANG, Q., SONG, B., ZHANG, G. Autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIa (CaMKIIa) reversibly targets to and phosphorylates N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B (NR2B) in cerebral ischemia and reperfusion in hippocampus of rats . *Brain Res.* 967: 161-69, 2003.
- MIDDLEMISS, P.J., GYSBERS, J.W., RATHBONE, M.P. Extracellular guanosine and guanosine-5'-triphosphate increase: NGF synthesis and release from cultured mouse neopallial astrocytes. *Brain Res.* 677: 152-6, 1995b.
- MIZUKAMI, Y., YOSHIOKA, K., MORIMOTO, S., YOSHIDA, K. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem.* 272:16657-62, 1997.
- MOLZ, S., DECKER, H., OLIVEIRA, I.J., SOUZA, D.O., TASCA, C.I. Neurotoxicity

induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem. Res.* 30:83-89, 2005.

MORCIANO, M., ORTINAU, S., ZIMMERMANN, H. Guanine nucleotides inhibit NMDA and kainate-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal and neocortical neurons. *Neurochem. Int.* 45: 95-101, 2004.

MORETTO, M.B., ARTENI, N.S., LAVINSKY, D., NETTO, C.A., ROCHA, J.B.T., SOUZA, D.O., WOLFCHUK, S. Hipoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: Prevention by guanosine. *Exper. Neurob.* 195: 400-406, 2005.

MULLER, C.E., SCIOR, T. Adenosine receptors and their modulators. *Pharmac. Acta Helvetiae.* 68, 77-111, 1993.

NEARY, J.T., RATHBONE, F.C., ABBRACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *TINS.* 19: 13-18, 1996.

OLIVEIRA, I.J., MOLZ, S., SOUZA, D.O., TASCA, C.I. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an in vitro model of ischemia. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22:335-344, 2002.

OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54:581-618, 1998.

- PIETROBON, D. Function and dysfunction of synaptic calcium channels: insights from mouse models. *Curr Opin Neurobiol.* 15:257-65, 2005.
- POCOCK, J.M., NICHOLLS, D.G. Exocytotic and nonexocytotic models of glutamate release from cultured cerebellar granule cells during chemical ischemia. *J. Neurochem.* 70: 806-813, 1998.
- RATHBONE, M.P., CHRISTJANSON, L., DEFORGE, S., DELUCA, B., GYSBERS, J.W., HINDLEY, S., JOVETICH, M., MIDDLEMISS, P., TAKHAL, S. Extracellular purine nucleosides stimulate cell division and morphogenesis: pathological and physiological implications. *Med Hypotheses.* 37:232-40, 1992a.
- RATHBONE, M.P., MIDDLEMISS, P.J., GYSBERS, J.W., DEFORGE, S., COSTELLO, P., DEL MAESTRO, R.F. Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types. *In Vitro Cell Dev Biol.* 28A:529-36, 1992b.
- RATHBONE, M.P., MIDDLEMISS, P., ANDREW, C., CACIAGLI, F., CICCARELLI, R., DI IORIO, P., HUANG, R. The trophic effects of purines and purinergic signaling in pathologic reactions of astrocytes. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 12 Suppl 2:S36-45, 1998.
- RATHBONE, M. P., MIDDLEMISS, P.J., GYSBERS, J.W., ANDREW, C., HERMAN, M.A.R., REED, J.K., CICCARELLI, R., DI IORIO, P., CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Progr. Neurobiol.* 59: 663-90, 1999.
- ROSSI, D.J., OSHIMA, T., ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is

mainly by reversed uptake. *Nature*. 403: 316-21, 2000.

SANTOS, T.G., SOUZA, D.O., TASCA, C.I. GTP uptake into rat brain synaptic vesicles.

*Brain Res*. 1070: 71-6, 2006.

SELVATICI, R., MARINO, S., PIUBELLO, C., RODI, D., BEANI, L., GANDINI, E.,

SINISCALCHI, A. Protein kinase C activity, translocation, and selective isoform subcellular redistribution in rat cerebral cortex after in vitro ischemia. *J. Neurosci. Res.* 71: 64-71, 2003.

SCHMIDT, A.P., LARA, D.R., MARASCHIN, J.F., PERLA, A.S., SOUZA, D.O.

Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolínico acid in mice. *Brain Res.* 864: 40-43, 2000.

SCHMIDT-KASTNER, R., FREUND, T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in

brain ischemia. *Neuroscience*. 40: 599-636, 1991.

SMITH, M.L., AUER, R.N., SIESJO, B.K. The density and distribution of ischemic brain

injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 64:319-32, 1984.

SIESJO, B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I:

Pathophysiology. *J Neurosurg*. 77:169-84.1992.

SOUZA, D.O., RAMIREZ, G. Effect of guanine nucleotides on kainic acid binding and on

adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *J. Mol. Neurosci.* 3: 39-45, 1991.

STOCKER, M.  $\text{Ca}^{2+}$ - activated  $\text{K}^{+}$  channels: molecular determinants and function of SK family. *Nature Rev. Neurosc.* 5: 758-70, 2004.

STRASSER, U., FISCHER, G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J. Neurosci. Meth.* 57: 177-86, 1995.

STRUZYNSKA, L., CHALIMONIUK, M., SULKOWSKI, G. Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in lead-exposed adult rat brain. *Neurochem. Int.* 47:326-333, 2005.

TAN, S., WOOD, M., MAHER, P. Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J. Neurochem.* 71: 95-105, 1998.

TASCA, C.I., WOFCHUK, S.T., SOUZA, D.O., RAMÍREZ, G., RODNIGHT, R. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. *Neuroreport.* 6: 249-252, 1995.

TASCA, C.I., CARDOSO, I.F., MARTINI, I.H., RAMÍREZ, G., SOUZA, D.O. Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptors activation. *Neurochem. Res.* 23: 183-188, 1998.

TASCA, C.I., BURGOS, J.S., BARAT, A., SOUZA, D.O., RAMIREZ, G. Chick kainate binding protein lacks GTPase activity. *Neuroreport*. 10: 1981-83, 1999a.

TASCA, C.I., CARDOSO, I.F., SOUZA, D.O. Effects of guanine nucleotides on adenosine and glutamate modulation of cAMP levels in optic tectum slices from chicks. *Neurochem. Int.* 34: 213-220, 1999b.

TASCA, C.I., SANTOS, T.G., TAVARES, R.G., BATTASTINI, A.M., ROCHA, J.B., SOUZA, D.O. Guanine derivatives modulate L-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles. *Neurochem. Int.* 44:423-431, 2004.

TAUSKELA, J.S., BRUNETTE, E., MONETTE, R., COMAS, T., MORLEY, P. Preconditioning of cortical neurons by oxygen-glucose deprivation: tolerance induction through abbreviated neurotoxic signaling. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 285:899-911, 2003.

TAVARES, R.G., SCHMIDT, A.P., ABUD, J., TASCA, C.I., SOUZA, D.O. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. *Neurochem Res.* 30:439-44, 2005.

TRAVERSA, U., BOMBI, G., DIORIO, P., CICCARELLI, R., WESSTIUK, E.S., RATHBONE, M.P. Specific [<sup>3</sup>H]- guanosine binding sites in rat brain membranes. *Brit. J. Pharmacol.* 135:969-76, 2002.

TOMASELLI, B., PODHRASKI, V., HEFTBERGER, V., BOCK, G., BAIER-BITTERLICH, G. Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced

neuronal injuries involves p42/44 MAPK activation. *Neurochem. Int.* 46: 513-21, 2005.

TORP, R., HAUG, F.M., TONDER, N., ZIMMER, J., OTTERSEN, O.P. Neuroactive amino acids in organotypic slice cultures of the rat hippocampus: an immunocytochemical study of the distribution of GABA, glutamate, glutamine and taurine. *Neuroscience.* 46:807-23, 1992.

TRAVERSA, U., BOMBI, G., CAMAIONI, E., MACCHIARULO, A., COSTANTINO, G., PALMIERI, C., CACIAGLI, F., PELLICCIARI, R. Rat brain guanosine binding site: biological studies and pseudo-receptor construction. *Bioorg. Medic. Chem.* 11: 5417-25, 2003.

VELASCO, M., GARCIA, E., ONETTI, C. Glucose deprivation activates diversity of potassium channels in cultured rat hippocampal neurons. *Cell. Mollec. Neurobiol.* 26: 307-19, 2006.

VOUTSINOS-PORCHE, B., BONVENTO, G., TANAKA, K., STEINER, P., WELKER, E., CHATTON, J.Y., MAGISTRETTI, P.J., PELLERIN, L. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron.* 37:275-286, 2003.

WALLIN, C., WEBER, S.G., SANDBERG, M. Glutathione efflux induced by NMDA and kainate: implications in neurotoxicity? *J. Neurochem.* 73:1566-1572, 1999.

WALTON, M., MACGIBBON, G., YOUNG, D., SIRIMANNE, E., WILLIAMS, C.,



GLUCKMAN, P., DRAGUNOW, M. Do c-Jun, c-Fos, and amyloid precursor protein play a role in neuronal death or survival? *J Neurosci Res.* 53:330-42, 1998.

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

VINADÉ, E.R., SCHMIDT, A.P., FRIZZO, M.E.S., PORTELA, L.V., SOARES, F.A., SCHWALM, F.D., ELISABETSKY, E., IZQUIERDO, I., SOUZA, D.O. Chronically administered guanosine is anticonvulsivant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Res.* 977: 97-102, 2003.

VINADE, E.R., SCHMIDT, A.P., FRIZZO, M.E., PORTELA, L.V., SOARES, F.A., SCHWALM, F.D., ELISABETSKY, E., IZQUIERDO, I., SOUZA, D.O. Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. *J Neurosci Res.* 79: 248-53, 2005.

VUORINEN, P., PORSTI, I., METSA-KETELA, T., MANNINEN, V., VAPAATALO, H., LAUSTIOLA, K.E. Modification of nitrovasodilator effects on vascular smooth muscle by exogenous GTP and guanosine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 18: 871-7, 1991.

VUORINEN, P., LAUSTIOLA, K.E. Exogenous GTP increases cyclic GMP and inhibits thrombin-induced aggregation of washed human platelets: comparison with ATP, adenosine and guanosine. *Pharmacol Toxicol.* 71: 289-93, 1992.

YAMAGUCHI, A., TAMATANI, M., NAMIKAWA, K., KIYAMA, H., VITEK, M.P., MITSUDA, N., TOHYAMA, M. Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J.Biol. Chem.* 2001.

YIN, T., SANDHU, G., WOLFGANG, C.D., BURRIER, A., WEBB, R.L., RIGEL, D.F., HAI, T., WHELAN, J. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem.* 272: 19943-50, 1997.

YOO, B.K., CHOI, J.W., YOON, S.Y., KO, K.H. Protective effect of adenosine and purine nucleos(t)ides against the death by hydrogen peroxide and glucose deprivation in rat primary astrocytes. *Neurosci Res.* 51: 39-44, 2005.

YUAN, L-L., CHEN,X. Diversity of potassium channels in neuronal dendrites. *Progr. Neurobiol.* 78: 374-89, 2006.

ZAWAR, C., PLANT, T.D., SCHIRRA, C., KONNERTH, A., NEUMCKE, B. Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J Physiol.* 514:327-41, 1999.

ZIMMERMANN, H., 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 49, 589-618.