



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

*Estudo dos Mecanismos da Neuroproteção Promovida pela
Guanosina em Fatias de Hipocampo de Ratos Submetidas à
Privação de Glicose e Oxigênio*

Tharine Aparecida Dal-Cim

Orientadora: Profa. Dr^a Carla Inês Tasca

Florianópolis, fevereiro 2007

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Neurociências

Estudo dos Mecanismos da Neuroproteção Promovida pela Guanosina em Fatias de Hipocampo de Ratos Submetidas à Privação de Glicose e Oxigênio

Tharine Aparecida Dal-Cim

Orientadora: Profa. Dr^a Carla Inês Tasca

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

*Aos meus pais, Teori e Ivanir, por toda sua amizade,
amor e o apoio incondicional em todos momentos da minha vida.
Com todo meu amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter iluminado meu caminho até aqui.

Agradeço as pessoas mais importantes da minha vida, meu pai e minha mãe, que mesmo distantes se fizeram presentes por todos esses anos longe de casa, muito obrigada pelo amor, carinho, compreensão, amizade e força. Amo vocês.

Agradeço aos meus irmãos Thavi e Thiago pelo carinho.

Agradeço a minha orientadora Carla por todos esses anos de formação científica, obrigada por sua dedicação, ensinamentos e paciência. Obrigada por sua orientação e confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Thiago por estar sempre ao meu lado. Obrigada por todo seu amor, carinho e amizade. Obrigada por ter me ajudado com as referências e ter sido paciente enquanto eu estava preocupada com a escrita deste trabalho.

Ao pessoal do lab: Samuel, Ellen, Marina, Simone, Bruno, Wagner, Ana, Suely, João, Tet, muitíssimo obrigada pela amizade e colaboração nesse trabalho! Aos meus colegas da pós, professores e ao secretário Nivaldo da Pós-Graduação em Neurociências.

Agradeço a Simone pelo apoio, amizade e conversas sobre a vida e sobre a ciência!

Agradeço a Helena pelo incentivo e amizade que permanecem desde a minha iniciação científica.

Aos meus amigos de longa data que mesmo longe sempre me apoiaram e contribuíram para minha formação pessoal.

Agradeço ao professor Rodrigo e Nelson pelo empréstimo de materiais e equipamentos.

Aos professores da pós-graduação

Ao Biotério da UFSC e aos animais utilizados neste estudo.

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

Ao CNPq pelos auxílios financeiros.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1-Isquemia cerebral e excitotoxicidade glutamatérgica.....	1
1.2 –Derivados da Guanina.....	6
1.3- Derivados da Guanina e Neuroproteção.....	8
1.4- Canais de Potássio.....	13
2. -	
JUSTIFICATIVA.....	17
3 – OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1- Materiais.....	19
4.1.1-Reagentes.....	19
4.1.2-Equipamentos.....	20
4.2- Animais.....	20
4.3- Preparação das Fatias Hipocampais.....	20
4.4- Modelo de Isquemia: Privação de Glicose e Oxigênio.....	21
4.5- Avaliação da viabilidade celular.....	21
4.6-Ensaio de captação de L-[³ H]-Glutamato.....	22
4.7-Imunodeteção de proteínas.....	22

4.7.1- Preparação das amostras.....	22
4.7.2- Separação das amostras.....	22
4.7.3- Eletrotransferência e imunodeteção.....	23
4.8- Dosagem de proteínas.....	24
4.9- Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1- Avaliação da participação de canais de potássio na neuroproteção promovida pela guanosina.....	25
5.2-Avaliação do envolvimento do transporte de L-glutamato na neuroproteção promovida pela guanosina.....	34
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Captação de glutamato através de seus transportadores de membrana.....	5
Figura 2:	Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica e ação neuroprotetora dos DG.....	10
Figura 3:	Avaliação da neuroproteção promovida pela Guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	27
Figura 4:	Avaliação do envolvimento de canais de potássio dependentes de ATP na neuroproteção promovida pela Guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	28
Figura 5:	Avaliação do envolvimento de canais de potássio dependentes de cálcio na neuroproteção promovida pela Guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	30
Figura 6:	Avaliação do envolvimento de canais de potássio de baixa condutância ativados por Ca^{+2} na neuroproteção promovida pela Guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	31
Figura 7:	Avaliação do envolvimento de canais de potássio de alta condutância ativado por Ca^{+2} na neuroproteção promovida pela Guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.	33
Figura 8:	Avaliação do efeito da guanosina sobre a captação de $L[{}^3H]$ Glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO.	35
Figura 9:	Avaliação do efeito da guanosina e a participação de canais de potássio de alta condutância ativado por Ca^{+2} sobre a captação de $L[{}^3H]$ Glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO.....	37

Figura 10: Avaliação do efeito da guanosina e a participação da via da PI3-K sobre a captação de L[³H] Glutamato em fatias de hipocampo submetidas à

PGO.....39

Figura 11: Avaliação da expressão de p-AKT em fatias de hipocampo submetidas à

PGO.....41

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT : proteína quinase B

AMPA: alfa-amino-3hidróxi-metil-isoxazole

Apa: apamina

ATP: adenosina-5'-trifosfato

BK: canal de K^+ de alta condutância ativado por Ca^{2+}

Carib: Caribdotoxina

DG: Derivados da Guanina

DNA: ácido desoxirribonucléico

GAMS: γ -D-glutamilamino-metilsulfonato

GDP: guanosina-5'-difosfato

Gli: glibenclamida

Glu: glutamato

GMP: guanosina-5'-monofosfato

Gpp(NH)p: 5'-guanilil-imido-difosfato

GTP: guanosina-5'-trifosfato

GUO: guanosina

HEPES: ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico

HepG2: células derivadas de carcinoma hepatocelular de humanos

K_{ATP} : canal de K^+ sensíveis ao ATP

K_{Ca} : canal de K^+ ativado por Ca^{2+}

KRB: Tampão Krebs-Ringer-Bicarbonato

MEK: proteína quinase regulada por sinal extracelular

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio

PGO: privação de glicose e oxigênio

NMDA: n-metil-d-aspartato

PI3-K: proteína quinase dependente de fosfatidil inositol

PIP₂: fosfatidilinositol-3,4-bifosfato

PIP₃: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PKA: proteína quinase A dependente de AMP cíclico

PKC: proteína quinase C

SK: canal de K⁺ de baixa condutância ativado por Ca²⁺

TEA: tetraetilamonuim

Wort: Wortmanina

RESUMO

Os derivados da guanina têm sido implicados em vários efeitos extracelulares, como a modulação do sistema glutamatérgico e neuroproteção frente a diferentes danos excitotóxicos. Eles são liberados para o meio extracelular em situação fisiológica ou hipóxica e participam da comunicação intercelular. O objetivo deste trabalho foi avaliar participação dos canais de potássio e da via da PI3-K no mecanismo de neuroproteção promovido pela guanosina (GUO) em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO). A adição de GUO (100 μ M) no período de 2 horas de reperfusão após os 15 min de PGO previne a diminuição de viabilidade celular induzida pela PGO. A utilização dos bloqueadores de canais de K⁺ glibenclamida (20 μ M) e apamina (300nM) demonstrou que o mecanismo de neuroproteção da GUO não depende dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP e canais de K⁺ de baixa condutância ativados por Ca²⁺, respectivamente. A utilização de caribdotoxina (100 nM), bloqueador de canal de K⁺ de alta condutância ativado por Ca²⁺ (BK) reverteu o efeito neuroprotetor da GUO. As fatias de hipocampo submetidas à PGO e reperfusão apresentam uma significativa diminuição na captação de glutamato. A adição de GUO no período de reperfusão reverte a diminuição da captação de glutamato. O aumento da captação de glutamato promovido pela GUO é revertido quando as fatias são pré-incubadas com caribdotoxina (100 nM), bloqueador de canal BK e com o inibidor da via da PI3-K (wortmanina). GUO também promoveu aumento da fosforilação da proteína AKT, o que é revertido na presença de caribdotoxina. Concluindo, GUO promove neuroproteção através do aumento da captação de glutamato, o qual é modulado por canais de K⁺ de alta condutância ativados por Ca²⁺ e ativação da via da PI3-K, aumentando a expressão da proteína fosto-AKT e resultando em proteção celular.

ABSTRACT

Guanine derivatives (GD) have been implicated in many extracellular effects, such as modulation of glutamate transmission and neuroprotection against excitotoxic insult. GD are spontaneously released to the extracellular space from cultured astrocytes and, during oxygen-glucose deprivation (OGD). The aim of this study was to evaluate the involvement of potassium channels and the PI3-K pathway in the mechanisms related to the neuroprotective role of Guanosine (GUO) in rat hippocampal slices submitted to OGD. The addition of GUO (100 μ M) in hippocampal slices submitted to 15 minutes of OGD followed by 2 hours of reperfusion was neuroprotective. The presence of K^+ channel blockers, glibenclamide (20 μ M) and apamine (300 nM) revealed that the neuroprotective effect of GUO was not dependent on the ATP sensitive K^+ channel and the small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels. The presence of charybdotoxin (100 nM), a big conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (BK) blocker, reverted the neuroprotective effect of GUO. The hippocampal slices submitted to 15 minutes of OGD followed by 2 hours of reperfusion showed a significantly reduction of glutamate uptake. The addition of GUO in the reperfusion period revert the reduction of glutamate uptake. This GUO effect was inhibited when hippocampal slices were preincubated with charybdotoxin or wortmanin (1 μ M, PI3-K inhibitor) at the reperfusion period. GUO promotes an increased phosphorylation of AKT protein, however the presence of charybdotoxin reverted such effect. In conclusion, the neuroprotective effect of GUO involves augmentation of glutamate uptake, which is modulated by BK channels and activation of PI3-K pathway. GUO-induced increased expression of phospho-AKT resulted in neuroprotection.

1. INTRODUÇÃO

1.1- ISQUEMIA CEREBRAL E EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

A isquemia cerebral consiste na interrupção do fluxo sanguíneo cerebral que resulta em uma severa degeneração das células neurais e conseqüente perda das funções cerebrais (Mattson, 2000). De acordo com dados estatísticos, a isquemia cerebral é a terceira causa de morte nos países industrializados (Camacho & Massieu, 2006) e em decorrência disto, diversos estudos têm investigado os mecanismos que envolvem a morte celular resultante da isquemia.

O cérebro humano necessita de cerca de 20% do oxigênio consumido pelo organismo. Essa elevada quantidade de consumo de oxigênio é em grande parte utilizada para gerar ATP, através da fosforilação oxidativa. Durante o evento isquêmico ocorre uma rápida diminuição dos níveis de ATP nas células podendo resultar em um colapso das bombas iônicas, como a Na^+/K^+ -ATPase, já que estas são responsáveis por grande parte do consumo de ATP no cérebro (Doyle et al., 2008). As bombas iônicas Na^+/K^+ -ATPase são necessárias para manter o gradiente iônico de membrana, mantendo elevadas as concentrações de potássio (K^+) e baixas as concentrações de sódio (Na^+) no interior da célula. O resultado do colapso dessas bombas iônicas é a despolarização da membrana celular, liberação de potássio para o meio extracelular e entrada de sódio na célula. A despolarização da membrana juntamente com o prejuízo metabólico e a perda da homeostasia iônica tem como conseqüência uma massiva liberação de neurotransmissores excitatórios como o aminoácido L-glutamato (Glu) (Camacho & Massieu, 2006). Este evento é bem caracterizado em alterações agudas (hipóxia, encefalopatias isquêmicas, traumatismo craniano) ou alterações crônicas

(epilepsia, esquizofrenia, alcoolismo, doenças neurodegenerativas como as de Parkinson, Huntington, Alzheimer), onde as células neurais afetadas podem liberar glutamato e desencadear o evento conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica que resulta em morte celular (Segovia et al., 2001).

O glutamato presente na fenda sináptica ativa seus receptores de membrana ionotrópicos e metabotrópicos. Existem 8 tipos de receptores metabotrópicos de glutamato acoplados a proteína-G triméricas e eles são nomeados de mGluR1 ao 8. Eles 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 (Kenny & Markou 2004). 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 íons cálcio (Ca^{+2}) dos estoques intracelulares. O grupo II de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR2 e mGluR3) é encontrado tanto pré como pós-sinapticamente e são acoplados à proteína $G_{i/o}$ modulando a atividade da adenilato ciclase. Por último, o grupo III de receptores mGlu (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) está predominantemente localizado pré-sinapticamente onde atua como autoreceptor, e também está acoplado às proteínas-G modulando a atividade da adenilato ciclase (Kenny & Markou, 2004).

Os receptores ionotrópicos são canais iônicos dependentes da ativação por ligantes específicos. Distintas famílias de receptores ionotrópicos têm sido identificadas farmacologicamente por suas afinidades com agonistas sintéticos. São eles: AMPA (alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato), cainato e NMDA (N-metil-D-aspartato) (Madden, 2002). O receptor AMPA é distribuído igualmente pelo sistema nervoso central (SNC) sendo ricamente expresso no hipocampo. Ele é permeável aos

íons Na^+ , porém quando a subunidade GluR2 está ausente na conformação do receptor AMPA, ele se torna permeável a íons Ca^{+2} . O receptor cainato é encontrado no hipocampo, córtex, estriado, cerebelo, amígdala, hipotálamo, medula espinhal e na retina. Os receptores de cainato diferenciam-se dos receptores AMPA pela menor corrente conduzida e pela cinética de desativação mais lenta (Huettner, 2003). 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 Mg^{+2} . Quando ocorre despolarização da membrana há passagem de íons através do receptor. A ativação de receptores NMDA permite o influxo de grandes quantidades de Ca^{+2} extracelular para o interior da célula (Ozawa et al., 1998).

A massiva liberação de glutamato que ocorre durante o evento conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica leva à hiperativação de seus receptores ionotrópicos NMDA, AMPA e cainato (Meldrum 2000). Como já descrito, os receptores NMDA são permeáveis a íons Ca^{+2} permitindo que ocorra um grande aumento das concentrações desse íon no interior da célula contribuindo para o aumento da excitotoxicidade glutamatérgica. O aumento de Ca^{+2} intracelular pode ativar proteínas cisteínas proteases, denominadas calpaínas e caspases, que por sua vez podem degradar uma série de substratos como: proteínas de citoesqueleto, receptores de membrana e enzimas metabólicas. A elevada concentração de Ca^{+2} induz estresse oxidativo (Mattson, 2003) através da ativação de oxigenases, perturbação do cálcio mitocondrial e metabolismo energético (Mattson, 2007).

A retirada do glutamato da fenda sináptica é um importante mecanismo a fim de diminuir a quantidade desse neurotransmissor na fenda e dessa forma prevenir o dano

excitotóxico. O mecanismo de retirada do glutamato da fenda sináptica é realizado por transportadores de membrana dependentes de sódio de alta afinidade ao glutamato que estão presentes em células neuronais e astrócitos.

São identificados 5 subtipos de transportadores de glutamato. Dois deles GLAST (glutamate-aspartate transporter) e GLT-1 (glutamate transporter-1) descritos em roedores e considerados transportadores gliais (em humanos eles são designados como EAAT1 e EAAT2 - excitatory aminoacid transporters) (Danbolt, 2001). Transportadores neuronais também são importantes para manter as baixas concentrações extracelulares de glutamato. O transportador neuronal de glutamato mais amplamente distribuído no cérebro é o EAAC1 (homólogo humano, EAAT3), encontrado em regiões não-sinápticas. Outros subtipos clonados incluem EAAT4, localizado em células de Purkinje e EAAT5, localizado em neurônios retinianos (Anderson et al., 2001).

O transporte de glutamato ocorre da seguinte forma: uma molécula de glutamato é transportada para o citoplasma juntamente com dois íons Na^+ acompanhados da saída de um íon K^+ . Para que esse mecanismo ocorra é necessária a atividade de Na^+/K^+ ATPases para manter o gradiente de concentração de íons Na^+ , o que acarreta um grande consumo de ATP (Camacho & Massieu, 2006; Figura 1). Então, a manutenção dos níveis de ATP é essencial para o controle da transmissão glutamatérgica e a captação de glutamato diminui os níveis desse neurotransmissor na fenda sináptica prevenindo a excitotoxicidade glutamatérgica (Danbolt, 2001). Em alguns casos de dano celular, como a isquemia, onde ocorre desequilíbrio iônico e diminuição nos níveis de ATP intracelular, existe um acúmulo de Na^+ no interior das células que leva a extrusão de compostos osmoticamente ativos como glutamato e aspartato para manter o volume celular (Camacho & Massieu, 2006). Isto pode ocasionar a reversão dos

transportadores glutamatérgicos que ao invés de captar glutamato, liberam mais glutamato para o meio aumentando a concentração de glutamato na fenda sináptica e consequentemente aumento do dano celular (Rossi et al., 2000; Camacho & Massieu, 2006). Este mecanismo é denominado de transporte reverso de glutamato.

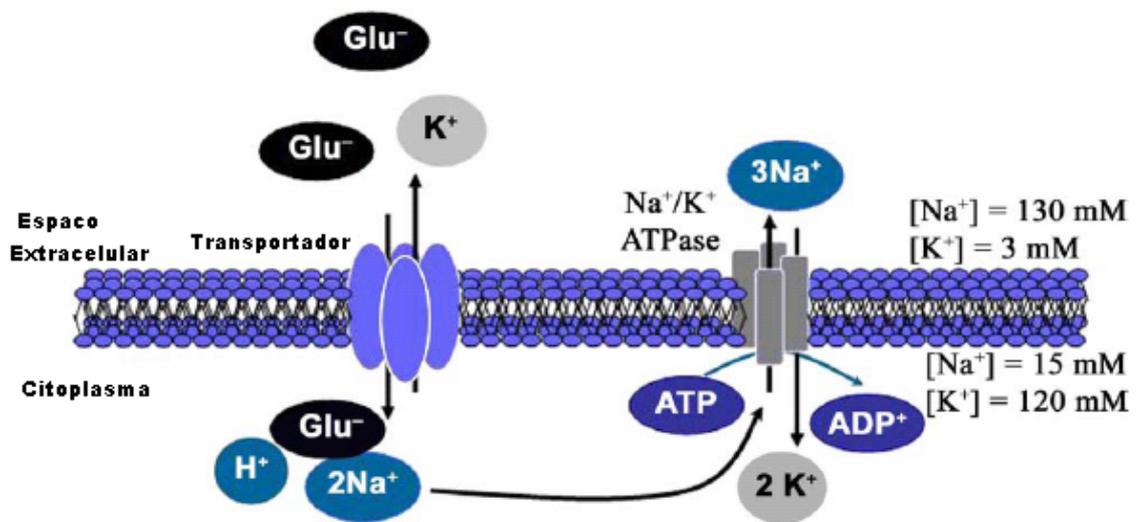


Figura 1: **Captação de glutamato através de seus transportadores de membrana.** A concentração extracelular de glutamato é altamente regulada por proteínas transportadoras localizadas na membrana plasmática de neurônios e glia. A captação é dependente do gradiente eletroquímico de sódio que é mantido pela atividade das Na^+/K^+ ATPases. (adaptado de Camacho & Massieu, 2006).

Além disso, durante a isquemia a entrada de cálcio contribui para o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (White et al., 2003). Os transportadores de glutamato são vulneráveis a oxidação, pois apresentam sítios de cisteína regulados pelo estado redox (Camacho & Massieu, 2006) com isso, o aumento de espécies reativas de oxigênio pode acarretar em uma diminuição da captação de glutamato (Trotti et al., 1998; Brongholi et al., 2006).

1.2- DERIVADOS DA GUANINA

Os Derivados da Guanina (DG) compreendem os nucleotídeos GTP (guanosina-5'-trifosfato), GDP (guanosina-5'-difosfato), GMP (guanosina-5'-monofosfato) e o nucleosídeo guanosina (GUO). Uma importante função descrita para os DG é a modulação da atividade das proteínas-G. As proteínas-G triméricas, são proteínas de membrana que tem sua atividade determinada pela interação com nucleotídeos como o GTP e GDP e atuam como transdutores dos sinais extracelulares, resultando em respostas efetoras específicas. Recentemente os DG têm sido descritos como importantes moléculas de sinalização intercelular (Neary et al., 1996; Ciccarelli et al., 2001), podendo desencadear eventos independentes da ativação de proteína-G.

A presença de derivados da guanina já foi identificada no fluido cérebro-espinal de humanos e de animais (Castro-Gago et al., 1992; Regner et al., 1997). A liberação de purinas da adenina e da guanosina para o meio extracelular já foi demonstrado em culturas de astrócitos (Ciccarelli et al., 1999), sendo que as concentrações dos DG permanecem mais elevadas que as das purinas derivadas da adenina. Além disso, em estudo realizado em preparações de sinaptossomas observou-se que nucleotídeo GTP pode ser captado e armazenado em vesículas sinápticas (Santos

et al. 2006), sugerindo assim um possível mecanismo de liberação desses nucleotídeos para a fenda sináptica.

A conversão de nucleotídeos em nucleosídeos no meio extracelular é importante para a manutenção da concentração extracelular das purinas. A conversão de GTP em GDP e GMP é realizada por uma família de ectoenzimas (ectoNTDPases), já a conversão de GMP em GUO ocorre pela ação de ecto-5'-nucleotidases, as quais também são responsáveis pela hidrólise dos derivados da adenina (Zimmermann, 1996), contribuindo assim para presença de nucleosídeos no meio extracelular.

Outra forma de liberação de nucleosídeos para o meio extracelular é através de transportadores de membrana. Os transportadores de nucleosídeos são uma família de proteínas que possuem diferentes afinidades por substratos, diferentes distribuições em tecidos, são espécie-específicos e sensíveis ao bloqueio por agentes farmacológicos (Cicarelli et al., 2001). Os transportadores de nucleosídeos funcionam de forma bidirecional liberando ou retirando os nucleotídeos da fenda sináptica contribuindo para a manutenção da concentração dos nucleosídeos dentro e fora da célula.

Os receptores dos DG ainda estão sendo caracterizados, portanto, antagonistas específicos para seus receptores ainda não estão disponíveis. Evidências mostram que os DG se unem aos receptores das purinas da adenina com baixa afinidade (Muller & Scior, 1993), sugerindo que os DG apresentam sítios de ligação distintos dos derivados da adenina. Estudos que dão embasamento a esta hipótese demonstraram que o GTP une-se a sítios específicos em células de feocromocitoma (PC12) (Gysbers et al., 2000) e em membranas cerebelares de pintos, sendo que estes sítios não apresentam atividade enzimática (GTPásica) (Tasca et al., 1999). Estudo realizado por Traversa e colaboradores (2002) demonstrou que a GUO apresenta um sítio de união de alta afinidade em preparações de membranas de cérebros de ratos (Traversa et al., 2002).

Este conjunto de dados indica que a GUO apresenta um sítio de união específico que ainda requer investigação.

1.3- DERIVADOS DA GUANINA E NEUROPROTEÇÃO

Os nucleotídeos e o nucleosídeo derivados da guanina desempenham um importante papel extracelular na modulação da transmissão glutamatérgica, apresentam efeitos sobre a memória e o comportamento e ainda efeitos tróficos em célula neurais (Schmidt et al., 2007).

Os DG podem modular a transmissão glutamatérgica através da inibição da união de glutamato e agonistas ionotrópicos (cainato, NMDA, AMPA) a seus receptores, sem interagirem diretamente com a proteína-G (Souza & Ramírez, 1991; Paz et al., 1994; Dev et al., 1996; Paas et al., 1996). Além disso, foi demonstrado que os DG podem inibir respostas fisiológicas celulares induzidas por glutamato (Tasca et al., 1995; 1998; 1999).

Estudos *in vivo* utilizando um agonista de receptor NMDA, o ácido quinolínico como agente indutor de convulsões, demonstraram que a administração de GMP e GUO protegem contra convulsões induzidas por este agonista do receptor NMDA (Schmidt et al., 2000; Oliveira et al., 2004, Schmidt et al., 2005). Além disso, o ácido quinolínico pode aumentar a liberação de glutamato em preparações de sinaptossomas e reduzir a captação glial de glutamato (Tavares et al., 2002), aumentando a concentração extracelular de glutamato, entretanto esse aumento é revertido na presença de GUO (Tavares et al., 2005; 2008).

Em cultura de neurônios hipocampais e corticais, os DG diminuem a neurotoxicidade induzida por NMDA e cainato (Morciano, 2004). Em estudos de excitotoxicidade, o GMP protege contra a toxicidade induzida por glutamato em fatias de hipocampo no modelo de isquemia química (Molz et al., 2005). Além disso, os DG protegem fatias de hipocampo submetidas à hipóxia e hipoglicemia (Frizzo et al., 2002).

A retirada do glutamato da fenda sináptica é um importante mecanismo para modular as ações desse neurotransmissor além de manter os níveis de glutamato em concentrações que não sejam neurotóxicas. Têm sido descrito um importante papel dos DG na modulação da captação de glutamato. A GUO é capaz de aumentar a captação basal de glutamato em culturas de astrócitos e em fatias corticais mantidas em condições basais ou submetidas à privação de glicose e oxigênio (Frizzo et al., 2001; 2002). Além disso, foi observado que os DG diminuem a captação de glutamato em vesículas sinápticas (Tasca et al., 2004) podendo diminuir a quantidade de neurotransmissor armazenado e a consequente liberação de glutamato para fenda sináptica. Dessa maneira, os DG atuam como neuroprotetores contribuindo para a manutenção dos níveis extracelulares de glutamato, uma vez que altas concentrações de glutamato na fenda sináptica pode levar a excitotoxicidade glutamatérgica e resultar em morte celular (Figura 2).

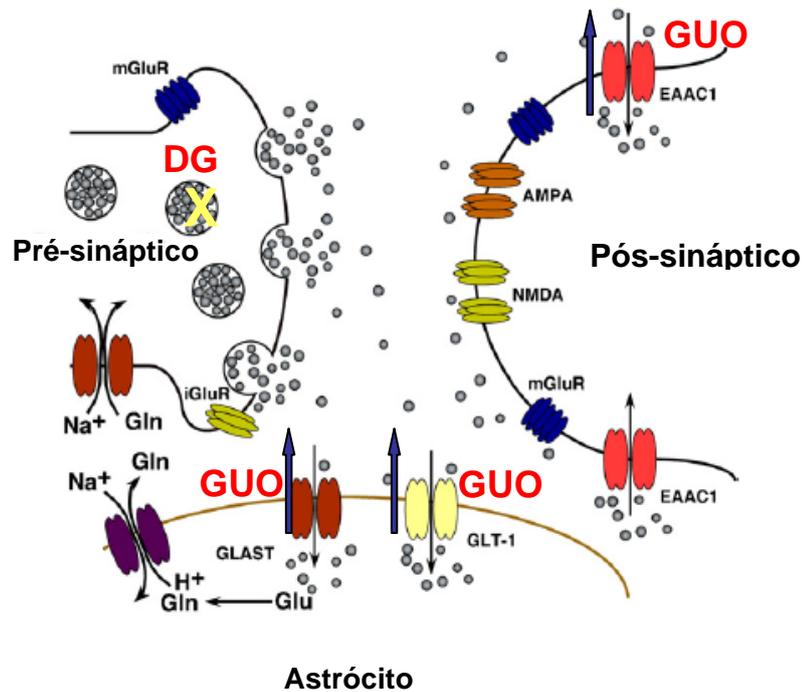


Figura 2: **Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica e ação neuroprotetora dos DG.** Os DG diminuem a captação de glutamato em vesículas sinápticas podendo assim, diminuir a quantidade de glutamato liberado para a fenda sináptica. A GUO aumenta a captação de glutamato através de seus transportadores gliais ou neuronais contribuindo para a retirada desse neurotransmissor da fenda sináptica. Dessa forma os DG podem atuar como neuroprotetores (Adaptado a partir de Sheldon & Robinson, 2007).

Culturas de astrócitos mantidos em condições basais liberam DG para o meio extracelular, sendo que quando essas culturas são submetidas a hipóxia e privação de glicose os níveis dos DG no meio extracelular aumentam significativamente (Cicarelli et al., 1999). Os níveis dos DG permanecem altos durante e após a hipóxia ou privação de glicose, em especial a GUO que é obtida da hidrólise de nucleotídeos (Uemura et al., 1991).

Em vista disso estudo recente realizado em nosso laboratório investigou o papel protetor da guanosina em um modelo de isquemia cerebral através da privação de glicose e oxigênio em fatias hipocâmpais de ratos. Neste estudo foi demonstrado que fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de privação de glicose e oxigênio seguidas de 2 horas de reperfusão, apresentam uma melhora da viabilidade celular quando a GUO é adicionada ao meio no período de reperfusão (Oleskovicz et al., 2008). Neste mesmo estudo, observou-se que o papel neuroprotetor desencadeado pela GUO é dependente da ativação de canais de K^+ . Este dado vai de encontro com a literatura onde foi demonstrado por Benfenati, et al. (2006), que a guanosina 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^+ por astrócitos.

Estudos recentes têm demonstrado um importante papel protetor da guanosina em modelos de doenças neurodegenerativas. A utilização de guanosina em ratos parkinsonianos reduz apoptose e promove neurogênese (Su et al., 2008). A adição de guanosina na linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y protege essas células contra a apoptose induzida pelo peptídeo beta-amiloide (Pettifer et al., 2004). A GUO é capaz de diminuir a expressão e função de receptores CD40 (receptores celulares associados a eventos inflamatórios) em culturas de células expostas a agentes pró-inflamatórios e ao peptídeo beta-amiloide (D'Alimonte et al., 2007). Ainda no estudo realizado por D'Alimonte e colaboradores foi demonstrado que a GUO é capaz de reduzir a apoptose induzida pelo peptídeo beta-amiloide.

Os DG apresentam efeitos tróficos em culturas de células gliais e em neurônios (Rathbone et al., 1999). Os DG ainda podem aumentar a produção de neurotrofinas em culturas de astrócitos e em neurônios estimular o crescimento de neuritos (Cicarelli et

al., 2001). Em nosso laboratório foi demonstrado que os DG aumentam o número de neurônios cultivados em co-cultura com astrócitos previamente tratados com GMP ou GUO (Decker et al., 2007). Neste mesmo trabalho foi demonstrado que a adição de GMP ou GUO em culturas de astrócitos altera a organização das proteínas da matriz extracelular, laminina e fibronectina, dessa forma os DG promovem uma melhor adesão dos neurônios sobre o substrato de astrócitos, o que pode ter um importante papel na neurogênese e na migração neuronal.

No estudo realizado por Oleskovicz e colaboradores (2008) foi demonstrado, através do uso de inibidores de algumas vias de sinalização celular, a participação da via da proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC), proteína cinase regulada por sinal extracelular (MEK/ERK) e proteína cinase de fosfatidilinositol (PI3-K) na neuroproteção promovida pela GUO no modelo isquêmico. Dentre as vias estudadas por Oleskovicz e colaboradores (2008), no presente trabalho nos detivemos na participação da via da PI3-K para investigar o mecanismo de neuroproteção promovido pela GUO em fatias de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio.

A ativação da via de sinalização intracelular PI3-K leva à formação de segundos-mensageiros como o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) e fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP₂). Estes mensageiros intracelulares são responsáveis por mediar respostas fisiológicas que dependem da ativação da PI3-K. Vários estudos demonstram que estas respostas estão associadas à ativação da proteína serina-treonina cinase, AKT (também denominada PKB) (Franke et al., 1997). Quando a PI3-K é ativada em respostas a insulina ou outros fatores de crescimento, ela promove a formação de PIP₃ e PIP₂. Esses segundos-mensageiros se ligam a um domínio amino-terminal presente na AKT promovendo a sua dimerização e translocação para a membrana celular, permitindo que esta seja fosforilada em seus sítios Treonina-308 e

Serina-473, resultando em sua ativação (Fukunaga & Kawano 2003). Dentre as funções atribuídas a AKT uma das mais importantes é seu papel na sobrevivência celular. Após a sua ativação, a AKT pode promover sobrevivência celular através da fosforilação e inibição da enzima glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β) (Endo et al., 2006), da proteína pró-apotótica BAD (Datta et al., 19997), ou através da inibição da Caspase-9 (Cardone et al., 1998).

O papel neuroprotetor da AKT frente a insultos isquêmicos já está bem descrito na literatura. Imediatamente após uma isquemia global ocorre uma drástica diminuição nos níveis de AKT fosforilada e este evento precede a liberação de citocromo-C e ativação de caspases, porém essa diminuição dos níveis da fosforilação da AKT é transitória e seguida por sua ativação (Ouyang et al., 1999). Animais submetidos a uma isquemia focal apresentam aumento da expressão de fosfo-AKT na região de penumbra (região que se localiza ao redor do centro isquêmico) no córtex cerebral, e este aumento está relacionado com a proteção de células neuronais (Noshita et al., 2001). Em cultura de neurônios hipocâmpais submetidas à hipóxia, a ativação da via PI3K-Akt preveniu a apoptose através da inibição de genes e proteínas pró-apoptóticas (Yamaguchi et al., 2003). Assim, o estudo da via da PI3-K-AKT no mecanismo de neuroproteção promovida pela GUO é de grande relevância visto que a GUO é capaz de promover proteção celular frente a diversos insultos neurotóxicos e a via da PI3K-AKT está bem descrita como uma via envolvida em mecanismos de neuroproteção.

1.4- CANAIS DE POTÁSSIO

Os canais de potássio (K^+) são encontrados em diferentes tipos celulares incluindo neurônios, cardio-miócitos, células musculares esqueléticas, células β -

pancreáticas, células do músculo liso e linfócitos (Burg et al., 2006). Eles são formados por proteínas multiméricas de membrana altamente seletivas ao K^+ . A ativação desses canais em células nervosas está relacionada com o controle do potencial de membrana. Os canais de K^+ normalmente se abrem após a despolarização da membrana, que ocorre durante um potencial de ação, permitindo que os íons K^+ fluam para o espaço extracelular repolarizando a membrana celular.

Existem 5 classes funcionais de canais de potássio: canais de K^+ regulados por voltagem, canais de K^+ ativados por Ca^{+2} , canais de K^+ sensíveis ao ATP, canais de K^+ retificadores de voltagem e canais de K^+ formado por dois poros.

Os canais de K^+ regulados por voltagem são sensíveis ao potencial de membrana. Esses canais se abrem quando a membrana celular despolariza, permitindo os íons K^+ fluam através do gradiente eletroquímico, levando à hiperpolarização da membrana.

Os canais de K^+ ativados por Ca^{+2} são ativados em resposta a um aumento da concentração de íons Ca^{+2} no interior da célula e com a despolarização da membrana celular (Burg et al., 2006). Os canais de K^+ ativados por Ca^{+2} podem ser divididos em canais de alta, intermediária e baixa condutância.

Os canais de K^+ de alta voltagem ativados por Ca^{+2} (BK) são ativados durante o potencial de ação, acelerando a repolarização da membrana (Sah & Davies et al., 2000). Como a ativação desses canais depende da despolarização e do aumento de Ca^{+2} intracelular, eles funcionam como reguladores da entrada de Ca^{+2} na célula, regulam a excitabilidade neuronal e liberação de neurotransmissores (Hu et al, 2000). Os canais de K^+ de baixa condutância ativados por Ca^{+2} , assim como os canais BK, são ativados após um potencial de ação e sua ativação resulta na hiperpolarização da membrana impedindo que ocorra um novo disparo na membrana da célula. A ativação dos canais

de K^+ de baixa condutância ativados por Ca^{+2} prolonga o tempo de hiperpolarização limitando a frequência de disparo das células neuronais onde esses canais foram ativados (Stocker, 2004), dessa maneira impedem nova despolarização da membrana contribuindo para uma menor liberação de neurotransmissores após um insulto isquêmico. Os canais de K^+ de condutância intermediária ativados por Ca^{+2} são canais que apresentam a mesma característica dos demais canais de K^+ ativados por Ca^{+2} porém apresentam condutância intermediária. Estes canais têm sido caracterizados em tipos celulares não neuronais (Faber & Sah 2003).

Os canais de K^+ sensíveis ao ATP são regulados pela concentração de ATP intracelular. O aumento da concentração intracelular de ATP inibe esses canais enquanto o aumento dos níveis de ADP estimulam sua abertura (Burg et al., 2006). Então, quando ocorre uma diminuição dos níveis de energia na célula, uma das respostas celulares é a abertura dos canais de K^+ sensíveis ao ATP para que o balanço iônico celular seja mantido. Durante o evento isquêmico onde ocorre diminuição dos níveis energéticos a ativação desses canais pode ser um importante mecanismo de neuroproteção. Tem sido demonstrado que camundongos transgênicos que não expressam canais de K^+ sensíveis ao ATP apresentam um maior dano neuronal após a oclusão das carótidas (Sun et al., 2006). A ativação dos canais de K^+ sensíveis ao ATP protege neurônios da região CA1 contra apoptose induzida por hipóxia (Huang et al., 2006).

Canais de K^+ retificadores de voltagem (Kir) são modulados por dois fatores: o potencial de membrana e os níveis extracelulares de K^+ . Os canais K^+ retificadores de voltagem são divididos em 7 subfamílias (Kir1-Kir7) e essa divisão é feita de acordo com sua sensibilidade a sinais endógenos. Kir1, Kir4 e Kir6 são sensíveis ao ATP. Kir2 é a forma clássica desses canais, são grandes retificadores de voltagem e são

encontrados no coração, musculatura lisa dos vasos, células endoteliais e cérebro. Os Kir3 também denominados GIRK, estão acoplados a proteína-G, sendo regulados pelas subunidades $\beta\gamma$ desta proteína. Esse subtipo de canal está relacionado com a regulação da atividade cardíaca frente ao estímulo do nervo vago (Burg et al., 2006).

Os canais de K^+ formados por dois poros são canais não dependentes de voltagem e representam uma nova classe de canais de K^+ . Eles diferem dos demais tipos de canais de potássio pois as correntes iônicas não dependem de voltagem e eles estão ativos em todos os potenciais de membrana. A ativação desses subtipos de canais estão associados a grande hiperpolarização da membrana celular. Existem alguns subtipos de canais K^+ formados por dois poros, os subtipos TWIK, TALK e TASK são sensíveis a mudanças no pH, sendo que os dois últimos subtipos também são sensíveis as mudanças na tensão de oxigênio e a produção de espécies reativas de oxigênio. Os subtipos denominados TREK, THIK e TRAAK são regulados pela inalação de anestésicos (Burg et al., 2006).

Neste estudo investigaremos a participação dos de K^+ ativados por Ca^{+2} e canais de K^+ sensíveis ao ATP, na neuroproteção promovida pela GUO nas fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio.

2. JUSTIFICATIVA

Acidentes cérebro-vasculares são uma das principais causas de morte no mundo, com isso vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de encontrar compostos capazes de proteger as células após um dano isquêmico. Apesar disso, dados na literatura demonstram que várias moléculas já foram reportadas como neuroprotetoras frente a um insulto isquêmico em modelos experimentais, porém todas falharam quando testadas clinicamente em humanos (O'Collins et al., 2006). Em vista, disso torna-se relevante o estudo de novos compostos que sejam neuroprotetores frente a insultos isquêmicos.

Em recente estudo em nosso laboratório demonstrou-se um interessante papel da GUO como uma molécula neuroprotetora quando presente no período de reperfusão após a privação de glicose e oxigênio em fatias de hipocampo de ratos. A GUO é um composto endógeno, que é metabolizado pelas células e é reportada como importante molécula trófica no SNC. Além disso, é descrito que a GUO e os demais DG podem modular o sistema glutamatérgico e até mesmo proteger contra a excitotoxicidade do glutamato. Então, sabendo-se do possível potencial neuroprotetor da GUO é importante entender os mecanismos pelos quais a GUO desencadeia este papel em um modelo de isquemia *in vitro*.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar os mecanismos pelos quais a GUO promove proteção celular após a privação de glicose e oxigênio (PGO) e reperfusão em fatias de hipocampo de ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1-** Avaliação do envolvimento de canais de potássio na proteção promovida pela GUO em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO;
- 2-** Avaliar a captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO e tratadas com GUO.
- 3-** Avaliar a expressão da proteína cinase AKT em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO e tratadas com GUO ;

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- MATERIAIS

4.1.1 – Reagentes:

Ácido clorídrico, hidróxido de sódio foram adquiridos da Reagen.

Ácido acético, glicerol, metanol foram adquiridos pela Vetec.

Anticorpo secundário anti IgG de coelho e anticorpo primário anti-AKT total foram adquiridos da Cell signaling.

Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólico (MTT) foi adquirido da Amresco

Albumina sérica bovina (BSA), apamina, anticorpo primário anti-fosfo PKB(AKT) (PSer⁴⁷³), 2-deoxi-glicose, caribdotoxina, glicerol. tetraetilamonium (TEA), guanosina (GUO) adquiridos da Sigma.

Ácido L-Glutâmico, Ponceau, Tris e Tween-20 foram adquiridos da USB.

L-[H³]glutamato foi adquirido da GE Healthcare.

Líquido de cintilação foi adquirido da Perkin Elmer.

Duodecil sulfato de sódio (SDS), glicina, kit para quimioluminescência (ECL), padrão de peso molecular e película Hyperfilm foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech.

Membrana de nitrocelulose adquirida da BioAgency.

Wortmanina adquirida da Alomone.

Soluções reveladora e fixadora foram adquiridos da KODAK.

1.2- Equipamentos:

Agitador magnético, Q-221-2 – Quimis

Banho Maria - Biomatic

Centrífuga, 5415 D – Eppendorf

Cintilador Tri-Carb 1600 TR - Packard

Cuba de eletroforese - Amersham Pharmacia Biotech.

Cuba de eletrotransferência - Amersham Pharmacia Biotech

Espectrofotômetro Ultrospec 3000 - Pharmacia Biotech

Estufa de cultura modelo 002 CB FANEM LTDA

Fatiador de tecidos McIlwain – Brinkmann Laboratory

Leitora de Elisa – Labsystems Multiskan MS

4.2- ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados ratos wistar machos com idade entre 60 a 90 dias. Os animais foram obtidos no Biotério Central da UFSC com o Protocolo de pesquisa número 23080.006902/2003-61 aprovado pela CEUA/UFSC. Os animais foram mantidos no biotério setorial de Neuroquímica do departamento de Bioquímica, em ciclo claro/escuro por 12 horas e a 25 °C com água e ração *ad libitum*.

4.3- PREPARAÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAS

Os animais foram mortos por decapitação e os hipocampus rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) composto por NaCl 1,22mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25

mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH de 7,4. As fatias de 0,4 mm de espessura foram obtidas usando um fatiador de tecidos (McIlwain Tissue Chopper) e pré-incubadas por 30 min a 37 °C (Oliveira et al., 2002).

4.4- MODELO DE ISQUEMIA: PRIVAÇÃO DE GLICOSE E OXIGÊNIO

Para obter-se o modelo de isquemia por privação de glicose e oxigênio (PGO) em fatias hipocampais, a glicose do tampão KRB foi substituída por 10 mM de 2-deoxiglicose (um análogo não utilizável da glicose) e o tampão foi gaseificado com nitrogênio (Pocock & Nichols, 1998). As fatias foram incubadas neste tampão em PGO por 15 minutos. O tampão da PGO foi substituído por tampão KRB gaseificado com carbogênio (fisiológico) e as fatias foram mantidas por um período de 2 horas de reperfusão na presença de ou ausência de GUO (100 µM).

4.1- Tratamento das fatias hipocampais

Para a avaliação do envolvimento dos canais de potássio na neuroproteção promovida pela GUO, os inibidores apamina (300 nM), caribdotoxina (100 nM), glibenclamida (20 µM) e tetraetilamonium (TEA, 1 mM) foram incubados nos grupos controle, 15 min de PGO, 15 min de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na presença de ou ausência de GUO (100 µM). Para a avaliação do envolvimento da via da PI3-K, o inibidor wortmanina (1µM) foi incubado nas mesmas condições.

4.5. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR:

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de 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 em um formazam púrpura após

clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Mosmann, 1983). Após o período de PGO e reperfusão, as fatias hipocâmpais foram incubadas com MTT (0,5 mg/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).

4.6- ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE L- [³H]GLUTAMATO

A captação L-[³H]glutamato foi realizada segundo descrito por Molz et al., 2005. Após a incubação, o meio contendo tampão KRB ou tampão isquêmico foi retirado e as fatias foram incubadas com HBSS (CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, Glicose 2 mM, Hepes 5 mM) ou HBSS colina (para tirar Na⁺, o NaCl e Na₂HPO₄ foram substituídos por Cloreto de colina (137 mM) por 15 min. A captação foi iniciada após a adição de 0,33 µCi/ml L-[³H]glutamato e glutamato não marcado na concentração final de 100 µM, por 7 min. Após esse período o meio foi descartado e as fatias lavadas 2 vezes com HBSS ou HBSS-colina gelados. Em seguida as fatias foram solubilizadas em uma solução de 0,1 N NaOH/0,01% SDS. A determinação do conteúdo intracelular de [³H]L-Glutamato foi avaliada em um contador de cintilação líquida.

4.7- IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS

4.7.1. Preparação da amostras: Após o período de PGO e reperfusão, as fatias foram solubilizadas em tampão de extração de proteínas contendo 4 % SDS, 2 mM EDTA, 8% β-mercaptoethanol, e 50 mM Tris (pH 6.8).

4.7.2. Separação de proteínas: As proteínas (60 µg/poço) foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duoecil sulfato de sódio), utilizando gel de separação de acrilamida 12%, e gel de entrada 4% (Bunn et al., 1995). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 140 mV (para 2 géis) durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

4.7.3. Eletrotransferência e imunodeteccção: As proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45 µm) em tampão Tris-glicina (Tris/HCl 25 mM pH7,0; glicina 192 mM) contendo 20% de metanol, com corrente fixa de 350 mA, 4 °C, por 1 hora e 15 minutos. Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 1 h com leite desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) e a seguir lavadas com TBS-T (Tween-20 0,05 %, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) (Baldo, 1994; Collins & Sim, 1998). Finalmente as membranas foram incubadas com o anticorpo específico anti-fosfo-AKT e anti-AKT total (1:2000 e 1:1000, respectivamente). Para a deteccção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário específico anti-coelho 1:8000 (ligado à peroxidase). Após lavagens com TBS-T, as imunodeteccções foram realizadas pelo método de quimioluminescência (ECL). Os reagentes foram adicionados por 1 minuto sobre as membranas de nitrocelulose e está foi revelada em filme autorradiográfico após a emissão de quimioluminescência, de acordo com as instruções do fabricante. As bandas protéicas imunorreativas foram analisadas por densitometria óptica através da utilização do programa de computador Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD).

4.8-DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O método de Peterson (1977) foi utilizado para dosagem de proteínas das fatias utilizadas na imunodeteccao de proteínas. A dosagem de proteínas para os experimentos de captação de L- [³H]glutamato foi realizado através do método de Lowry et al. (1975).

4.9- 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 $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO NA NEUROPROTEÇÃO PROMOVIDA PELA GUANOSINA

A Guanosina (GUO) é descrita como neuroprotetora em diferentes modelos de excitotoxicidade glutamatérgica (Schmidt et al., 2007). Em estudo prévio realizado em nosso laboratório foi demonstrado por Oleskovicz e colaboradores (2008) que a GUO apresenta efeito neuroprotetor em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO) seguida de reperfusão. Este efeito neuroprotetor da GUO envolve a ativação de canais de potássio. Em vista desses resultados, um dos objetivos de nosso trabalho foi verificar quais os subtipos de canais de potássio que poderiam estar envolvidos na neuroproteção promovida pela GUO.

Iniciamos nosso trabalho confirmando o papel neuroprotetor da GUO frente à PGO. Na figura 3 observamos que as fatias de hipocampo que sofreram PGO por 15 minutos apresentam uma significativa diminuição da viabilidade celular. O grupo que sofreu PGO na presença de GUO (100 μ M) também apresenta uma significativa diminuição de viabilidade, demonstrando que nesse período de incubação a GUO não é capaz de proteger as células. As fatias de hipocampo que após a PGO permaneceram por 2 horas de reperfusão apresentam diminuição da viabilidade celular. Entretanto, quando a GUO é incubada no período de reperfusão após a PGO ela aumenta significativamente a viabilidade celular, demonstrando assim o papel neuroprotetor deste nucleosídeo.

A interrupção do fluxo sanguíneo que ocorre durante um insulto isquêmico resulta em um desbalanço iônico e uma drástica diminuição nos níveis de ATP intracelular (White et al., 2000). Baixos níveis de ATP intracelular podem ativar canais

de potássio sensíveis a ATP, permitindo que esses canais se abram levando a hiperpolarização da membrana celular (Burg et al., 2006). Dessa forma, este subtipo de canal está associado com o metabolismo celular e a manutenção do potencial de membrana. Estudos têm descrito que os canais de potássio sensíveis a ATP podem evocar repostas neuroprotetoras após um insulto isquêmico (Yamada & Inagaki, 2005).

Para avaliar a participação de canais de potássio sensíveis ao ATP foi utilizada a glibenclamida como um bloqueador seletivo deste subtipo de canais (Clapp, 1995). A glibenclamida (20 μ M) incubada durante os 15 min de PGO não altera a diminuição da viabilidade celular. A incubação da glibenclamida 15 min antes da adição de guanosina no grupo reperfusão com GUO não bloqueia o efeito neuroprotetor desta (Figura 4).

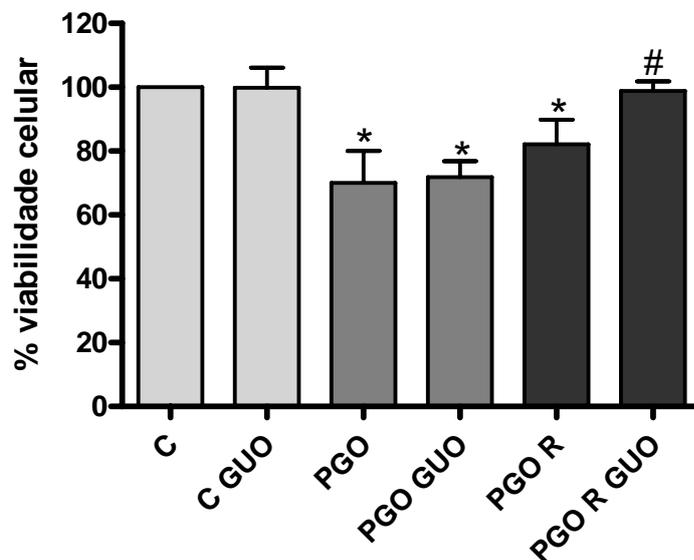


Figura 3: **Avaliação da neuroproteção promovida pela Guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com Guanosina (C GUO) por 15 minutos de PGO (PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na ausência (PGO R) ou presença de guanosina (PGO R GUO). A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do MTT. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. # indica médias diferentes do grupo PGO, PGO GUO e PGO R; $p < 0,05$. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

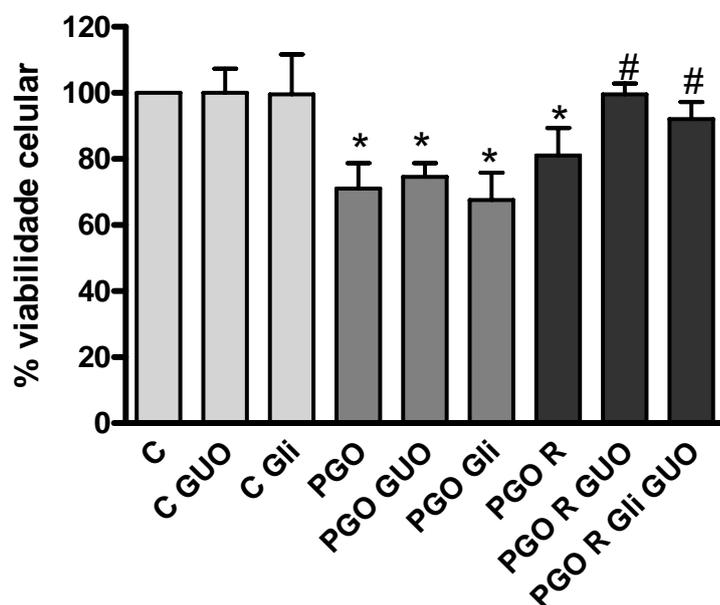


Figura 4: **Avaliação do envolvimento de canais de potássio dependentes de ATP na neuroproteção promovida pela Guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com Guanosina (C GUO) por 15 minutos de PGO (PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperusão na ausência (PGO R) ou presença de guanosina (PGO R GUO). Quando presente a glibenclamida (Gli bloqueador de canal de potássio sensível ao ATP) foi utilizada na concentração de 20 μ M. Na reperusão a Gli foi incubada 15 minutos antes da adição de GUO. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do MTT. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. # indica médias diferentes do grupo PGO, PGO GUO, PGO Gli e PGO R; $p < 0,05$. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

A isquemia cerebral pode resultar em uma liberação excessiva de glutamato e conseqüente hiperativação de receptores de glutamato AMPA e, em especial os do subtipo NMDA, ou ativação indireta de canais de íons Ca^{+2} dependentes de voltagem. Isso resulta em um grande influxo de Ca^{+2} intracelular elevando a concentração desse íon no interior das células (Mattson, 2000).

O aumento do Ca^{+2} intracelular e a despolarização da membrana ativam canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}), possibilitando assim, a saída de íons K^{+} da célula. A ativação dos K_{Ca} resulta em hiperpolarização da membrana e contribui para a regulação da concentração de Ca^{+2} no interior da célula (Sah & Davies et al., 2006)

Com o intuito de investigar a participação dos canais de potássio ativados por Ca^{+2} no papel protetor da guanosina utilizamos um bloqueador que não diferencia os subtipos de canais K_{Ca} , o TEA . O TEA (1 mM) foi incubado nos grupo controle e na PGO não alterando a viabilidade celular. Entretanto, a pré-incubação com TEA 15 minutos antes da adição de guanosina durante a reperfusão inibe a neuroproteção promovida pela guanosina nas fatias submetidas à PGO seguidas de 2 horas de reperfusão (Fig. 5).

Para tentar identificar o subtipo de canal de potássio ativado por Ca^{+2} envolvido no mecanismo de proteção promovida pela GUO, utilizamos bloqueadores seletivos destes subtipos de canais. Primeiramente utilizamos apamina um bloqueador de canais de potássio de baixa condutância ativados por Ca^{+2} (SK). Na Figura 6 observamos que a apamina (300 nM) incubada no grupo controle não altera a viabilidade celular e na PGO não modifica o dano causado por esta. Quando pré-incubada antes da adição de guanosina no grupo reperfusão com GUO, a apamina não altera a neuroproteção promovida pela guanosina.

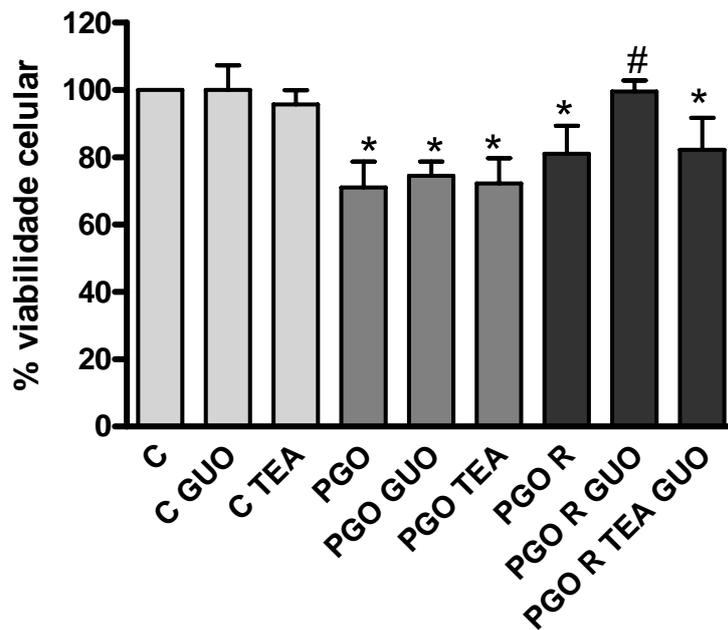


Figura 5: **Avaliação do envolvimento de canais de potássio dependentes de cálcio na neuroproteção promovida pela Guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com Guanosina (C GUO) por 15 minutos de PGO (PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na ausência (PGO R) ou presença de guanosina (PGO + R GUO). Quando presente o TEA (bloqueador não seletivo de canal de potássio ativado por Ca^{+2}) foi utilizado na concentração de 1 mM. Na reperfusão o TEA foi incubado 15 minutos antes da adição de GUO. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do MTT. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. # indica médias diferentes do grupo PGO, PGO GUO, PGO TEA, PGO R e PGO R TEA GUO; $p < 0,05$. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

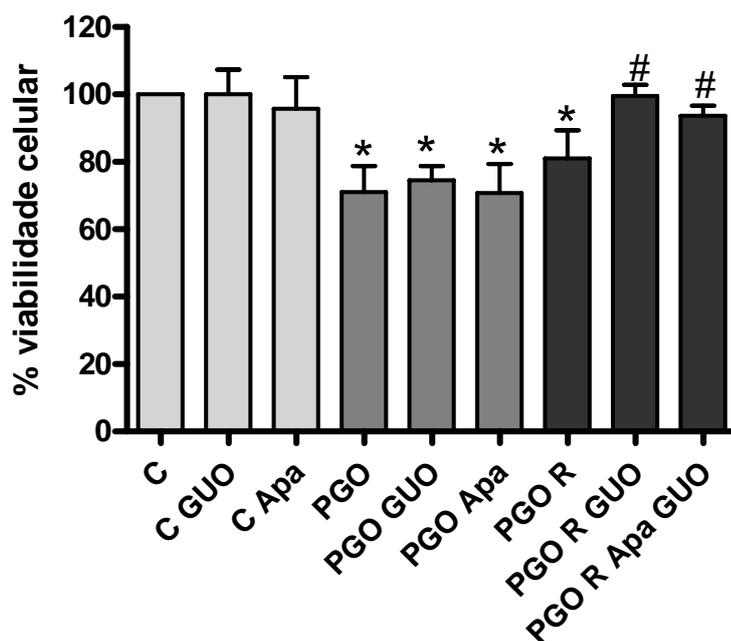


Figura 6: Avaliação do envolvimento de canais de potássio de baixa condutância ativados por Ca^{+2} na neuroproteção promovida pela Guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com Guanosina (C GUO) por 15 minutos de PGO (PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na ausência (PGO R) ou presença de guanosina (PGO + R GUO). Quando presente a Apamina (Apa, bloqueador de canal de potássio de baixa condutância ativado por Ca^{+2}) foi utilizada na concentração de 300nM. Na reperfusão a Apa foi incubada 15 minutos antes da adição de GUO. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do MTT. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. # indica médias diferentes do grupo PGO, PGO GUO, PGO Apa e PGO R; $p < 0,05$. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

Seguindo nossa avaliação, utilizamos a caribdotoxina (100nM), um bloqueador de canal de potássio de alta condutância ativado por Ca^{+2} (BK). A ativação deste subtipo de canais tem sido descrito na literatura como um importante mecanismo de proteção celular frente a um dano isquêmico (Gribkoff et al., 2001). A incubação da caribdotoxina nos grupos controle não altera a viabilidade celular e não modifica o dano causado pelos 15 minutos de PGO. Porém, quando a caribdotoxina foi incubada 15 minutos antes da adição de guanosina durante a reperfusão, ela bloqueia a ação neuroprotetora da guanosina nas fatias de hipocampo submetidas à PGO e reperfusão (Figura 7).

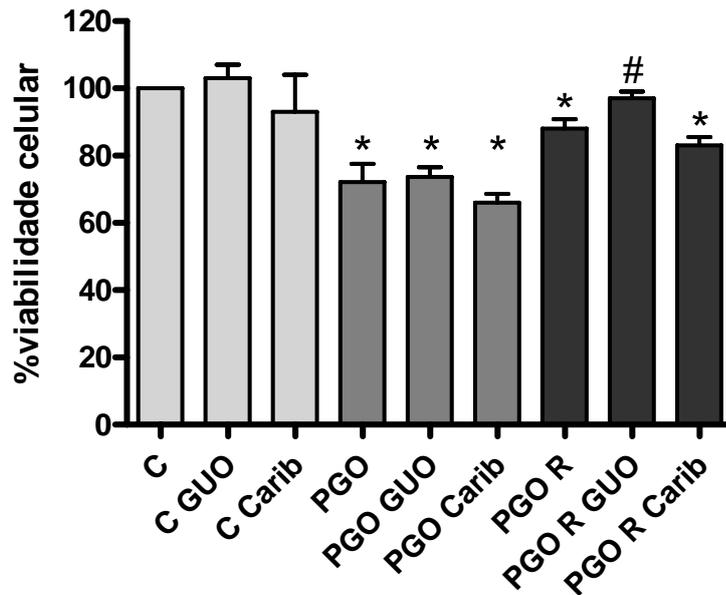


Figura 7: **Avaliação do envolvimento de canais de potássio canal de potássio de alta condutância ativado por Ca^{+2} na neuroproteção promovida pela Guanosina em fatias de hipocampo submetidas à PGO.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com Guanosina (C GUO) por 15 minutos de PGO (PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperusão na ausência (PGO R) ou presença de guanosina (PGO + R GUO). Quando presente a caribdotoxina (Carib, bloqueador seletivo de canal de potássio de alta condutância ativado por Ca^{2+}) foi utilizada na concentração de 100 nM. Na reperusão a Carib foi incubada 15 minutos antes da adição de GUO. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do MTT. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. # indica médias diferentes dos grupos PGO, PGO GUO, PGO Carib, PGO R e PGO R Carib GUO (ANOVA seguido do teste de Duncan).

5.2- AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO TRANSPORTE DE L-GLUTAMATO NA NEUROPROTEÇÃO PROMOVIDA PELA GUANOSINA

A depleção energética e o desbalanço iônico que ocorrem durante um evento isquêmico podem alterar o funcionamento dos transportadores de glutamato localizados na membrana plasmática. Os transportadores de glutamato dependem da atividade de Na^+/K^+ ATPases para manter o gradiente de concentração de íons sódio (Na^+). A retirada do glutamato da fenda sináptica através de sua captação por seus transportadores de alta afinidade e dependentes de Na^+ é importante, pois diminuir os níveis extracelulares de glutamato prevenindo a excitotoxicidade glutamatérgica (Danbolt, 2001).

Está descrito na literatura que a GUO estimula a captação de glutamato em culturas de astrócitos e fatias corticais em condições normais ou excitotóxicas (Frizzo et al., 2001; 2002). Levando em consideração estes achados, avaliamos se o modelo de privação de glicose e oxigênio altera a captação de glutamato nas fatias de hipocampo e possíveis alterações promovidas pela guanosina. Na figura 8 observamos que as fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de PGO apresentam uma significativa diminuição na captação de glutamato quando comparadas ao grupo controle. A adição de GUO (100 μM) durante a PGO não altera a diminuição da captação de glutamato. Quando as fatias são mantidas por 2 horas adicionais de reperfusão observamos que ocorre uma significativa diminuição na captação de glutamato. Entretanto, a presença de GUO durante o período de reperfusão reverte a diminuição da captação de glutamato induzida pela PGO e reperfusão.

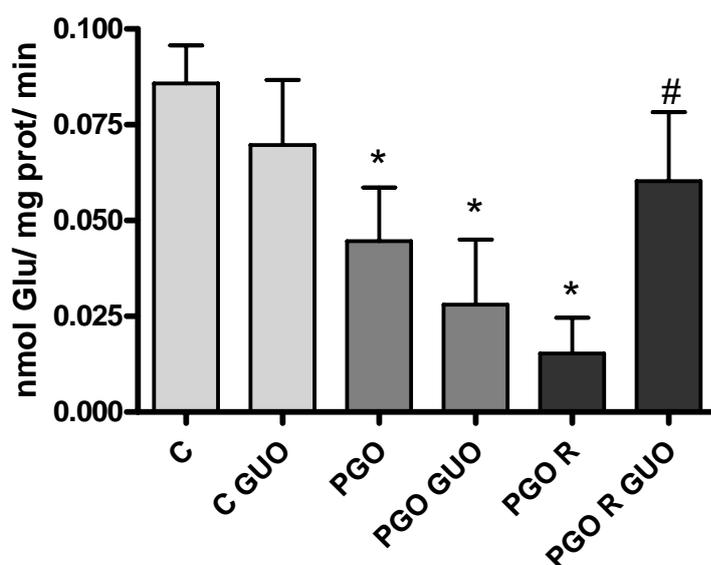


Figura 8: Avaliação do efeito da guanosina sobre a captação de L-[³H]Glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com Guanosina (C GUO) por 15 minutos de PGO (PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperusão na ausência (PGO R) ou presença de guanosina (PGO + R GUO). A captação de L-[³H]Glutamato foi avaliada após 7 minutos de incubação. A radioatividade foi avaliada em um contador para cintilação líquida e os resultados foram expressos em nmol de L-[³H]Glutamato por miligrama de proteína por minuto. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. # indica médias diferentes do grupo PGO, PGO GUO e PGO R; $p < 0,05$. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

Como observamos que a caribdotoxina (bloqueador de canal de potássio de alta condutância ativado por Ca^{+2}) foi capaz de inibir a proteção promovida pela guanosina, verificarmos se este subtipo de canal está relacionado com o aumento da captação de glutamato promovida pela guanosina após a PGO. Na Figura 9 podemos observar que a caribdotoxina incubada no grupo controle não altera a captação de glutamato. Nos grupos PGO, PGO com caribdotoxina e PGO seguidos de 2 horas de reperfusão ocorre uma significativa diminuição da captação de glutamato e essa diminuição é revertida com a adição de GUO durante as 2 horas reperfusão. A pré-incubação com caribdotoxina (100 nM) no período de reperfusão seguida da adição de guanosina reverte o aumento da captação promovida pela GUO nas fatias de hipocampo de ratos.

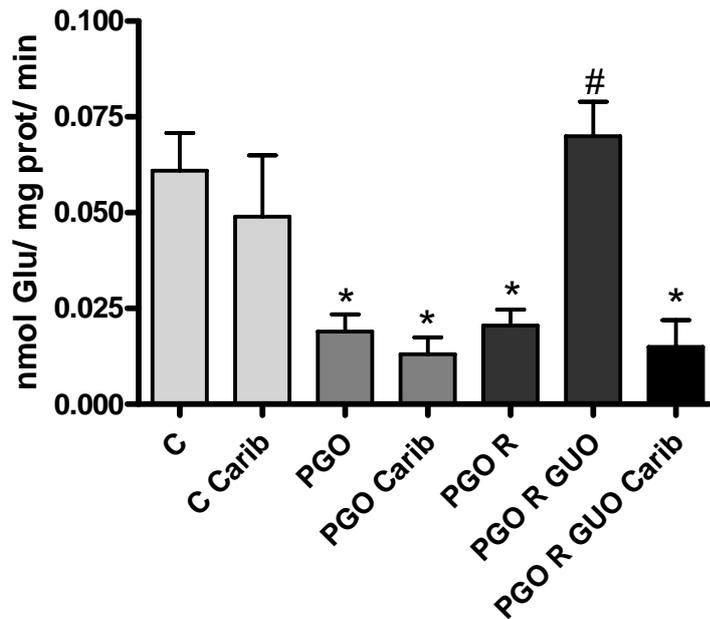


Figura 9: Avaliação do efeito da guanosina e a participação de canais de potássio de alta condutância ativado por Ca^{+2} sobre a captação de $\text{L}[\text{}^3\text{H}]\text{Glutamato}$ em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com Guanosina (C GUO) por 15 minutos de PGO (PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperusão na ausência (PGO R) ou presença de guanosina (PGO + R GUO). Quando presente a caribdotoxina (Carib, bloqueador seletivo de canal de potássio de alta condutância ativado por Ca^{2+}) foi utilizada na concentração de 100 nM. Na reperusão a Carib foi incubada 15 minutos antes da adição de GUO. A captação de $[\text{}^3\text{H}]\text{L-Glutamato}$ foi avaliada após 7 minutos de incubação. A radioatividade foi avaliada em um contador para cintilação líquida e os resultados foram expressos em nmol de $\text{L-}[\text{}^3\text{H}]\text{Glutamato}$ por miligrama de proteína por minuto. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. # indica médias diferentes do grupo PGO, PGO R, PGO Carib e PGO R Carib GUO ; $p < 0,05$. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

O estudo realizado por Oleskovicz e colaboradores (2008) demonstrou que o efeito protetor da GUO em fatias de hipocampo submetidas à PGO envolve a participação da via de sinalização celular da PI3-K. Sabendo que a via da PI3-K é uma via de sinalização celular relacionada com sobrevivência, e sabendo que GUO depende dessa via para exercer seu efeito protetor verificamos o envolvimento da PI3-K na captação de glutamato.

Para realizar essa avaliação utilizamos a wortmanina um inibidor da via da PI3-K. Os grupos PGO, PGO na presença de wortmanina (1 μ M) e PGO seguida de reperusão apresentam diminuição significativa na captação de glutamato. A GUO presente no período de reperusão recupera a diminuição da captação de glutamato induzida pela PGO e reperusão. Entretanto, a pré-incubação com wortmanina seguida da adição de GUO na reperusão bloqueia o aumento de captação de glutamato promovida pela GUO (Fig. 10).

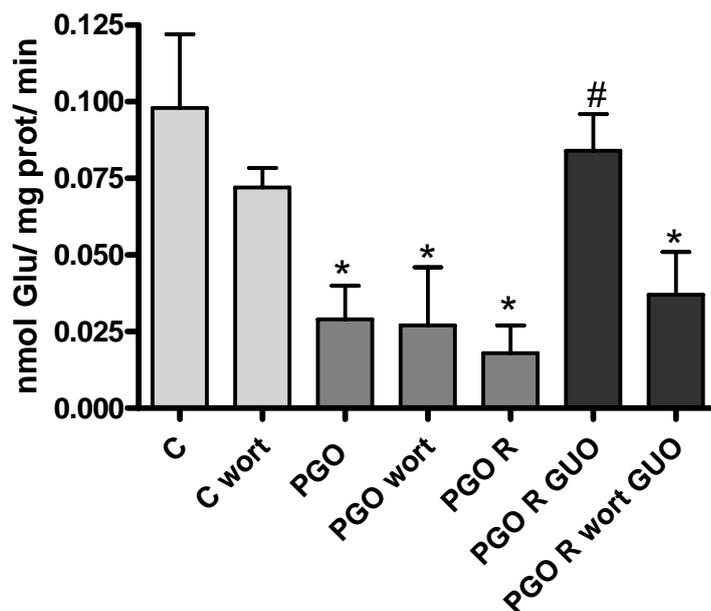


Figura 10: Avaliação do efeito da guanosina e a participação da via da PI3-K sobre a captação de L-[³H] Glutamato em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com Guanosina (C GUO) por 15 minutos de PGO (15 PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na ausência (PGO R) ou presença de guanosina (15 PGO + R GUO). Quando presente a Wortmanina (Wort, inibidor da via da PI3-K) foi utilizada na concentração de 1 μ M. Na reperfusão a Wort foi incubada 15 minutos antes da adição de GUO. A captação de [³H]L-Glutamato foi avaliada após 7 minutos de incubação. A radioatividade foi avaliada em um contador para cintilação líquida e os resultados foram expressos em nmol de L-[³H]Glutamato por miligrama de proteína por minuto. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. # indica médias diferentes dos grupos PGO, PGO wort, PGO R e PGO R wort GUO (ANOVA seguido do teste de Duncan).

Neste trabalho observamos que a inibição da PI3-K está envolvida no aumento de captação de glutamato promovido pela GUO, assim fomos verificar se a GUO pode modular a fosforilação da proteína alvo da PI3-K, a AKT.

Na figura 11 observamos a imunorreatividade para a proteína AKT (AKT total) e sua forma ativada, ou seja, fosforilada na serina-473 (fosfo-AKT, pAKT). Observamos que os grupos submetidos à PGO, PGO na presença de GUO ou na presença de caribdotoxina apresentam uma significativa diminuição nos níveis de fosfo-AKT em relação ao grupo controle. Quando a GUO é adicionada ao período de reperfusão os níveis de fosforilação da AKT retornam aos níveis de controle. Esse aumento pode envolver a participação dos canais BK, visto que a incubação com caribdotoxina antes da adição de GUO no período de reperfusão reverte o aumento dos níveis de fosfo-AKT promovido pela GUO.

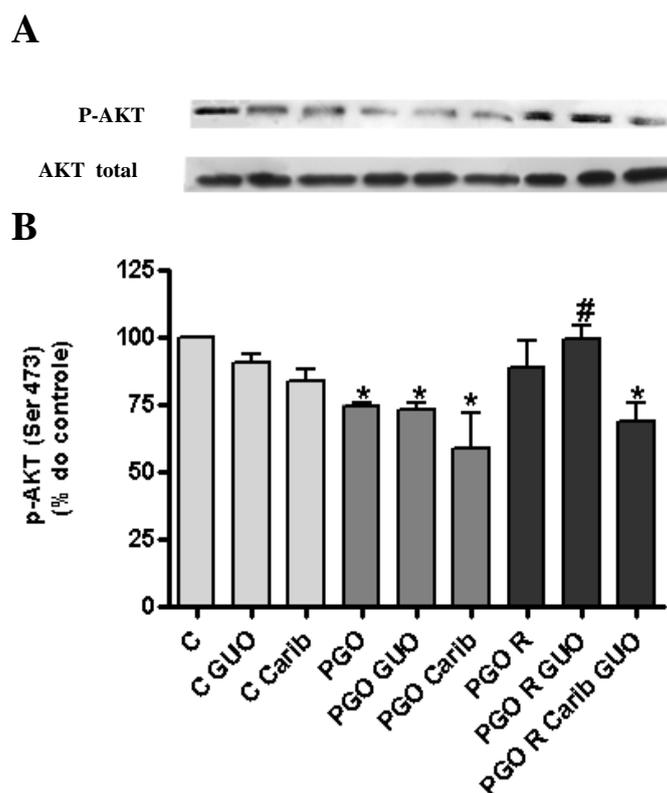


Figura 11: **Avaliação da expressão de p-AKT em fatias de hipocampo submetidas à PGO.** Fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com Guanosina (C GUO) por 15 minutos de PGO (15 PGO) e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão na ausência (PGO R) ou presença de guanosina (15 PGO R GUO). Foi utilizado a caribdotoxina (100nM, bloqueador seletivo de canal de potássio de alta condutância ativado por Ca^{2+}). Após a incubação realizou-se a imunodeteção da proteína p-AKT, conforme descrito nos Materiais e Métodos. A. Figura representativa da imunodeteção de p-AKT e AKT total. B. Quantificação da imunorreatividade de p-AKT. Os valores representam a média \pm erro da média de 4 experimentos realizados em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$. # indica médias diferentes dos grupos PGO, PGO GUO, PGO Carib e PGO R Carib GUO (ANOVA seguido do teste de Duncan).

6. DISCUSSÃO

O cérebro consome grandes quantidades de oxigênio e glicose e isso se deve ao fato de que os neurônios dependem quase que exclusivamente da glicólise aeróbica para obter ATP (Doyle et al., 2008). Quando o fluxo sanguíneo cerebral é interrompido há uma diminuição da oferta de glicose e oxigênio no cérebro o que resulta em uma rápida disfunção metabólica, especialmente em células neuronais. Este evento é denominado isquemia cerebral e é caracterizado por uma severa degeneração das células e conseqüente perda das funções cerebrais (Mattson, 2000).

Neste estudo utilizamos como modelo de isquemia a privação de glicose e oxigênio (PGO) em fatias de hipocampo de ratos. Neste tipo de preparação, a citoarquitetura e a organização da matriz extracelular são mantidas, criando um microambiente *in vitro* onde as conexões entre células neuronais e gliais são conservadas (Gong et al., 2001; Molz et al., 2008). Além disso, o hipocampo é utilizado por ser a área mais susceptível do sistema nervoso central à isquemia, sendo que os neurônios da área CA1 são os mais vulneráveis (Schmidt-Kastner & Freund, 1991).

O estudo de compostos que possam minimizar os efeitos da isquemia cerebral é de grande relevância, sabendo-se que essa patologia é uma das principais causas de morte no mundo. Neste estudo utilizamos um derivado da guanina, o nucleosídeo guanosina, como possível agente neuroprotetor frente a um modelo de isquemia.

Evidências na literatura têm demonstrado o papel neuroprotetor dos DG e da guanosina frente a insultos excitotóxicos (Schmidt et al., 2007). A administração crônica de guanosina (GUO) *in vivo* previne o aparecimento de crises convulsivas e morte celular em modelos de excitotoxicidade glutamatérgica (Lara et al, 2001; Vinadé

et al, 2003). Em estudos *in vitro* já é demonstrado que o papel neuroprotetor da GUO frente à PGO em fatias de córtex e fatias de hipocampo (Frizzo et al, 2002; Oleskovicz et al., 2008). Em modelo de isquemia *in vivo* a GUO é capaz de diminuir o volume de infarto induzido pela oclusão da artéria média cerebral (Chang et al., 2008).

Com isso, nosso primeiro passo neste estudo foi avaliar o potencial neuroprotetor da GUO frente à PGO. As fatias de hipocampo que foram submetidas à PGO apresentam significativa morte celular, sendo que quando essas fatias são mantidas por 2 horas de reperfusão após a PGO não é observada uma melhora na viabilidade dessas células. Quando incubamos as fatias na presença da GUO durante a PGO, a GUO não é capaz de promover proteção. Entretanto quando a GUO é adicionada ao meio no período de reperfusão foi observada uma significativa melhora da viabilidade celular (Fig 3). Esses dados são interessantes, visto que 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. Assim, é importante a utilização de compostos que sejam neuroprotetores durante este período assim como a GUO demonstra ser.

No estudo realizado por Oleskovicz e colaboradores (2008), foi demonstrado que a utilização de um bloqueador de canal de potássio, 4-AP, inibiu o efeito neuroprotetor promovido pela GUO, demonstrado assim a participação dos canais de potássio no mecanismo de proteção promovido pela GUO em fatias de hipocampo submetidas à PGO. Além disso, foi demonstrado que a GUO aumenta a expressão de canais de K^+ retificadores de voltagem em culturas de astrócitos corticais (Benfenati

2006). Estes resultados nos motivaram a estudar o envolvimento dos canais de potássio no mecanismo de proteção promovido pela GUO.

Os canais de K^+ são canais iônicos que permitem a passagem deste cátion através da membrana celular. Esses canais normalmente se abrem após a despolarização da membrana permitindo que os íons K^+ fluam para o espaço extracelular e ocorra a hiperpolarização da membrana.

Em um evento isquêmico onde ocorre uma grande entrada de íons Ca^{2+} na célula, através da hiperativação de receptores do tipo NMDA, observa-se uma grande despolarização da membrana celular e uma drástica diminuição dos níveis de ATP intracelular (White et al., 2003). A associação desses dois fatores, despolarização da membrana e diminuição dos níveis de ATP, pode ativar uma subclasse de canais de potássio conhecidos como canais de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) (Burg et al., 2006).

A ativação dos canais de K_{ATP} tem sido descrita na literatura como um importante mecanismo de neuroproteção após um dano isquêmico (Yamada & Inagaki, 2005). A abertura dos canais de K_{ATP} é responsável por grande parte da hiperpolarização da membrana celular que ocorre após um insulto isquêmico, em especial na região CA1 do hipocampo (Fugimura et al., 1997). Animais que não expressam a subunidade Kir6.2 associada ao canal K_{ATP} , determinante para o funcionamento desses canais iônicos, apresentam maior susceptibilidade à PGO e à isquemia *in vivo* tanto no córtex cerebral como no hipocampo (Sun et al., 2007; 2006). Esses dados demonstram a importância dos canais K_{ATP} como possíveis alvos na neuroproteção após uma isquemia cerebral, assim, a ativação desses canais de K_{ATP} poderia estar relacionado com o efeito protetor da GUO. Na figura (4) podemos observar que a utilização de um bloqueador desse subtipo de canal, a glibenclâmida (20

μM), não inibe o efeito neuroprotetor da GUO. Demonstrando assim, que o mecanismo pelo qual a GUO exerce seu papel protetor nas fatias de hipocampo não envolve a participação dos canais K_{ATP} . Outros subtipos de canais de K^+ podem estar relacionado coma neuroproteção promovida pela GUO.

Além da diminuição dos níveis de ATP intracelular, o dano isquêmico leva a um grande influxo de íons Ca^{2+} , aumentando a concentração intracelular desse íon a níveis patológicos podendo gerar morte celular. O aumento dos níveis de Ca^{2+} na célula pode ativar proteases, lipases e DNAses resultando em morte celular (Doyle et al.,2008), além de modular a atividade de canais iônicos, entre eles os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} . Esses canais se abrem em resposta a um aumento da concentração de Ca^{2+} no interior da célula permitindo que os íons K^+ fluam para o meio externo. Com o intuito de avaliar a participação dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} na neuroproteção promovida pela GUO foi utilizado o TEA, um bloqueador desse subtipo de canal. A utilização do TEA nas fatias que foram submetidas à PGO e posteriormente mantidas em reperfusão foi capaz de inibir o efeito neuroprotetor da GUO (Fig5).

A utilização de um inibidor de canal de K^+ de baixa condutância ativados por Ca^{2+} , apamina, não foi capaz de bloquear o efeito neuroprotetor da GUO, entretanto a avaliação da participação dos canais de K^+ de alta voltagem ativado por Ca^{+2} (BK) na neuroproteção promovida pela GUO demonstrou que a utilização da caribdotoxina, um bloqueador seletivo de canais BK, inibe o efeito neuroprotetor promovido pela GUO. Os canais BK estão envolvidos com a regulação da liberação de neurotransmissores no terminal pré-sináptico (Raffaelli et al., 2004). Além disso, como esses canais se abrem em resposta a um aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular permitindo o fluxo de íons K^+ para fora da célula esses canais iônicos podem ser importantes alvos de proteção celular (Ghatta et al., 2006). Como já é descrito na literatura, após um insulto

isquêmico pode ocorrer uma massiva liberação de glutamato para a fenda sináptica e um significativo aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular. Então a utilização da GUO no período de reperfusão após a PGO poderia estar diminuindo a liberação de glutamato para fenda sináptica através da modulação da atividade dos canais BK e dessa forma protegendo as fatias de hipocampo submetidas ao insulto. Além disso, a modulação dos canais BK poderia estar diminuindo os níveis de Ca^{2+} na célula o que por sua vez diminuiria a produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio e a ativação de enzimas intracelulares relacionadas com a morte celular. Outro mecanismo pelo qual a GUO poderia exercer seu efeito neuroprotetor é a modulação da captação de glutamato, visto que a captação de glutamato é favorecida pela hiperpolarização da membrana (Danbolt, 2001). Como mencionado acima, a abertura dos canais BK favorece a hiperpolarização da membrana celular, dessa forma a modulação desses canais pela GUO poderia favorecer a captação de glutamato nas fatias que sofreram o dano isquêmico. Para verificar isso primeiro fomos avaliar se a GUO altera a captação de glutamato em nosso modelo de isquemia.

A retirada de glutamato da fenda sináptica através da captação desse neurotransmissor é um processo crucial para manter as concentrações de glutamato abaixo do seu nível tóxico, isso tanto em condições fisiológicas como em condições de excitotoxicidade (Danbolt, 2001). Em casos de depleção energética, como a que ocorre na isquemia cerebral, o gradiente iônico é interrompido e a regulação da captação de glutamato é perdida, resultando em um aumento dos níveis extracelulares de glutamato (Camacho & Massieu, 2006). A utilização de substâncias que modulem a captação de glutamato pode ser um importante mecanismo de neuroproteção (Schmidt et al., 2007). Já foi demonstrado que a GUO pode aumentar a captação de glutamato em fatias de córtex em condições basais ou após a PGO (Frizzo et al., 2002). Além disso, a GUO é

capaz de prevenir a diminuição de captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos neonatos expostos a hipóxia (Moretto et al., 2005).

De acordo com o descrito na literatura, demonstramos neste trabalho que a GUO é capaz de reverter a diminuição da captação de glutamato induzida pela PGO e reperusão (figura 8). Os transportadores de glutamato são vulneráveis ao aumento das espécies reativas de oxigênio que ocorrem no período de reperusão (Trotti et al., 1998), causando uma diminuição na captação de glutamato (Brongholi et al., 2006). Nós observamos que as fatias que foram submetidas à PGO, ou à PGO seguidas de reperusão, apresentam significativa diminuição na captação de glutamato e isso corrobora com os dados de viabilidade celular, onde esses mesmos grupos apresentam diminuição de viabilidade em relação ao controle (figura 3). GUO é capaz de promover neuroproteção e aumento da captação de glutamato nas fatias submetidas a estas condições (figura 8). Pode-se dizer então, que a proteção promovida pela GUO está relacionada com sua capacidade de aumentar a captação de glutamato. Se este efeito está relacionado unicamente ao aumento da atividade dos transportadores, ou se também envolve alterações na expressão destes transportadores, é um aspecto que deve ser investigado. Alternativamente, é possível que a GUO participe de mecanismos de redução da liberação de glutamato, seja pela atividade reversa de seus transportadores induzida pela isquemia (Bonde et al., 2003), ou pela redução da liberação vesicular (Tasca et al., 2004). Este efeito apresentado pela GUO é de grande relevância, visto que, a massiva liberação de glutamato, e conseqüentemente seu acúmulo na fenda sináptica que ocorre na isquemia, é uma das principais causas de morte celular decorrente deste evento (White et al., 2003; Camacho & Massieu, 2006).

Para melhor entender o mecanismo de proteção promovido pela GUO, estudamos a participação dos canais BK na modulação da captação de glutamato

promovida pela GUO. Quando utilizamos um inibidor dos canais BK durante o período de reperfusão e adicionamos GUO ao meio, observamos que a GUO não reverte a diminuição da captação de glutamato induzida pela PGO e reperfusão (figura 9). A abertura de canais BK em células que sofreram isquemia pode minimizar a entrada de Ca^{2+} na célula, diminuindo a despolarização da membrana e regulando a concentração de íons Ca^{2+} , além disso, a abertura desses canais é neuroprotetora em modelo agudo de isquemia cerebral (Gribkoff et al., 2001). Já foi demonstrado, que a utilização de drogas que abrem os canais BK presentes na membrana mitocondrial, diminuem a produção de espécies reativas de oxigênio produzidas no complexo 1 da cadeia respiratória (Kulaiwak et al., 2008). Considerando que a GUO estaria modulando este subtipo de canais de potássio, a conseqüente regulação das concentrações de Ca^{2+} na célula e uma possível diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio, contribuiria para reverter a vulnerabilidade dos transportadores de glutamato ao dano oxidativo. Além disso, como a manutenção do gradiente iônico transmembrana é fundamental para que ocorra captação de glutamato (Danbolt, 2001), a modulação dos canais BK pela GUO favoreceria o restabelecimento do gradiente iônico e conseqüente funcionalidade dos transportadores de glutamato.

O efeito neuroprotetor da GUO pode ser mediado pela ativação de vias de sinalização relacionadas com sobrevivência celular, entre elas a PI3-K (Oleskovicz et al., 2008). A via de sinalização da PI3-K-AKT é classicamente descrita como uma via de sobrevivência celular (Song et al., 2005). Ativação da PI3-K por fatores de crescimento leva à formação de segundos-mensageiros intracelulares que são responsáveis pela ativação da AKT (Franke et al., 1997). A atividade da AKT é modificada em insultos isquêmicos, dados na literatura demonstram que a fosforilação da AKT diminui logo após a oclusão das carótidas (Ouyang et al., 1999), porém 3 a 8

horas depois da oclusão é observado um aumento da fosforilação da AKT na região de penumbra (Kitagawa et al., 1999) e este aumento está relacionado com a proteção de células neuronais nessa região (Noshita et al., 2001).

Como observamos que o mecanismo de neuroproteção promovido pela GUO envolve o aumento da captação de glutamato, utilizamos um inibidor específico da PI3-K, a wortmanina, no estudo da captação de glutamato em nosso modelo de isquemia. Na figura 10 observamos que o aumento na captação de glutamato promovida pela GUO nas fatias que sofreram PGO e reperusão é abolido na presença do inibidor da PI3K. Alguns dados na literatura têm demonstrado que a via da PI3-K pode modular a captação de glutamato (Nieoullon et la., 2006). A via da PI3-K está relacionada com o aumento de captação e expressão do transportador EAAC1 promovido pelo fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (Sims et al., 2000). Já tem sido reportado na literatura, que o envolvimento da via da PI3K no trafico dos transportadores do citoplasma para a membrana envolve a ativação de AKT, o que resulta em aumento da expressão de transportadores endógenos de glutamato EAAC1/EAAT3 e, além disso, aumento a captação de glutamato (Krizman-Genda et al., 2005). Em estudo realizado por Guillet e colaboradores (2005) foi demonstrado que a inibição da via da PI3-K diminui a captação de glutamato e que essa via está em envolvida com a regulação da expressão dos transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1 na superfície celular. Assim, o aumento da captação de glutamato promovido pela GUO, envolve a ativação da via da PI3-K, que por sua vez estaria modulando a atividade dos transportadores de glutamato ou aumentando a expressão desses transportadores na membrana celular.

A ativação de AKT pela GUO em eventos de neuroproteção já foi demonstrado na literatura. A GUO protege astrócitos tratados com staurosporina (indutor de apoptose) através do aumento dos níveis de fosforilação da proteína AKT (Di Iorio et

al., 2004). A GUO também diminui a apoptose induzida pelo peptídeo beta-amilóide em cultura de neuroblastomas humanos através da ativação da PI3-K e aumento dos níveis fosforilação da proteína AKT. Em recente estudo, foi demonstrado que a GUO diminui a inflamação e expressão de proteínas pró-inflamatórias em cultura de células da micróglia e este efeito está relacionado com a ativação da via da PI3-K (D'Alimonte et al., 2007). Corroborando com estes estudos, demonstramos que a GUO aumenta a ativação da AKT nas fatias de hipocampo submetidas à PGO e reperfusão, confirmando que o mecanismo de neuroproteção da GUO frente a diferentes danos celulares envolve a ativação da proteína AKT.

Resumidamente, a GUO é neuroprotetora em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO e reperfusão. O mecanismo pelo qual a GUO promove neuroproteção envolve o aumento de captação de glutamato, que é mediado pela modulação de canais de K^+ de alta condutância ativados por Ca^{+2} e ativação da via da PI3-K. Além disso, a GUO promove aumento da expressão da proteína fosto-AKT resultando em proteção celular.

7. CONCLUSÕES

- 1- A GUO é neuroprotetora no modelo de isquemia *in vitro*, quando está presente no meio de incubação no período de reperfusão após os 15 minutos de PGO.
- 2- O papel neuroprotetor da GUO não envolve a participação de canais de K^+ sensíveis ao ATP e canais de K^+ de baixa condutância ativados por Ca^{+2} .
- 3- A presença do bloqueador de canais de K^+ de alta condutância ativados por Ca^{+2} (BK) inibe o efeito neuroprotetor da GUO, demonstrando assim a participação desses canais na proteção promovida pela GUO.
- 4- A GUO reverte a diminuição da captação de glutamato promovido pela PGO e reperfusão, demonstrando que o mecanismo de neuroproteção da GUO envolve a modulação do transporte de glutamato.
- 5- O aumento da captação de glutamato promovida pela GUO é inibida na presença de bloqueador de canais BK.
- 6- A inibição da via da PI3-K bloqueia a recuperação da captação de glutamato promovida pela GUO nas fatias que sofreram PGO seguidas de reperfusão.
- 7- A GUO é capaz de aumentar os níveis de fosforilação da proteína AKT nas fatias que foram submetidas à PGO e reperfusão. Este efeito é revertido na presença de um bloqueador seletivo de canais de K^+ de alta condutância ativados por Ca^{+2} .

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, C. M.; BRIDGES, R. J.; CHAMBERLIN, A. R.; SHIMAMOTO, K.; YASUDA-KAMATAMI, Y.; SWANSON, R. A. "Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal". J. Neurochem. 79: 1207-1216, 2001.

BALDO, B.A. "Protein blotting: research, applications and its place in protein separation methodology" In: Advances in Electrophoresis, ed. by A. Chranbach, M.D. Dunn and B.J. Radola, v.7, p.407-478, VCH, 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(2):430-45, 2006.

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.

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(1):211-8, 2006.

BUNN, S.J.; SIM, A.T.R.; HERD, L.M.; AUSTIN, L.M.; DUNKLEY, P.R.. "Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of intracellular calcium in the Ser⁸, Ser¹⁹, Ser³¹ and Ser⁴⁰". J. Neurochem. v. 64, p.1370-1378,1995.

BURG, E.D., REMILLARD, C.V., YUAN, J.X.J "K⁺ channels in apoptosis". J. Membrane Biol 209: 3-20, 2006.

CAMACHO, A. & MASSIEU, L. "Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia its relation to neuronal death". Arch. Med. Research. 37: 11-18, 2005.

CARDONE, M.H., ROY, N., STENNICKE, H.R., SALVESEN, G.S., FRANKE, T.F., STANBRIDGE, E., FRISCH, S., REED, J.C. "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation" Science 282: 1318-1321, 1998.

CASTRO-GAGO, M., CAMINA, F., LOJO, S., RODRIGUES-SEGADE, S., RODRIGUEZ NUNES, A. "Concentrations of purine nucleotides and purines pyrimidine bases in cerebrospinal fluid of neurologically healthy children" . Eur J Clin Chem Clin Biochem 30:761-765.

CHANG, R., ALGIRD, A., BAU, C., RATHBONE, M.P., JIANG, S. "Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo". Neurosci Lett. 431:101-5, 2008.

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, 1999.

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

CLAPP, L.H. "Regulation of glibenclamide-sensitive K⁺ current by nucleotide phosphates in isolated rabbit pulmonary myocytes". Cardiovasc Res. 30:460-8, 1995.

COLLINS, E. & SIM, A.T.R. "Regulation of neuronal PP1 and PP2 during development Methods". Mol. Biol. 38, p.21-43, 1998.

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

D'ALIMONTE, I., FLATI, V., D'AURO, M., TONIATO, E., MARTINOTTI, S., RATHBONE, M.P., JIANG, S., BALLERINI, P., DI IORIO, P., CACIAGLI, F., CICCARELLI, R. "Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells" J Immunol 178: 720-731, 2007.

DATTA, S.R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y., GREENBERG, M.E. "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery" Cell 91: 231-141, 1997.

DECKER, H., FRANCISCO, S.S., MENDES-DE-AGUIAR, C.B., ROMÃO, L.F., BOECK, C.R., TRENTIN, A.G., MOURA-NETO, V., TASCA, C.I. "Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture". J Neurosci Res. 85:1943-51,2007.

DEV, K.H., ROBERTS, P.J., HENLEY, J.M. "Characterisation of the interaction between guanyl nucleotides and AMPA receptors in rat brain". Neuropharmacology 35: 1583-1593, 1996.

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;46:356-368, 2004.

DOYLE, K.P, SIMON R.P., STENZEL-POORE M.P. " Mechanisms of ischemic damage". Neuropharmacology 55: 310-318, 2008.

ENDO H., NITO C., KAMADA H., NISHI T., CHAN P.H. "Activation of the Akt/GSK3beta signaling pathway mediates survival of vulnerable hippocampal neurons after transient global cerebral ischemia in rats". J Cereb Blood Flow Metab. 26(12):1479-89, 2006.

FABER, E.S., SAH, P. "Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function". Neuroscientist. 9:181-94, 2003.

FRANKE, T.F., KAPLAN, D.R., CANTLEY, L.C. "PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis" Cell 88:435-437, 1997.

FRIZZO, M.E.S.; LARA D.R.; DAHM, K.C.S.; PROKOPIUK, A.S.; SWANSON R.; SOUZA, DO. "Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures". Neuroreport 12: 1-3, 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. "Contribution of ATP-sensitive potassium channels to hypoxic hyperpolarization in rat hippocampal CA1 neurons in vitro" J. Neurophysiol 77: 378-385, 1997.

FUKUNAGA, K., KAWANO, T., "Akt is a molecular target for signal transduction therapy in brain ischemic insult" J Pharmacol Sci 92: 317-327, 2003.

GHATTA, S., NIMMAGADDA, D., XU, X., O'ROURKE, S.T. "Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications" Pharmacol Ther. 110:103-16, 2006.

GUILLET, B.A., VELLY, L.J., CANOLLE, B., MASMEJEAN, F.M., NIEOULLON, A.L., PISANO, P. "Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures". Neurochem Int. 46:337-46, 2005.

GONG, C.X., LIDSKY, T., WEGIEL, J., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K. "Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain". Brain Res Brain Res Protoc. 6:134-140, 2001.

GRIBKOFF VK, STARRETT JE JR, DWORETZKY SI, HEWAWASAM P, BOISSARD CG, COOK DA, FRANTZ SW, HEMAN K, HIBBARD JR, HUSTON K,

JOHNSON G, KRISHNAN BS, KINNEY GG, LOMBARDO LA, MEANWELL NA, MOLINOFF PB, MYERS RA, MOON SL, ORTIZ A, PAJOR L, PIESCHL RL, POSTMUNSON DJ, SIGNOR LJ, SRINIVAS N, TABER MT, THALODY G, TROJNACKI JT, WIENER H, YELESWARAM K, YEOLA SW. "Targeting acute ischemic stroke with a calcium-sensitive opener of maxi-K potassium channels". Nat Med. 2001 7 :471-477, 2001.

GYSBERS, J .W.; GUARNIERI, S.; MARIGGIÒ, M .A.; PIETRANGELO, T.; FANÒ, 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.

HU, H., SHAO, L.R., CHAVOSHY, S., GU, N., TRIEB, M., BEHRENS, R., LAAKE, P., PONGS, O., KNAUS, H.G., OTTERSEN, O.P., STORM, J.F. "Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release". J Neurosci. 15:9585-97, 2001.

HUANG, L., LI, W., LI, B., ZOU, F. "Activation of ATP-sensitive K channels protects hippocampal CA1 neurons from hypoxia by suppressing p53 expression". Neurosci Lett. 398:34-38, 2006.

HUETTNER, J.E. "Kainate receptors and synaptic transmission". Prog Neurobiol. 70:387-407, 2003.

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

KITAGAWA, H., WARITA ,H., SASAK,I C., ZHANG, W.R., SAKAI, K., SHIRO, Y., MITSUMOTO, Y., MORI, T., ABE, K. "Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain". Neurosci Lett. 2741:45-48,1999.

KRIZMAN-GENDA, E., GONZÁLEZ, M.I., ZELENIAIA, O., ROBINSON, M.B. "Evidence that Akt mediates platelet-derived growth factor-dependent increases in

activity and surface expression of the neuronal glutamate transporter, EAAC1”. Neuropharmacology. 49:872-882, 2005.

KULAWIAK, B., KUDIN, A.P., SZEWCZYK, A., KUNZ, W.S. “BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria”. Exp Neurol. 212:543-547,2008

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.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. “Protein measurement with the Folin phenol reagent”. J. Biol. Chem. v.193, p.265-275, 1951.

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

MATTSON, M.P. “Apoptosis in neurodegenerative disorders”. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 1:120-129, 2000.

MATTSON, M.P. “Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders”. Neuromolecular Med. 3(2):65-94, 2003.

MATTSON, M.P. “Calcium and neurodegeneration” Aging Cell. 6(3):337-50, 2007.

MELDRUM B.S. “Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology”. Nutr. 130(4S Suppl):1007-1015, 2000.

MOLZ, S.; DECKER, H.; OLIVEIRA, I.J.L.; SOUZA, D.O.; TASCA, C.I. “Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevent by GMP”. Neurochem. Res. 30:83-89, 2005.

MOLZ, S., DECKER, H., DAL-CIM, T., CREMONEZ, C., CORDOVA, F.M., LEAL, R.B., TASCA, C.I. "Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling" Neurochem Res. 33:27-36, 2008.

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.

MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity". J Immunol Meth. 65, 55-63,1983.

MULLER, C. E. & SCIOR, T "Adenosine receptors and their modulators." Pharm Acta Helv 68: 77-111, 1993.

NEARY, J. T.; RATHBONE, M.P.; CATTABENI, F.; ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G. "Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells." Trends Neurosci 19: 13-8,1996.

NIEOULLON, A., CANOLLE, B., MASMEJEAN, F., GUILLET, B., PISANO, P., LORTET, S. " The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse?" J Neurochem. 98:1007-1018, 2006.

NOSHITA, N., LEWÉN, A., SUGAWARA, T., CHAN ,P.H. "Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice." J Cereb Blood Flow Metab. 21:1442-50,2001.

O'COLLINS V.E., MACLEOD M.R., DONNAN G.A., HORKY L.L., VAN D.E.R.
WORP B.H., HOWELLS D.W. "1,026 experimental treatments in acute stroke" Ann
Neurol. 59(3):467-77,2006 .

OLESKOVICZ S.P., MARTINS W.C., LEAL R.B., TASCA C.I. "Mechanism of
guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-
glucose deprivation". Neurochem Int. 52: 411-418, 2008.

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.

OLIVEIRA, D.L., HORN, J.F., RODRIGUES, L.M., FRIZZO, M.E. MORIGUCHI, E.,
SOUZA, D.O. "Quinolinic acid promotes seizures and decrease glutamate uptake in
young rats: reversal by orally administered guanosine". Brain Res 1018: 48-54, 2004.

OLNEY, J. W. "Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders". Ann. Rev.
Pharmacol. Toxicol. 30: 47-71, 1990.

OUYANG ,Y.B., TAN, Y., COMB, M., LIU, C.L., MARTONE, M.E., SIESJÖ, B.K.,
HU, B.R. "Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia:
phosphorylation of Akt, release of cytochrome C and Activation of caspase-like
proteases". J Cereb Blood Flow Metab. 19:1126-35,1999.

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

PAAS, Y.; DEVILLERS-THIERY, A.; CHANGEUX, J.-P.; MEDEVIELLE, F. ;
TEICHBERG, VI. "Identification of an extracellular motif involved in the binding of
guanine nucleotides by a glutamate receptor". EMBO J. 15: 1548-1556, 1996.

PAZ, M.M.; RAMOS, M.; RAMÍREZ, G. ; SOUZA, D.O. “Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum”. FEBS Lett. 355: 205-208, 1994.

PETERSON, G.L. “A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable”. Anal. Biochem. v. 83, p.346-356, 1977.

PETTIFER, K.M., KLEYWEGT, S., BAU, C.J.,RAMSBOTTOM, J.D., VERTES, E., CICCARELLI, R., CACIAGLI F, WERSTIUK ES, RATHBONE MP. “ Guanosine protects SH-sy5y cells against beta-amyloid-induced apoptosis”. NeuroReport 15: 833-836.,2004.

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.

RAFFAELLI, G., SAVIANE, C., MOHAJERANI, M.H., PEDARZANI, P., CHERUBINI, E. “BK potassium channels control transmitter release at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus”. J Physiol 557:147-57, 2004.

RATHBONE, M. P.; MIDDLEMIS, P. J., GYSBERS, J. W.; ANDREW, C.; HERMAN, M. A. R.; REED, J. K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; CACIAGLI, F. “Trophic effects of purines in neurons and glial cells”. Progr. Neurobiol. 59: 663-690, 1999.

REGNER, A., CRESTANA, R.E., SILVEIRA, F.J., FRIEDMAN, G., CHEMALE, I., SOUZA, D. “Guanine nucleotides are present in human CSF”. NeuroReport 8: 3771-3774, 1997.

ROSSI, DJ., OSHIMA, T., ATTWELL, D. “Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake”. Nature 403: 316-321, 2000.

SAH, P., DAVIES, P. “ Calcium-activated K⁺ currents in neurons: types, physiological, roles and modulation” Trends Neurosci 19: 150-154, 2000.

SANTOS, T. G. ; SOUZA, D. O. ; TASCA, C. I. "GTP uptake into rat brain synaptic vesicles." Brain Res 1070: 71-6, 2006.

SCHMIDT-KASTNER R & FREUND T.F. "Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia". Neuroscience. 40:599-636,1991.

SCHMIDT, A.P., LARA, D.R., MARASCHIN, J.F., PERLA, A.S., SOUZA, D.O. "Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice". Brain Res. 864: 40-43, 2000.

SCHMIDT, A.P.; ÁVILA, T.T.; SOUZA, D.O. "Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice". Neurochem. Res. 30:69-73, 2005.

SEGOVIA, G.; PORRAS, A.; DEL ARCO, A.; MORA, F. "Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective". Mechan. Ageing Develop. 122: 1-29, 2001.

SCHMIDT, A.P., LARA, D.R ,SOUZA, D.O "Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system". Pharmacol Ther. 116:401-16, 2007.

SHELDON, A.L., ROBINSON, M.B. "The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention". Neurochem Int. 51:333-355, 2007.

SIMS, K.D., STRAFF, D.J., ROBINSON, M.B. "Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase." J.Biol Chem.275:5228-5237, 2000.

SONG G, OUYANG G, BAO S. "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival". J Cell Mol Med. 9(1):59-71, 2005

SOUZA, D.O. & RAMÍREZ, G. "Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum". J. Mol. Neurosci. 3: 39-45, 1991.

STOCKER, M. "Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family". Nat Rev Neurosci. 5:758-70, 2004

SU, C., ELFEKI, N., BALLERINI, P., D'ALIMONTE, I., BAU, C., CICCARELLI, R., CACIAGLI, F., GABRIELE, J., JIANG, S. "Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism" J Neurosci Res Sep 24. [Epub ahead of print], 2008.

SUN, H.S., FENG, Z.P., MIKI, T., SEINO, S., FRENCH, R.J. "Enhanced neuronal damage after ischemic insults in mice lacking Kir6.2-containing ATP-sensitive K⁺ channels". J Neurophysiol. 95:2590-601,2006.

SUN, H.S., FENG, Z.P., BARBER, P.A., BUCHAN, A.M., FRENCH, R.J. "Kir6.2-containing ATP-sensitive potassium channels protect cortical neurons from ischemic/anoxic injury in vitro and in vivo". Neuroscience. 144:1509-1515, 2007.

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

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

TASCA, C.I.; CARDOSO, L.F.; SOUZA, D.O. "Effects of guanine nucleotides on adenosine and glutamate modulation of cAMP levels in optic tectum slices from chicks." Neurochem. Int. 34:13-220, 1999.

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

TAVARES, R.G., TASCA, C.I., SANTOS, C.E., ALVES, L.B., PORCIÚNCULA, L.O., EMANUELLI, T., SOUZA, D.O. "Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes". Neurochem Int. 40:621-627, 2002.

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: 439-444, 2005.

TAVARES, R.G., SCHMIDT, A.P., TASCA, C.I., SOUZA, D.O. "Quinolinic acid-induced seizures stimulate glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain: effects prevented by guanine-based purines". Neurochem Res. 33:97-102, 2008.

TRAVERSA, U; BOMBI, G.; DI IORIO, P.; CICCARELLI, R.; WERSTIUK, E. S.; RATHBONE, M. P. "Specific [³H]-guanosine binding sites in rat brain membranes". Brit. J. Pharmacol. 135: 969-976, 2002.

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

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.

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.

YAMADA, K., INAGAKI, N. "Neuroprotection by KATP channels" J Mol Cell Cardiol.;38:945-92, 2005.

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.

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

