



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

Leandra Celso Constantino

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO
NEUROPROTETOR DO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM N-
Metil-D-Aspartato (NMDA)**

**Florianópolis
2014**

Leandra Celso Constantino

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO
NEUROPROTETOR DO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM N-
Metil-D-Aspartato (NMDA)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Inês Tasca.

**Florianópolis
2014**

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

Constantino, Leandra Celso

Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com N-Metil-D-Aspartato (NMDA) / Leandra Celso Constantino ; orientadora, Carla Inês Tasca - Florianópolis, SC, 2014. 168 p.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Neuroproteção. 3. Pré-condicionamento com NMDA. 4. Receptores de adenosina. 5. Vias de sinalização intracelular. I. Tasca, Carla Inês. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

LEANDRA CELSO CONSTANTINO

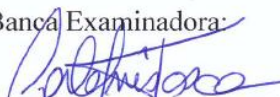
**“ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO
EFEITO NEUROPROTETOR DO PRÉ-
CONDICIONAMENTO COM N-METIL-D-ASPARTATO
(NMDA)”.**

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

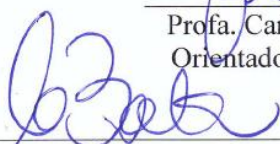
Florianópolis, 31 de março de 2014.

Prof. Rodrigo Bainy Leal
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



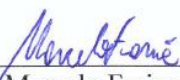
Prof. Carla Inês Tasca
Orientadora – UFSC



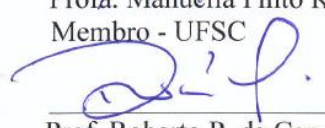
Prof. Carina Rodrigues Boeck
Membro da Banca Externo



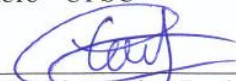
Prof. Manuella Pinto Kaster
Membro - UFSC



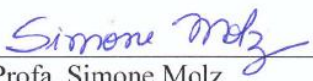
Prof. Marcelo Farina
Membro - UFSC



Prof. Roberto P. de Carvalho
Membro da Banca Externo



Prof. Rodrigo Bainy Leal
Membro - UFSC



Prof. Simone Molz
Membro da Banca Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades, e por sempre dirigir meus passos.

A minha orientadora, Dra. Carla I. Tasca, pela oportunidade e pela paciência, por ter apostado e confiado em mim, e por todo apoio e atenção dedicados durante o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

Aos professores do colegiado do PPG Neurociências, por todos os ensinamentos;

A minha “pra sempre” orientadora e amiga Dra. Carina R. Boeck. Obrigada por abrir as portas e contribuir para minha inserção no mundo da pesquisa. Nada é mais contagioso que o exemplo!

A todos os amigos do Laboratório de Neuroquímica 4, por terem tornado tão agradável os meus momentos no laboratório. Em especial a minha amiga Fabiana K. Ludka, muito obrigada pela tua companhia e tua amizade! A Tharine Dal-Cim, por toda a dedicação e ajuda nos experimentos e nas discussões deste trabalho. E a Luisa Binder por toda dedicação!

Ao Dr. Fabrício Pamplona pelo envolvimento e colaboração neste trabalho;

Ao professor Dr. Rui Daniel Prediger pela oportunidade de colaboração e contribuição na discussão dos resultados. E também ao Filipe Carvalho Matheus pelo auxílio nos experimentos desenvolvidos no LEXDON;

Ao professor Rodrigo Bainy Leal pela colaboração nas análises de imunodeteção de proteínas. Em especial, ao seu aluno Mark William Lopes por me ajudar nos experimentos;

Ao professor Dr. Francisco Ciruela, por ter me acolhido de braços abertos no seu laboratório em Barcelona, por ter me ensinado incondicionalmente e por ter confiado no meu potencial. Além disso, agradeço a todos os companheiros do laboratório e àqueles que fizeram parte da minha estadia em Barcelona. Muchas gracias, os echaré de menos a todos!

À CAPES e ao CNPq pelo financiamento das bolsas de estudos, tanto para o período realizado no Brasil, como o realizado em Barcelona.

Meus agradecimentos especiais a minha família que eu amo muito: meus pais, minha eterna gratidão pela confiança, amor e carinho

que sempre demonstraram por mim; ao meu querido Felipe Ledur por toda compreensão, carinho, paciência e amor.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho.

“Quem é como o sábio? E quem sabe a interpretação das coisas? A sabedoria do homem faz brilhar o seu rosto, e com ela a dureza do seu rosto se transforma.”
Eclesiastes 8:1

RESUMO

O pré-condicionamento cerebral é caracterizado por um estado de tolerância transitória do tecido nervoso a um estímulo letal e/ou tóxico evocado por um dano moderado prévio. Estudos têm demonstrado que este estado de tolerância cerebral pode ser obtido através do pré-condicionamento químico com N-metil-D-aspartato (NMDA), o agonista sintético seletivo dos receptores NMDA e pode ser promovido *in vivo* pela administração de dose subtóxica deste agente. Contudo, as vias de sinalização e receptores ou canais iônicos associados ao processo de neuroproteção ativado pelo pré-condicionamento químico ainda precisam ser elucidados. Desta forma, investigou-se o envolvimento dos receptores de adenosina (A_1R e $A_{2A}R$) e as vias de sinalização celular no mecanismo de neuroproteção pelo pré-condicionamento com NMDA *in vivo* (em camundongos) e *in vitro* (em cultura primária de neurônios e em fatias hipocampais). Os resultados demonstraram que o pré-condicionamento com NMDA aumenta a afinidade de união do A_1R ao ligante, sem alterar seus níveis proteicos no hipocampo de camundongos. Além disso, a ativação do A_1R reverte o efeito antinociceptivo mediado pelo pré-condicionamento com NMDA, sugerindo que a pós-ativação do A_1R pode interferir com o pré-condicionamento. Ainda o pré-condicionamento com NMDA não altera a funcionalidade do A_1R no teste do condicionamento ao medo contextual em camundongos, mas parece promover uma dessensibilização de $A_{2A}R$. E a ativação de ambos A_1R e $A_{2A}R$ reverte o aumento da captação de glutamato em fatias de hipocampo, mediado pelo pré-condicionamento com NMDA. Em relação às vias de sinalização celular analisadas, observou-se o pré-condicionamento com NMDA depende da via da PI3K para a proteção contra as convulsões induzidas por ácido quinolínico (AQ) em camundongos, embora a inibição desta via não parece estar diretamente relacionada com a proteção contra a morte celular. Em estudos *in vitro*, o pré-condicionamento com NMDA também foi eficaz na proteção contra o dano induzido por AQ em cultura primária de neurônios hipocampais e em fatias hipocampais de camundongos contra o dano induzido por glutamato. Os mecanismos envolvidos na neuroproteção pelo pré-condicionamento em fatias, envolve a participação de A_1R e parcialmente dos canais de potássio ativados por cálcio (BK_{Ca}). Além disso, o pré-condicionamento com NMDA é mais eficaz com a ativação de receptores que usam a glicina como co-agonista preferencial. Desta forma, este trabalho contribui para demonstrar alguns mecanismos celulares evocados por uma possível estratégia neuroprotetora, o pré-condicionamento químico.

ABSTRACT

Brain preconditioning is characterized by a state of transient tolerance in the nervous tissue to a lethal and/or toxic stimulus evoked by prior moderate damage. Studies have demonstrated that this state of brain tolerance can be obtained by chemical preconditioning with N-methyl-D-aspartate (NMDA), the synthetic selective agonist of NMDA receptors, and can be promoted by *in vivo* administration of subtoxic doses of this agent. However, the signaling pathways and receptors or ion channels associated with the neuroprotection process activated by chemical preconditioning remain to be elucidated. Thus, we investigated the involvement of adenosine receptors (A_1R and $A_{2A}R$) and cell signaling pathways in the mechanism of neuroprotection evoked by NMDA preconditioning *in vivo* (in mice) and *in vitro* (in primary cultured neurons and hippocampal slices). NMDA preconditioning increases binding affinity of the A_1R to ligand, without changing its protein levels in hippocampus of mice. Furthermore, activation of A_1R reverses the antinociceptive effect mediated by NMDA preconditioning, suggesting that post-activation of A_1R can interfere with preconditioning. NMDA preconditioning does not alter the functionality of A_1R in contextual fear conditioning test in mice, although it seems to promote a desensitization of $A_{2A}R$ response. The activation of both A_1R and $A_{2A}R$ reversed the increase in glutamate uptake into hippocampal slices mediated by NMDA preconditioning. Regarding the signaling pathways analyzed, we observed that NMDA preconditioning is dependent on PI3K pathway for protection against quinolinic acid (QA)-induced seizures in mice, although inhibition of this signaling pathway is not directly related to protection against cell damage. In *in vitro* studies, NMDA preconditioning was also effective in protecting against QA-induced damage in primary cultured hippocampal neurons and against glutamate-induced damage in mice hippocampal slices. The mechanisms of neuroprotection exerted by preconditioning in slices, involve the participation of A_1R and partially the calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}). Moreover, NMDA preconditioning is more effective when glycine is used as the preferential co-agonist of NMDA receptor. Therefore, this study contributes to demonstrate cellular mechanisms evoked by a putative neuroprotective strategy, the chemical preconditioning.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1:** Esquema de uma sinapse glutamatérgica.....25
Figura 2: Representação esquemática dos receptores de adenosina acoplados à proteína G34

CAPÍTULO I

- Figura 1:** Imunodeteccção e propriedades de união do receptor A_{2A} no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NMDA.....52
Figura 2: Efeito do pré-condicionamento com NMDA e a modulação do $A_{2A}R$ no teste do condicionamento do medo contextual.....54
Figura 3: Efeito do pré-condicionamento com NMDA e a modulação do $A_{2A}R$ na captação de $L\text{-}[^3H]$ glutamato em fatias hipocampais.....55
Figura 4: Efeito do pré-condicionamento com NMDA e a ativação do A_1R no teste do condicionamento do medo contextual.....57

ANEXO DO CAPÍTULO I

- Figure 1:** Evaluation of cellular viability and hippocampal A_1R expression and binding properties in NMDA preconditioned mice..... 79
Figure 2: Effect of NMDA preconditioning and A_1R activation in the hot plate and open field tests.....80
Figure 3: Effects of NMDA preconditioning and A_1R activation on $L\text{-}[^3H]$ glutamate uptake into hippocampal slices and on glutamate transporter GLT-1 expression.....80

CAPÍTULO II

- Figura 1:** Efeito do pré-condicionamento com NMDA e a inibição da via PI3K, na incidência de convulsões induzidas por AQ e na escala de severidade.....94
Figura 2: Efeito do pré-condicionamento com NMDA e a inibição da via PI3K, na degeneração neuronal induzida pelo AQ.....95
Figura 3: Imunodeteccção da proteína Akt fosforilada e total no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NMDA.....96
Figura 4: Imunodeteccção das proteínas Akt e GSK3 β fosforilada e total no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NMDA.....97
Figura 5: Imunodeteccção das proteínas ERK1/2 e p38^{MAPK} fosforilada e total no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NMDA.....98

CAPÍTULO III

Figura 1: Curva de tempo para a toxicidade induzida por ácido quinolínico em cultura primária de neurônios hipocampais.....	109
Figura 2: Análise do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por ácido quinolínico em cultura primária de neurônios hipocampais.....	110
Figura 3: Efeito do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por ácido quinolínico em cultura primária de neurônios hipocampais na geração de EROs.....	111
Figura 4: Avaliação <i>in vitro</i> do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por glutamato.....	112
Figura 5: Estudo da participação do receptor A ₁ de adenosina e do canal de K ⁺ no pré-condicionamento com NMDA frente à toxicidade induzida por glutamato.....	113
Figura 6: Avaliação <i>in vitro</i> do pré-condicionamento com NMDA frente à toxicidade induzida por glutamato, utilizando a D-serina como o co-agonista.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Proteína cinase B
AMPA	Alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato
AQ	Ácido quinolínico
AraC	Citosina arabinofuranosídeo
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BK _{Ca}	Canal de K ⁺ de alta condutância ativado por Ca ²⁺
BRET	Transferência de Energia de Ressonância por Bioluminescência
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPCPX	8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina ou dipropilciclopentilxantina
EAAC1	Carreador de aminoácidos excitatórios tipo 1
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatórios
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK	Proteína cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLAST	Transportador de glutamato/aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato 1
HBSS	Solução tempão de Hank
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
i.c.v.	Intracerebroventricular
iGluR	Receptor ionotrópico de glutamato
i.p.	Intraperitoneal
KA	Kainato
JNK	Proteína cinase c-Jun-N-terminal
KRB	Krebs Ringer Bicarbonato
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
MK-801	Maleato de (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d] ciclohepten-5,10-imina
MTT	Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba de sódio/potássio ATPase
NMDA	N-metil-D-aspartato
p-38 ^{MAPK}	Proteína cinase com peso molecular de 38kDa

PGO	Privação de glicose e oxigênio
PI3K	Proteína fosfatidilinositol cinase 3
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
TCE	Traumatismo crânio-encefálico
tGCI	Isquemia cerebral global transitória
SNC	Sistema nervoso central
VGluTs	Transportadores vesiculares de glutamato
x_c^-	Trocador de cistina-glutamato
ZM241385	4-(2-[7-amino-2-(2-furil)-[1,2,4]triazolo[2,3-a]-[1,3,5]triazina-5- ilamino]etil)fenol

TRABALHOS DESENVOLVIDOS EM COLABORAÇÃO DURANTE A TESE DE DOUTORADO

Publicado:

Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities following trauma brain injury in brain of mice preconditioned with N-methyl-D-aspartate

Carina R. Boeck; Leatrice S. Carbonera; Mônia E. Milioli; Leandra C. Constantino; Michelle L. Garcez; Gislaine T. Rezin; Giselli Scaini; Emilio L. Streck

Molecular and cellular biochemistry, 2013.

Submetidos:

N-Methyl-D-Aspartate Preconditioning Prevents Quinolinic Acid-induced Deregulation of Glutamate and Calcium Homeostasis in Mice Hippocampus

Samuel Vandresen-Filho; Patricia C. Severino; Leandra C. Constantino; Wagner C. Martins; Simone Molz; Tharine Dal-Cim; Daniela Bertoldo; Fatima R. M. B. Silva; Carla I. Tasca

Neurotoxicity Research

Antinociception induced by inosine in mice depends on adenosine A₁ receptor activation

F.P. Nascimento, S. J. Macedo-Júnior, M Luiz-Cerutti, F.R.M. Borges, M.M. Córdova, F.A. Pamplona, L. Constantino, C.I. Tasca, R.C. Dutra, J.B. Calixto, A. Reid, J. Sawynok, A.R.S. Santos

Pain

Atorvastatin evokes a serotonergic system-dependent antidepressant-like effect in mice

Fabiana K Ludka; Leandra C Constantino; Gislaine Kuminek; Luisa B Binder; Andrea D Zomkowski; Maurício P Cunha; Tharine Dal-Cim; Ana Lúcia S Rodrigues

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

Em preparação:

Fear incubation disrupts constitutive adenosine A₁ receptor inhibitory control in the mouse hippocampus

Fabricio A. Pamplona; Leandra C. Constantino; Filipe C. Matheus;
Fabiana K. Ludka; Rui D. Prediger; Carla I. Tasca

Atorvastatin and Fluoxetine Prevent Oxidative Stress and Mitochondria Dysfunction Evoked by Glutamate Neurotoxicity in Hippocampal Slices

Fabiana K. Ludka, Tharine Dal-Cim, Luisa Bandeira Binder, Leandra Celso Constantino, Caio Massari, Carla I. Tasca

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Sistema glutamatérgico	25
1.1.1 Excitotoxicidade	28
1.1.2 Receptores NMDA	29
1.2 Mecanismos de neuroproteção pelo pré-condicionamento	30
1.2.1 Pré-condicionamento <i>versus</i> Toxicidade induzida por ácido quinolínico (AQ)	32
1.3 Evidências da participação dos receptores de adenosina no pré-condicionamento	34
1.4 Participação das vias de sinalização celular no pré-condicionamento	38
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos	43
MATERIAL E MÉTODOS	45
4 RESULTADOS	45
CAPÍTULO I	47
1 MATERIAL E MÉTODOS	49
1.1 Animais	49
1.2 Fármacos	49
1.3 Pré-condicionamento com NMDA e tratamentos com os ligantes A_{2A}R	49
1.4 Imunodeteção dos receptores A_{2A} de adenosina	50
1.4.1 Preparação das amostras	50
1.4.2 Dosagem de proteínas	50
1.4.3 Separação de proteínas	50
1.4.4 Eletrotransferência e imunodeteção	50
1.5 Estudo de união dos receptores A_{2A} de adenosina	51
1.5.1 Preparação das membranas hipocâmpais	51
1.5.2 Ensaio de união	52
1.6 Avaliação da memória contextual aversiva pelo teste do condicionamento do medo contextual	52
1.7 Captação de L-[³H]glutamato	53
1.8 Dosagem de proteínas	53
1.9 Análise estatística	53
2 RESULTADOS	54
2.1 Pré-condicionamento com NMDA e avaliação dos receptores A _{2A}	54
2.2 Pré-condicionamento com NMDA e avaliação dos receptores A ₁	58

ANEXO DO CAPÍTULO I	61
3 DISCUSSÃO	86
CAPÍTULO II	91
1 MATERIAL E MÉTODOS	93
1.2 Animais	93
1.3 Procedimento cirúrgico	93
1.4 Tratamento com inibidor da via da PI3K	93
1.5 Pré-condicionamento com NMDA e infusão do Ácido Quinolínico	93
1.6 Ensaio de viabilidade celular	94
1.6.1 Preparação do tecido	94
1.6.2 Histoquímica para Fluoro-jade B	94
1.7 Imunodeteção de proteínas	95
1.7.1 Preparação das amostras	95
1.7.2 Dosagem de proteínas	96
1.7.3 Separação de proteínas	96
1.7.4 Eletrotransferência e imunodeteção	96
1.8 Análise estatística	97
2 RESULTADOS	98
3 DISCUSSÃO	104
CAPÍTULO III	107
1 MATERIAL E MÉTODOS	109
1.1 Análise do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por ácido quinolínico em cultura primária de neurônios hipocampais	109
1.1.1 Preparação de cultura primária de neurônios hipocampais	109
1.1.2 Pré-condicionamento com NMDA e toxicidade induzida por AQ	109
1.1.3 Avaliação de morte celular	110
1.1.4 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)	110
1.2 Avaliação <i>in vitro</i> do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por glutamato	111
1.2.1 Preparação de fatias hipocampais	111
1.2.2 Pré-condicionamento com NMDA e tratamento com bloqueadores em fatias hipocampais	111
1.2.3 Indução da toxicidade induzida por glutamato em fatias hipocampais	111
1.2.4 Ensaio da viabilidade celular	112
1.3 Análise Estatística	112
2 RESULTADOS	113
3 DISCUSSÃO	120

5 CONCLUSÕES	125
6 PERSPECTIVAS	126
ANEXO	127
REFERÊNCIAS	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema glutamatérgico

O aminoácido L-glutamato é o principal sinalizador químico utilizado no Sistema Nervoso Central (SNC) (Danbolt, 2001). Desde a década de 1950, a ação excitatória do glutamato no cérebro de mamíferos e na medula espinhal tornou-se conhecida e mais tarde, por volta da década de 1970, até os dias de hoje o glutamato é amplamente reconhecido como o aminoácido mais abundante do cérebro de mamíferos, onde exerce a função de principal neurotransmissor excitatório (Hayashi, 1952; Curtis e Watkins, 1960; Featherstone, 2010).

O glutamato participa de muitos processos químicos intracelulares como a indução sináptica, migração, diferenciação, plasticidade e morte celular, além de desempenhar um importante papel na manutenção de aspectos funcionais do cérebro, tais como: cognição, aprendizagem, memória e controle motor (Nedergaard et al., 2002; Aarts et al., 2003 Meldrum, 2000; Danbolt, 2001). O metabolismo celular do glutamato envolve tanto neurônios quanto astrócitos, sendo que a maior parte deste glutamato é encontrada em neurônios, e a concentração deste aminoácido no cérebro varia entre 10 a 15 $\mu\text{mol/g}$ de tecido. (Schousboe, 1981; Siegel et al., 2006).

A síntese de glutamato ocorre nos terminais nervosos a partir da glicose que, ao ser metabolizada, origina os intermediários do ciclo do ácido cítrico como o α -cetoglutarato, que por sua vez, recebe um grupamento amino de outro aminoácido através de uma reação de transaminação (Siegel et al., 2006). O glutamato também pode ser formado através da glutamina, um aminoácido neutro sintetizado em células gliais pela ação da glutamina sintetase. A glutamina é transportada para os terminais nervosos, onde é convertida em glutamato pela ação enzimática da glutaminase. Nos neurônios pré-sinápticos o glutamato é armazenado em vesículas sinápticas através dos transportadores vesiculares de glutamato (VGluts) e encontra-se em maiores concentrações nos terminais axonais. (Takamori, 2006). Em resposta a altas concentrações de íons cálcio (Ca^{2+}), resultantes da propagação de potenciais de ação, as vesículas sinápticas se fundem com a membrana plasmática, liberando o glutamato para a fenda sináptica. Uma vez na fenda sináptica, o glutamato pode difundir-se e mediar diversas ações em sítios gliais, pré e pós-sinápticos.

Uma das principais ações é a estimulação dos receptores de glutamato, que são classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas em duas categorias: os receptores ionotrópicos (iGluR) – canais iônicos que se abrem com a união de glutamato - e os receptores metabotrópicos (mGluR) – que ativam enzimas intracelulares através do acoplamento a proteínas G (Kew e Kemp, 2006; Siegel et al., 2006).

Existem 8 tipos de mGluR e estes são subdivididos em três grupos de acordo com propriedades farmacológicas, mecanismos de transdução do sinal e similaridade na seqüência de aminoácidos. O grupo I de mGluR (mGlu1 e mGlu5) estimula a fosfolipase C, enquanto os grupos II (mGlu2 e mGlu3) e III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) modulam a atividade da adenilato ciclase (Gubellini et al, 2004; Swanson et al, 2005).

Receptores ionotrópicos são canais iônicos multiméricos e a união de agonistas a esses receptores leva a alteração conformacional do canal, o que aumenta a probabilidade de abertura do mesmo e acarreta em influxo de íons. As três classes de iGluR foram inicialmente nomeadas pela seletividade a seus agonistas: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazol propiônico (AMPA) e cainato (KA) (Kew e Kemp, 2006). Os receptores NMDA serão abordados com mais detalhes em um item a seguir.

Fisiologicamente, os receptores AMPA e cainato estão relacionados à transmissão sináptica rápida no SNC e são caracterizados pelas rápidas cinéticas de ativação e desativação (Popescu e Auerbach, 2004). Os receptores AMPA formam-se de quatro subunidades GluA1, GluA2, GluA3 e GluA4 e são responsáveis pela despolarização inicial do potencial pós-sináptico (Stone e Addae, 2002; Li, Chen, Smit, 2013).

Os receptores de cainato são tetrâmeros formados a partir da associação de cinco tipos de subunidades denominadas GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 e GluK5 (Reiner, Arant, Isacoff, 2013). Encontrados 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). Os receptores de cainato localizados nas células pré-sinápticas estão envolvidos na modulação da liberação de ácido gama-amino-butírico (GABA) e do próprio glutamato em sinaptossomas hipocampais. Os receptores de cainato pós-sinápticos são responsáveis por um componente lento e pequeno do potencial excitatório pós-sináptico relacionado a fenômenos de plasticidade de curta e longa duração (Madden, 2002).

A ação sináptica do glutamato é finalizada por sua recaptação a partir da fenda sináptica por proteínas de membrana chamadas transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT) dependentes de sódio, que mantêm os níveis fisiológicos de glutamato extracelular.

Existem cinco tipos de EAATs que se diferem quanto à localização e/ou função, sendo que grande parte desses transportadores estão presentes nos astrócitos próximos às sinapses glutamatérgicas. Desta forma, o glutamato liberado nas sinapses é captado e reciclado nos astrócitos, onde pode ser convertido à glutamina, a qual é liberada no espaço extracelular, captada por neurônios e convertida novamente a glutamato (Danbolt, 2001; Featherstone, 2010). Nos roedores os EAATs são designados como transportador de glutamato/aspartato (GLAST) e transportador de glutamato-1 (GLT-1) (em humanos são designados como EAAT1 e EAAT2, respectivamente) e são considerados transportadores gliais. Transportadores neuronais também são importantes para manter as concentrações fisiológicas de glutamato no meio extracelular. O transportador neuronal de glutamato mais amplamente distribuído no cérebro é o carreador de aminoácidos excitatórios 1 (EAAC1 - homólogo humano, EAAT3), encontrado em regiões extra-sinápticas (Danbolt, 2001). Uma representação da sinapse glutamatérgica está apresentada na figura 1.

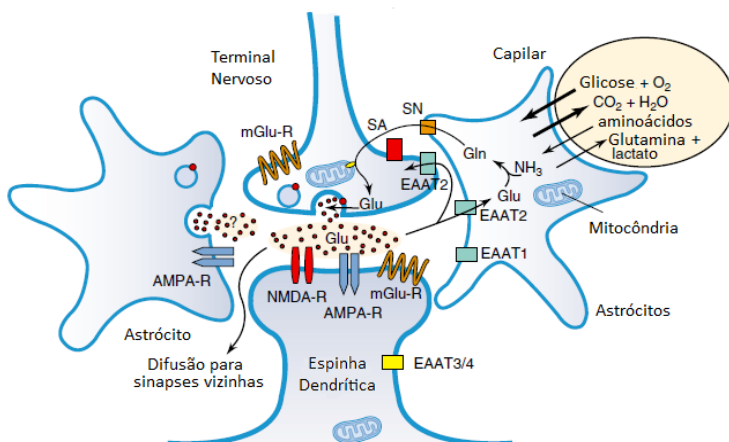


Figura 1: Esquema de uma sinapse glutamatérgica. O neurônio pré-sináptico contém vesículas sinápticas com transportadores de glutamato (ponto vermelho), mitocôndria com glutaminase (ponto amarelo), receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) e transportadores de glutamato (EAAT2) e glutamina (laranja). O neurônio pós-sináptico contém receptores iGLURs (AMPA e NMDA), mGLURs e transportadores de glutamato. Ao redor das sinapses estão os astrócitos que contêm os transportadores para glutamato

(EAAT1 e EAAT2) e os transportadores de glutamina (Transportador SN), os receptores glutamatérgicos e algumas vesículas glutamatérgicas. SA e SN sistema de transportadores A e N respectivamente (para glutamina). O glutamato que escapa da fenda sináptica sem ser captado por transportadores, pode ser difundido para sinapses vizinhas (adaptado de Siegel e colaboradores, 2006).

Os níveis de glutamato extracelular também podem ser mantidos por um trocador de cistina-glutamato, chamado sistema x_c^- . Este trocador é bastante expresso no cérebro de roedores e humanos, e em muitos tipos de células do SNC (neurônios, astrócitos, micróglia, células endoteliais vasculares, ependimária, células do plexo coróide e leptomeninges) (Niciu et al., 2012). O sistema x_c^- medeia a troca estequiométrica de uma molécula de cistina extracelular por uma molécula de glutamato intracelular. Desta forma, o glutamato extracelular é regulado por uma complexa rede de mecanismos de liberação e captação, que contribui significativamente para a manutenção da concentração de glutamato na fenda sináptica (Bridges et al., 2012).

Apesar da sua importância fisiológica, os níveis extracelulares de glutamato são regulados a fim de preservar a integridade da transmissão sináptica excitatória. Por isso, a retirada desse aminoácido da fenda sináptica é um importante mecanismo a fim de diminuir a quantidade desse neurotransmissor na fenda, prevenindo a excitotoxicidade (Phillis e O'regan, 2002).

1.1.1 Excitotoxicidade

A partir do antagonismo entre os efeitos fisiológicos e tóxicos do glutamato surgiu o termo excitotoxicidade, proposto primeiramente por Olney e colaboradores (Olney, 1969), o qual se refere à toxicidade causada pelo aumento da concentração de glutamato durante a transmissão sináptica e consequente morte neuronal (Meldrum 2000).

Muitas doenças neurodegenerativas apresentam a excitotoxicidade como um evento que acompanha o aparecimento e/ou o curso da doença. Este evento está associado a quadros patológicos agudos e crônico-degenerativos como, por exemplo, na isquemia cerebral (Olney, 1969; Tymianski, 2011), no trauma encefálico (Baker et al., 1993; Koura et al., 1998) nas doenças de Parkinson (Boll et al., 2011; Chen et al., 2011) e Alzheimer (Cassano et al., 2011) e em convulsões (Ogita et al., 2003; Boeck et al., 2005).

A estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos pode ter inúmeros efeitos prejudiciais para a viabilidade celular, como liberação de óxido nítrico (NO), ativação de proteases, aumento da produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio e o influxo massivo de Ca^{2+} , resultante da hiperestimulação dos receptores NMDA (Choi, 1985; Wang & Qin, 2010; Lau e Tymianski, 2010).

Os receptores NMDA são permeáveis a Ca^{2+} , permitindo que ocorra um grande aumento das concentrações desse íon no interior da célula. Portanto, a hiperativação deste iGluR tem sido considerada a principal responsável pela morte celular devido à excitotoxicidade (Stone e Addae, 2002). O influxo de Ca^{2+} pode levar a ativação de enzimas catabólicas como fosfolipases, endonucleases ou proteases como a caspase e calpaína (Siegel et al., 2006). Além disso, grande parte do Ca^{2+} é sequestrada pela mitocôndria, o que acarreta em acidose metabólica, inibição da fosforilação oxidativa, formação de poros de permeabilidade transitória, colapso bioenergético e formação de radicais livres via toxicidade mitocondrial (Nichols et al., 2007; Ryter et al., 2007).

1.1.2 Receptores NMDA

Dentre os iGluRs, o subtipo NMDA possui a maior afinidade pelo glutamato (EC_{50} 1 μM). (Niciu et al., 2012). Os receptores NMDA são complexos heteroméricos compostos por quatro subunidades, cada uma contendo uma isoforma diferente: GluN1, GluN2 (GluN2A-GluN2D) e GluN3 (GluN3A e GluN3B) (Paoletti et al., 2013).

A diferente composição das subunidades dos receptores NMDA apresenta distribuição, propriedades e regulação distintas no cérebro. Portanto, os receptores NMDA apresentam características funcionais e farmacológicas heterogêneas devido à composição destas subunidades (Gonda, 2012). Os receptores NMDA são predominantemente formados pela subunidade GluN1, que é essencial para funcionalidade do receptor, em combinação com pelo menos um tipo da subunidade GluN2 (Hardingham, 2009; Cull-Candy et al., 2001).

A ativação dos receptores NMDA requer não somente a união do seu agonista, o glutamato, e despolarização da membrana, mas também a presença de um co-agonista, a glicina ou D-serina, sendo que a composição das subunidades do NMDAR determina a sua afinidade para co-agonistas (Henneberger et al., 2013). Estudos relatam que a D-serina parece agir em NMDAR sinápticos contendo a subunidade

GluN2A, enquanto que para a glicina foi demonstrada uma preferência por NMDAR extra-sinápticos contendo a subunidade GluN2B (Henneberger et al., 2010; Papouin et al., 2012).

A ação dos receptores NMDA nem sempre é excitotóxica, sendo este receptor é conhecido por apresentar um efeito dual, que promove a morte ou a sobrevivência neuronal, dependendo do nível de atividade e da composição do receptor (Lai et al., 2013). Os receptores contendo a subunidade GluN2B extra-sináptica estão envolvidos em processos de excitotoxicidade, enquanto que receptores contendo a subunidade GluN2A sináptica estão envolvidos nos efeitos tróficos deste receptor glutamatérgico, que são responsáveis pela neuroproteção (Vizi et al., 2013).

Apesar das evidências de diferentes modelos implicando a atividade do receptor NMDA na perda neuronal após isquemia, vários ensaios clínicos utilizando diferentes antagonistas dos receptores NMDA não demonstraram efeitos positivos contra o acidente vascular encefálico (AVE) (Muir, 2006). Portanto, o bloqueio completo dos receptores NMDA tem sido ineficaz em ensaios clínicos (Ikonomidou & Turski, 2002). Por outro lado, estudos têm demonstrado o envolvimento de receptores de NMDA na neuroproteção endógena em diferentes modelos de pré-condicionamento, através da administração de antagonistas como MK-801 [(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina maleato] e cetamina (Bond et al., 1999; Rejdak et al., 2001; Schaller & Graff, 2002; Samoilov et al., 2003). Dessa forma, uma moderada ativação dos receptores NMDA, durante o pré-condicionamento tem sido considerada como uma possível estratégia clínica mais eficaz.

1.2 Mecanismos de neuroproteção pelo pré-condicionamento

A neuroproteção é um processo que interrompe e/ou previne uma cascata patológica que ocorre durante um processo de dano celular (McIntosh, 1993; Gagliard, 2000). Portanto, o uso de estratégias que modulem o dano celular excitotóxico é uma importante ferramenta neuroprotetora, dentre as quais se destaca a pesquisa sobre o pré-condicionamento.

O termo pré-condicionamento foi introduzido por Janoff (1964), a fim de descrever a resposta de tolerância de um organismo ao estresse letal induzido pela exposição prévia a baixas doses de agentes ou estímulos tóxicos. Praticamente qualquer estímulo capaz de gerar

dano ao organismo ou aos tecidos pode, quando aplicado abaixo do limiar de dano, ativar mecanismos endógenos de proteção, amenizando o impacto de estímulos deletérios posteriores (Dirnagl et al., 2003). Desta forma, o princípio geral de pré-condicionamento é definido como a obtenção de um estado de proteção tecidual, ou do organismo como um todo, através da exposição a estímulos subletais que conferem, assim, tolerância a um dano letal posterior (Dirnagl et al., 2003; Mergenthaler et al., 2004).

Murry e colaboradores (1986) foram os que introduziram as primeiras noções de pré-condicionamento através de estudos em células do miocárdio após uma isquemia. Já a primeira descrição de pré-condicionamento no SNC foi realizada por Kitagawa e colaboradores (1990), que relataram a neuroproteção promovida por um breve episódio isquêmico contra uma isquemia letal posterior em diversas áreas do cérebro, como as regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Estudos têm demonstrado que esse estado de tolerância cerebral pode ser obtido por diversos meios químicos, elétricos ou anóxicos (Bond et al., 1999; Rejdak et al., 2001; Schaller et al., 2002; Samoilov et al., 2003).

Os mecanismos subjacentes ao pré-condicionamento não estão completamente elucidados, mas a ativação dos receptores NMDA, óxido nítrico sintase, citocinas inflamatórias, modulação de estresse oxidativo e supressão do sistema imune inato parecem ter um papel importante no percurso endógeno de sobrevivência das células envolvidas no pré-condicionamento e tem implicações clínicas significativas para a prevenção de dano neuronal (Vandresen-Filho et al., 2007; Shpargel et al., 2008).

No que diz respeito à neuroproteção, foi demonstrado que, em culturas de células neuronais, uma concentração subtóxica de NMDA previne a morte neuronal induzida pelo glutamato, NMDA (Chuang et al., 1992; Dickie et al., 1996; Boeck et al., 2005) ou privação de glicose e oxigênio (PGO) (Pringle et al., 1999; Valentim et al., 2003). A administração de doses subtóxicas de NMDA via intraperitoneal (i.p.) é utilizada como modelo de pré-condicionamento químico *in vivo* contra danos cerebrais posteriores (Ogita et al., 2003; Boeck et al., 2004). Neste protocolo *in vivo* foi demonstrado que a proteção é obtida 24 horas após a administração de NMDA e permanece por até 48 horas. No entanto, o efeito protetor do pré-condicionamento não é mais observado 72 horas após a administração de NMDA (Boeck et al., 2004).

A fim de compreender os mecanismos moleculares e celulares relacionadas com a neuroproteção promovida 24 horas após o pré-condicionamento com NMDA, um estudo de análise proteômica no

hipocampo de camundongos submetidos ao pré-condicionamento, demonstrou uma alteração na expressão de proteínas envolvidas na tradução e no processamento proteico (aspartil-tRNA sintetase e proteína de choque térmico – HSP70), na manutenção da homeostase energética (creatina cinase) e na modulação da transmissão glutamatérgica (próton ATPase do tipo V) (do Amaral e Silva Muller et al., 2013).

Outros estudos têm demonstrado que o pré-condicionamento com NMDA melhora significativamente o dano isquêmico em fatias de hipocampo (Schurr et al., 2001), em cultura de células (Xu et al., 2000). Costa e colaboradores (2010) demonstraram o efeito do pré-condicionamento com NMDA em um modelo *in vivo* de traumatismo crânio-encefálico (TCE), no qual os animais que foram pré-condicionados e submetidos ao TCE apresentaram melhora nos parâmetros de locomoção como a coordenação, o equilíbrio e a atividade sensorio-motor e não exibiram distorção de marcha (Costa et al., 2010). Recentemente, um trabalho do mesmo grupo avaliou o metabolismo energético no cérebro de camundongos no mesmo modelo, demonstrando um aumento na atividade do complexo mitocondrial II, tanto em camundongos pré-condicionados quanto naqueles submetidos ao TCE (Boeck et al., 2013).

1.2.1 Pré-condicionamento *versus* Toxicidade induzida por ácido quinolínico (AQ)

O AQ, um metabólito do triptofano proveniente da via das quinureninas, foi inicialmente estabelecido como um intermediário na síntese do ácido nicotínico e da nicotinamida adenina dinucleotídeo (Stone, 2001). A sua importância no SNC só foi reconhecida quando o bioquímico russo Izyaslav Lapin (1978) realizou um experimento no qual seis quinureninas: DL-quinurenina, ácido quinolínico, ácido 3-hidroxi-antranílico, ácido xanturênico, ácido picolínico, e ácido nicotínico foram injetados individualmente no ventrículo lateral de camundongos. Lapin observou que todas essas substâncias produziram excitação motora e/ou convulsões clônicas, e que dentre estas, o metabólito com ação mais potente era o AQ. Logo depois, Trevor Stone e Martin Perkins (1983) analisaram a ação excitatória do AQ e de seus análogos injetados em diferentes regiões do SNC e foram os primeiros a levantar suspeita sobre a existência de subtipos de receptores NMDA.

Atualmente, sabe-se que o AQ causa convulsões através da ação sobre os receptores NMDA, particularmente, aqueles que contêm subunidades GluN2B (Moroni, 1999; Schwarcz & Pellicciari, 2002). Dessa forma, a ativação dos NMDAR pelo AQ causa excitotoxicidade através do aumento da concentração intracelular do íon Ca^{+2} e disfunção mitocondrial com exaustão da adenosina trifosfato (ATP) intracelular e produção excessiva de EROs e nitrogênio e consequente peroxidação lipídica e carbonilação proteica (Stone e Darlington, 2002; Naredo et al., 2005; Guillemín, 2012). Além da atuação direta sobre os NMDAR, estudos mostraram que o AQ pode sobrecarregar o sistema glutamatérgico pela modulação do transporte de glutamato (Guillemín, 2012; Perez-de La Cruz et al., 2012), e inibir a captação de glutamato tanto em preparações de vesículas sinápticas (Tavares et al., 2000) quanto em cultura de astrócitos (Tavares et al., 2002).

A toxicidade do AQ tem sido implicada em diversas condições patológicas do SNC, como as doenças de Huntington e Parkinson, na demência associada à infecção com vírus da imunodeficiência humana (HIV), na depressão maior e transtorno bipolar e na etiologia da epilepsia em humanos (Heyes et al., 1990; Stone, 2001). Assim, o AQ tem sido utilizado tanto pra estudos *in vivo* em modelos animais de convulsões (Schmidt et al., 2000), quanto em modelos *in vitro* para indução de toxicidade em fatias de córtex cerebral, estriado e hipocampo (Dobrachinski et al., 2012).

Concentrações elevadas de AQ foram encontradas no soro ou plasma de pacientes com diversos tipos de doenças infecciosas, como meningite, choque séptico e doenças inflamatórias sugerindo que a toxicidade induzida por AQ também envolva processos neuroinflamatórios (Myint, 2012; Perez-de La Cruz et al., 2012), já que no SNC, a micróglia ativada é a maior fonte de AQ durante a inflamação.

Estudos têm demonstrado que o pré-condicionamento com NMDA previne crises convulsivas induzidas pela administração intracerebroventricular de AQ em camundongos. Além disso, observou-se que estes animais são protegidos contra a morte celular por necrose no hipocampo, devido à toxicidade induzida por AQ (Boeck et al., 2004). Um estudo realizado em nosso laboratório avaliou as respostas eletroencefalográficas do hipocampo e córtex cerebral de camundongos pré-condicionados com NMDA sobre as convulsões induzidas por AQ. Os resultados demonstraram que o pré-condicionamento com NMDA aumenta a excitabilidade registrada no eletroencefalograma, apesar de

não induzir generalização comportamental de convulsões. Além disso, os camundongos pré-condicionados com NMDA e que foram protegidos das convulsões induzidas por AQ (50% dos animais pré-condicionados), não apresentaram aumento de excitabilidade neuronal em comparação com os animais que foram pré-condicionados com NMDA e que apresentaram convulsões. (Vandresen-Filho et al., 2012). Portanto, o aumento da excitabilidade neuronal promovido pelo pré-condicionamento reflete em aumento da proteção contra convulsões comportamentais.

1.3 Evidências da participação dos receptores de adenosina no pré-condicionamento

Adenosina é um nucleosídeo descrito como um metabólito intermediário importante, agindo como base para produção de ácidos nucleicos e um componente energético para produção de ATP. Seus efeitos tem sido de interesse para diferentes áreas da pesquisa biomédica desde 1920 (Boison, 2006; Chen, Eltzhig, Fredholm, 2013). Sua concentração no meio extracelular é de aproximadamente 25 a 150 nM, e a principal ação da adenosina no cérebro é suprimir a transmissão excitatória através da inibição da liberação de transmissores a partir dos terminais pré-sinápticos. Ela apresenta vários efeitos no tecido neuronal durante a isquemia e o pré-condicionamento, e também durante a plasticidade sináptica (Dunwiddie & Masino, 2001).

A adenosina é formada no interior das células, como resultado da defosforilação do AMP através da ação de uma enzima, a 5'-nucleotidase. Para isso sua formação depende da degradação e síntese de ATP, ou pela hidrólise da S-adenosilhomocisteína (Boison, 2006). No meio extracelular, o nível de adenosina também depende da taxa de hidrólise de ATP o qual é liberado de neurônios ou células gliais e pode ser formada por uma cascata de ectonucleotidases. As concentrações extracelulares, de adenosina são mantidas em equilíbrio por mecanismos de recaptção específicos através de transportadores bidirecionais especializados (Thorn & Jarvis, 1996). A adenosina é então catabolizada pela ação de enzimas como a adenosina-cinase (AKA) e adenosina-desaminase (ADA) (Zimmermann et al., 1996).

Além disso, a adenosina funciona como uma molécula sinalizadora através da ativação de quatro receptores distintos – A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R e A₃R. Esses receptores são metabotrópicos, portanto acoplados a proteínas G que atuam como mensageiros de sinalização

para alvos específicos para exercer as suas ações sobre a célula (Fredholm, 1995). Estes receptores têm sido implicados tanto em funções fisiológicas quanto patológicas, incluindo o ritmo cardíaco e circulação (Eltzschig, 2009; Eltzschig et al., 2012), fluxo sanguíneo renal (Sun et al., 2001; Grenz et al., 2012), regulação do sono (Huang et al., 2005; Lazarus et al., 2011), angiogênese (Liu, 2010), bem como, doenças inflamatórias (Hasko et al., 2008; Eltzschig & Carmeliet, 2011), isquemia/reperfusão (Eltzschig & Eckle, 2011) e doenças neurodegenerativas (Fredholm, 2007), além de apresentar propriedades anti-epilética e neuroprotetora (Boison, 2006).

O receptor A_1 é o subtipo de receptor de adenosina mais conservado entre as espécies (Fredholm, 2000), e o mais abundante no SNC, especialmente nos nervos terminais excitatórios (Daly & Padgett, 1992). Este receptor tem sua atividade acoplada a uma proteína $G_{i/o}$ e sua ativação inibe a atividade da adenilato ciclase diminuindo os níveis intracelulares de AMPc (adenosina monofosfato cíclico), e também é reconhecido por reduzir a atividade neuronal, bloqueando a liberação de neurotransmissores, entre eles o glutamato (Poli et al., 1991; Chen et al., 1999; Chen, Eltzschig, Fredholm, 2013).

O subtipo A_{2A} é encontrado em altos níveis no corpo estriado e em menor concentração em outras regiões como o hipocampo (Fredholm, 2001). Sua atividade é acoplada a uma proteína G_s nos tecidos periféricos ou G_{olf} no cérebro, capaz de estimular a adenilato ciclase, aumentando o níveis de AMPc (Fredholm, 2000; Kull et al., 2000; Corvol et al., 2001). Em tecidos periféricos, os $A_{2A}R$ desempenham um papel crucial na modulação da inflamação, consumo de oxigênio do miocárdio e angiogênese. No cérebro, interagem com vários neurotransmissores para regular a atividade motora, comportamentos psiquiátricos, o ciclo sono-vigília e morte celular neuronal (Eltzschig et al., 2012).

Os receptores A_{2B} são expressos em baixos níveis no cérebro e, apesar de estimularem a atividade das MAPKs (proteínas cinase ativadas por mitógeno) em uma afinidade similar aos receptores A_{2A} em cultura de células (Schulte & Fredholm, 2003), o $A_{2B}R$ é o mais insensível ao nucleosídeo, dentre os quatro receptores de adenosina, exigindo concentrações micromolar de adenosina - que são raramente obtidas em condições fisiológicas. Durante condições em que os níveis de adenosina são elevados, tais como hipóxia, isquemia ou inflamação, papéis funcionais da sinalização do receptor A_{2B} têm sido descritos em estudos genéticos e farmacológicos, papéis estes que incluem a adaptação do tecido para hipóxia (Eckle et al., 2008), aumento da

tolerância isquêmica (Grenz et al., 2012; Eckle et al., 2012) ou atenuação da inflamação aguda (Frick et al., 2009; Hart et al., 2011).

Os receptores A_3 são expressos em vários tecidos do corpo humano com níveis elevados nos órgãos periféricos e baixos níveis no cérebro, em regiões como o cerebelo e hipocampo, e sua ativação diminui a ação sináptica inibitória da adenosina na região CA1 do hipocampo (Dunwiddie et al., 1997). Isto ocorre porque os receptores de adenosina A_3 podem interagir com fosfolipase C, capazes de inibir as respostas mediadas pelo receptor A_1 . Portanto, parece que o A_3R controla a função inibitória mediada pelo receptor de adenosina mais abundante, o A_1 , proporcionando um freio na inibição excessiva sempre que a adenosina extracelular estiver acima do limiar de ativação do receptor A_3 (Sebastião et al., 2012). Uma representação esquemática dos receptores de adenosina está apresentada na figura 2.

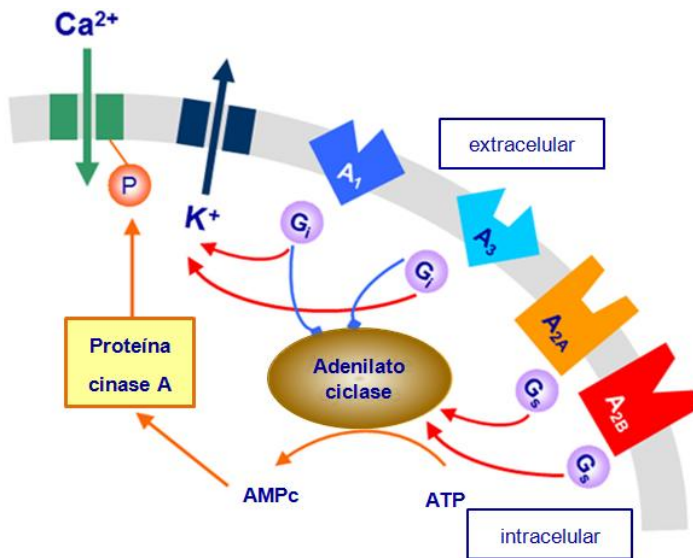


Figura 2: Representação esquemática dos receptores de adenosina acoplados à proteína G: A ativação de receptores de adenosina pode inibir (A_1R e A_3R) ou estimular ($A_{2A}R$ e $A_{2B}R$) adenilato ciclase e a via do AMPc (adaptado de Landolt e colaboradores, 2012).

A excitotoxicidade glutamatérgica proveniente da super estimulação dos receptores NMDA pode ser modulada pelo sistema adenosinérgico (Dunwiddie & Haas, 1985). Altos níveis de adenosina são observados no espaço extracelular em situações de lesão ao tecido

cerebral, assim como quando os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA são ativados (Hoehn & White, 1990; Craig & White, 1993; Melani et al., 1999). Este aumento nos níveis extracelulares de adenosina pode ser decorrente da sua liberação através do seu sistema de transporte ou através da hidrólise dos nucleotídeos extracelulares, pois a excitotoxicidade glutamatérgica ativa a cascata enzimática das ectonucleotidases responsáveis por produzir adenosina a partir de nucleotídeos liberados (Craig & White, 1993; Boeck et al., 2000, Bruno et al., 2002). Por exemplo, sabe-se que em cultura de neurônios cerebelares a ativação dos receptores NMDA estimula a ativação do ecto-5'-nucleotidase (Boeck et al., 2000), que por sua vez degrada a adenosina-5'-monofosfato (AMP) à adenosina.

Um dos mecanismos pelos quais a adenosina induz tolerância neuronal é mediado através de uma via de transdução de sinal que consiste na ativação do A₁R que leva a ativação da proteína cinase C (PKC), seguido pela ativação do canal de potássio sensível a ATP (Heurteaux et al., 1995; Reshef et al., 2000). Corroborando com isto, muitos estudos demonstram que os efeitos inibitórios dos receptores A₁ resultam em neuroproteção, tanto em *in vitro* quanto *in vivo*, principalmente em modelos de hipóxia/isquemia e convulsões (Rudolph et al., 1992; Von Lubitz, 1994). A participação da adenosina no pré-condicionamento induzido por NMDA foi demonstrada *in vivo* (Boeck et al., 2004) e *in vitro* (Boeck et al., 2005). Nestes estudos, observou-se que o antagonista do receptor A₁, o 8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina (CPT), foi capaz de abolir o efeito protetor induzido pelo pré-condicionamento com NMDA frente à toxicidade induzida por glutamato ou pelas convulsões induzidas por AQ.

Além disso, a avaliação *in vitro* da atividade dos receptores de adenosina na participação do mecanismo do pré-condicionamento com NMDA em neurônios granulares do cerebelo, mostrou que o pré-condicionamento promove uma dessensibilização da resposta dos receptores A_{2A}, favorecendo assim a ativação dos receptores A₁ e contribuindo para o pré-condicionamento mediado pelo NMDA (Boeck et al., 2005). Outros estudos demonstraram que os receptores A_{2A} também podem estar envolvidos em mecanismos de neuroproteção. A pré-incubação com agonistas de receptores A_{2A}, em cultura neuronal de retina de aves, protege os neurônios da excitotoxicidade induzida por glutamato. Este efeito é reproduzido por análogos permeáveis de AMPc indicando esta via de sinalização como responsável pelos efeitos do receptor A_{2A} (Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001).

A existência de interações moleculares entre proteínas, como a oligomerização de receptores está sendo amplamente aceita na literatura. Há evidências de que os receptores de adenosina formam oligômeros, como o heterômero $A_1R-A_{2A}R$, que possuem características bioquímicas distintas das observadas pelos componentes individuais (Ferré et al., 2007; Fuxe et al., 2010). A ocorrência de heterômeros $A_1R-A_{2A}R$ já foi demonstrada em células HEK-293 (do inglês - *Human Embryonic Kidney 293 cells*) transfectadas com estes receptores e em terminais glutamatérgicos de tecidos nativos, sendo que a interação molecular entre os dois receptores do heterômero tem a função de regular a liberação de glutamato (Ciruela et al., 2006a; 2006b).

Tem sido descrito que a interação entre os receptores de adenosina pode ser modulada pelos diferentes níveis deste nucleosídeo na fenda sináptica. Os receptores A_1R são ativados por baixos níveis de adenosina promovendo proteção celular através da diminuição da transmissão glutamatérgica. Por outro lado, altos níveis de adenosina promoveriam a ativação de $A_{2A}R$, que é definida como facilitatória, ou seja, aumenta a liberação de neurotransmissores como o glutamato (Cunha, 2005; Ciruela et al., 2012), demonstrando a complexidade do papel dos receptores de adenosina sobre a atividade do sistema glutamatérgico.

1.4 Participação das vias de sinalização celular no pré-condicionamento

O pré-condicionamento pode induzir cascatas de sinalização celular que ativam mecanismos efetores responsáveis pela neuroproteção. Estes mecanismos podem envolver, a atenuação de vias de dano celular como a excitotoxicidade, o desequilíbrio iônico, o estresse oxidativo, a disfunção metabólica, a inflamação e processos relacionados à morte celular por necrose e apoptose (Gidday et al., 2006). Duas vias de sinalização que desempenham um papel importante nestes mecanismos são as MAPKs e a cascata de sinalização da PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase).

As MAPKs são um grupo de proteínas cinases que medeiam os sinais provenientes de uma variedade de estímulos extracelulares. Elas regulam vários processos no SNC, incluindo, ciclo e metabolismo celular, diferenciação de células, sobrevivência, morte celular, e plasticidade sináptica. Existem três principais subfamílias de proteínas cinases, a proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2), a

proteína cinase c-Jun-N-terminal 1-3 (JNK1/2/3) e a proteína cinase p38 (p38^{MAPK} $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) (Krishna & Narang, 2008).

Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando modelos de isquemia cerebral demonstraram que a via MAPK/ERK cinase (MEK) está envolvida na regulação de morte neuronal e sobrevivência celular após a isquemia (Irving e Bamford, 2002; Maddahi e Edvinsson, 2010). Além disso, Zhan e colaboradores (2013) demonstraram que a via MEK/ERK parece estar envolvida nos mecanismos de neuroproteção provocados pelo pré-condicionamento hipóxico em um modelo de isquemia cerebral global transitória (tGCI). O papel da p38^{MAPK} também tem sido descrito na neuroproteção induzida pelo pré-condicionamento hipóxico contra o dano cerebral isquêmico, através da translocação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL mitocondrial, o que pode ser um mecanismo anti-apoptótico do pré-condicionamento hipóxico (Zhao et al., 2013).

Outra via de sinalização, a PI3K/proteína serina-treonina cinase B (Akt) é reconhecida por mediar sinais de sobrevivência em vários tipos celulares, incluindo neurônios. A PI3K leva à ativação de várias vias de sinalização que regulam o metabolismo, sobrevivência, crescimento e diferenciação celular, bem como o tráfego de vesículas intracelulares. A proteína Akt é ativada por uma variedade de estímulos, incluindo fatores de crescimento, TCE e isquemia (Ouyang et al., 1999; Noshita et al., 2002). A Akt ativada exerce ação de sobrevivência celular por ativar ou inibir muitos alvos citoplasmáticos tais como: Bcl-2 associado ao promotor de morte (Bad), a proteína glicogênio sintase-cinase-3 (GSK-3), pró-caspase-9 e proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc (CREB) (Datta et al., 1999).

Estudos anteriores em nosso laboratório também demonstraram que a inibição da atividade de proteínas cinases específicas, tais como a proteína cinase A (PKA) e PI3K, bloqueia o efeito protetor promovido pelo pré-condicionamento com NMDA contra as convulsões induzidas pelo AQ (de Araújo Herculano et al., 2011), revelando a participação destas vias de sinalização no mecanismo da neuroproteção. Outros grupos também relacionam as proteínas PKC e MAPK à tolerância promovida pelo pré-condicionamento, já que a inibição da PKC ϵ e MEK/ERK que fosforila e ativa ERK1/2, abolem o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA *in vitro* frente à privação de glicose e oxigênio (Jia et al., 2007). A ativação da PKA tem sido demonstrada em modelos de pré-condicionamento isquêmico induzido por desflurano através da ativação da CREB (Marais et al. 2008; Redel et al., 2008).

Miyawaki e colaboradores, (2008) demonstraram que a PI3K e a inibição de eventos subsequentes (do inglês - *downstream*) como a Akt reduz a neuroproteção induzida pelo pré-condicionamento isquêmico. Outro grupo utilizando modelo de isquemia *in vitro* em neurônios corticais, também demonstrou que a tolerância isquêmica induzida pelo pré-condicionamento é mediada principalmente pela ativação da via PI3K/Akt e não tem envolvimento da via das MAPKs (Bhuiyan et al., 2011). Em contrapartida, um estudo *in vivo*, utilizando o modelo de isquemia cerebral na neuroproteção induzida por dexmedetomidina, um anestésico, confirmou que a neuroproteção é mediada pela ativação da PI3K/Akt e ERK1/2, bem como a fosforilação e consequente inibição da GSK-3 β (Zhu et al., 2013).

Assim, torna-se de fundamental importância a elucidação dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes a este fenômeno de neuroproteção endógena, bem como avaliar as vias de sinalização e outros sistemas de neurotransmissores ou neuromoduladores envolvidos. Além disso, o pré-condicionamento químico representa uma estratégia farmacológica interessante para reduzir o processo excitotóxico desencadeado pela excessiva ativação da transmissão glutamatérgica.

2 JUSTIFICATIVA

Este trabalho está voltado para uma temática de crescente interesse no cenário científico, a qual está relacionada com o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas, as quais apresentam em comum uma exacerbação na transmissão mediada pelo neurotransmissor glutamato. Desta forma, o presente estudo contribui para identificar estratégias de neuroproteção que possam modular a transmissão glutamatérgica, o que é de fundamental importância para a compreensão do desenvolvimento de mecanismos fisiológicos e patológicos no SNC. Tendo em vista o papel neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA, bem como, a participação dos receptores de adenosina e das vias de sinalização celular, entende-se que estes mecanismos possam desempenhar funções associativas no SNC e que possam ser uma via comum e eficiente de prevenção contra neuropatologias que envolvam o sistema glutamatérgico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessa atividade. É avaliada a participação dos receptores de adenosina, bem como, as vias de sinalização envolvidas, e a possível alteração na expressão de proteínas relacionadas à sobrevivência celular e à transmissão glutamatérgica.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Compreender possíveis alterações mediadas pelo pré-condicionamento com NMDA na expressão e propriedades de união do ligante aos receptores de adenosina (A_1R e $A_{2A}R$) no hipocampo de camundongos;

3.2.2 Determinar o envolvimento funcional dos receptores A_1R e $A_{2A}R$ na modulação da captação de glutamato e no comportamento de camundongos submetidos ao pré-condicionamento com NMDA;

3.2.3 Investigar os efeitos do pré-condicionamento com NMDA sobre alterações na comunicação entre as vias de sinalização intracelular (PI3K/Akt e MAPKs) envolvidas na prevenção de convulsões e de morte celular induzidas pelo AQ, no hipocampo de camundongos;

3.2.4 Avaliar o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA frente à toxicidade induzida por AQ em cultura primária de neurônios e em fatias hipocâmpais.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos encontram-se nos seus respectivos capítulos, descritos na sessão dos resultados.

4 RESULTADOS

Os resultados desta Tese estão divididos na forma de capítulos, seguindo a distribuição abaixo:

Capítulo I: Estudo da modulação dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} em camundongos pré-condicionados com NMDA.

Capítulo II: Mecanismos e comunicação entre as vias de sinalização intracelular (PI3K/Akt e MAPKs) moduladas pelo pré-condicionamento com NMDA envolvidos na prevenção de convulsões e de morte celular hipocampal induzidas pelo ácido quinolínico.

Capítulo III: Efeito do pré-condicionamento com NMDA sobre a toxicidade induzida por ácido quinolínico em cultura primária de neurônios e em fatias hipocampais.

Parte da tese foi desenvolvida durante o estágio de doutorado sanduíche no período de fevereiro a setembro de 2013, financiado pelo programa Ciências sem Fronteiras do CNPq. O estágio foi realizado na Universidade de Barcelona – Unidade de Farmacologia – Departamento de Patologia e Terapêutica Experimental, sob supervisão do professor Dr. Francisco Ciruela.

CAPÍTULO I

Estudo da modulação dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} em camundongos pré-condicionados com NMDA

Este capítulo apresenta os resultados relacionados aos objetivos 3.2.1 e 3.2.2 desta tese. Os resultados relativos ao efeito do pré-condicionamento com NMDA sobre a modulação dos receptores A_{2A} está apresentado a seguir, bem como, parte da descrição dos resultados comportamentais referentes ao receptor A₁. Os demais dados sobre a modulação dos A₁R em animais pré-condicionados com NMDA estão apresentados na forma de artigo científico (Anexo do Capítulo I), submetido ao periódico *Neuroscience*, intitulado: *Adenosine A₁ receptor activation modulates N-methyl-D-aspartate (NMDA) preconditioning phenotype in the brain.*

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos, adultos (30-40 g), mantidos em temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ em um ciclo de 12 horas claro (a partir das 7 horas) e 12 horas escuro, em caixas plásticas (15 animais por caixa) com água e ração disponíveis. Todos os experimentos foram realizados entre às 9:00 – 16:00 horas, após a aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética Institucional local para Pesquisa Animal (CEUA/UFSC PP0549). Os nossos protocolos para experimentos com animais são projetados de maneira que o animal tenha o mínimo de sofrimento possível.

1.2 Fármacos

Os seguintes fármacos foram utilizadas nos experimentos: N-metil-D-aspartato (NMDA), hidrocloreto de 4-[2-[[6-Amino-9-(N-etil-b-Dribofuranuronamidossil) 9H-purina-2-il]amino]etil]benzenopropanóico (CGS21680) e 4-(2-[7-amino-2-(2-furil)-[1,2,4]triazolo[2,3-a]-[1,3,5]triazina-5-ilamino]etil)fenol (ZM241385), todos da Sigma-Aldrich Chemical Co (MO, USA). Todos os fármacos foram diluídas em salina 0,9% com 0,4% de dimetilsulfóxido (DMSO), exceto NMDA que foi diluído apenas em salina 0,9% e ajustado pH 7,4 com NaOH 1N. A administração dos fármacos foi via i.p. em um volume constante de 10 mL/Kg de peso corporal. [^3H] CGS21680 (40,5 Ci/mmol) Perkin Elmer (MA, USA) e [^3H]L-Glutamato (31.0 Ci/mmol), GE-Healthcare (UK).

1.3 Pré-condicionamento com NMDA e tratamentos com os ligantes $A_{2A}R$

Os animais foram pré-tratados com uma dose considerada sub-tóxica e não convulsiva de NMDA (75 mg/Kg; i.p.) ou veículo (salina 0,9%; i.p.). Imediatamente após a administração de NMDA os animais foram observados por 30 min, para ocorrência de alguma alteração comportamental (Boeck, et al., 2004).

Após 24h do pré-condicionamento com NMDA os animais foram tratados com agonista $A_{2A}R$ CGS21680 (0,05mg/Kg, i.p.) ou antagonista $A_{2A}R$ ZM241385 (0,1 mg/Kg, i.p.). Ambos foram administradas 30 min antes da avaliação comportamental em

experimentos separados. As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios (Listos et al., 2011; Lucena et al., 2013).

1.4 Imunodeteção dos receptores A_{2A} de adenosina

1.4.1 Preparação das amostras

Os animais foram pré-tratados com NMDA (75 mg/Kg, i.p.) ou veículo (salina 0,9%, i.p.) e após 24 h foram mortos por decaptação e os hipocampus rapidamente removidos. Durante a dissecação os hipocampus foram mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; 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 7,4. Em seguida foram solubilizados em tampão de extração de proteínas contendo 4 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), 2 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 8% β-mercaptoethanol, e 50 mM Tris (pH 6.8) (Molz et al., 2008).

1.4.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada por método de Peterson (1977). Albumina Bovina Sérica (BSA) (Sigma) foi utilizada como padrão.

1.4.3 Separação de proteínas

As proteínas (60 µg/poço) foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS), utilizando gel de separação de poliacrilamida com concentração de 10%, 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.

1.4.4 Eletrotransferência e imunodeteção

As proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45 µm) (1,5 horas a 4°C, 350 mA). Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 1 h com

albumina 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). Finalmente as membranas foram incubadas com os anticorpos específicos anti-A_{2A}R (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:200), anti-beta actina (Cell Signalling, diluição 1:1000). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário (ligado à peroxidase) anti-rabbit (Millipore, diluição 1:2000) ou anti-mouse (Millipore, diluição 1:5000) e após lavagens, foram reveladas em filme autoradiográfico após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose (Kit ECL), de acordo com as recomendações do fabricante, e impressão de imagem em filme auto-radiográfico. As imagens foram digitalizadas para quantificação densitométrica das bandas protéicas dos complexos imunes (software Scion Image, Beta 4.0.2; Scion Corporation, Frederick, MD).

1.5 Estudo de união dos receptores A_{2A} de adenosina

1.5.1 Preparação das membranas hipocampus

Os procedimentos foram realizados conforme o método descrito por Bruns et al. (1986), com algumas modificações. Vinte e quatro horas após o pré-tratamento com NMDA (75 mg/Kg, i.p.) ou veículo (salina 0,9%, i.p.) os animais foram mortos e os seus hipocampus foram dissecados e homogeneizados em 1 mL de 50 mM Tris-HCl gelado, contendo 320 mM sacarose, 1 mM EDTA e 10 mM MgCl₂, pH 7,4. O homogeneizado foi centrifugado a 1,600 *xg* durante 10 min, e o sobrenadante obtido a partir desta centrifugação foi centrifugado a 16.000 *xg* durante 30 min. O precipitado obtido da centrifugação foi suspenso em uma solução contendo 50 mM Tris-HCl, EDTA 1 mM e 10 mM MgCl₂, pH 7,4, com 4 U/mL de ADA e incubadas durante 30 min a 37 ° C para remover a adenosina endógena. Esta suspensão foi centrifugada a 16,000 *xg* durante 15 min. O precipitado foi suspenso em solução de incubação contendo 50 mM Tris-HCl, EDTA 1 mM e MgCl₂ 10 mM, pH 7,4 e utilizado para os ensaios de união. Estas membranas foram congeladas a -20°C durante 2 dias. No dia do ensaio, as membranas foram descongeladas à temperatura ambiente, e foram suspensas no mesmo tampão a uma concentração de proteína de aproximadamente 1 mg/mL e utilizadas para ensaios de união. Não foram observadas diferenças entre os resultados do ensaio de união entre as membranas frescas ou congeladas.

1.5.2 Ensaio de união

Para os estudos de união do $A_{2A}R$, foi utilizado o agonista seletivo, [3H]CGS21680. Para isso o [3H]CGS21680 foi incubado durante 1h a 30°C com 50 μ g de proteína de membrana em um volume final de 500 μ L de uma solução contendo 50 mM Tris - HCl, EDTA 1 mM e 3 mM $MgCl_2$, pH 7,4 com BSA (1 mg/mL). Os ensaios de união de $A_{2A}R$ foram realizados com a concentração de 100 nM [3H]CGS21680, baseada em uma curva de padronização realizada anteriormente. A incubação do ensaio de união foi interrompida por filtração a vácuo através de filtros de fibra de vidro Whatman GF/B pré-umedecidos com polietilenoimina (0,1 %), seguido por três lavagens com 1 mL de uma solução contendo 50 mM Tris - HCl, 1 mM de EDTA e 10 mM $MgCl_2$, pH 7,4, mantida a 4°C. Os filtros foram secos à temperatura ambiente, colocados em frascos de cintilação, e foi adicionado 1 mL de líquido de cintilação. A radioatividade ligada aos filtros foi determinada após 12 horas em um contador de cintilação líquida com uma eficiência de 60 %. Todos os ensaios de união foram realizados em triplicatas e em tubos de polipropileno (Tasca e Souza, 2000). Os resultados foram calculados e expressos como fmol [3H]CGS21680/mg de proteína.

1.6 Avaliação da memória contextual aversiva pelo teste do condicionamento do medo contextual

Os procedimentos foram baseados nos descritos anteriormente por Pamplona e colaboradores (2011). Vinte e quatro horas após o pré-tratamento com NMDA (75 mg/Kg, i.p.) ou veículo (salina 0,9%, i.p.) os animais foram colocados em uma câmara de condicionamento e 3 min depois receberam um choque elétrico, não doloroso, nas patas (1,5 mA, 2 s). Eles permaneceram na câmara de condicionamento por mais 60 s, antes de retornarem às suas caixas. A câmara de condicionamento foi limpa com solução de etanol (70%) entre as duas exposições. No dia do teste, 24 horas após a sessão de condicionamento, os animais foram tratados com CGS21680 (0,05 mg/Kg, i.p.) ou ZM241385 (3 mg/Kg, i.p.) para a avaliação do $A_{2A}R$ e com CCPA (0,2 mg/Kg, i.p.) e DPCPX (3 mg/Kg, i.p.) para a avaliação do A_1R , 30 min depois foram testados no novo ambiente (câmara acrílica 25 x 25 cm) durante 3 min. Imediatamente após, os camundongos foram testados na câmara de contexto por 3 min. O tempo de congelamento (do inglês – *freezing*) foi anotado em ambos os ambientes. Um grupo independente de animais foi

testado na mesma câmara, a fim de avaliar a sensibilidade ao choque e verificar se o pré-condicionamento com NMDA interfere com esta resposta.

1.7 Captação de L-[³H]glutamato

A captação de L-[³H]glutamato em fatias de hipocampo foi avaliada como previamente descrito (Molz et al., 2005). Após o pré-tratamento com NMDA (75 mg/Kg, i.p.), CGS21680 (0,05 mg/Kg, i.p.) ou ZM241385 (3 mg/Kg, i.p.) os animais foram mortos, os hipocampus dissecados e as fatias hipocampais (0,4 mm de espessura) foram preparadas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain e incubadas durante 30 minutos em tampão KRB, a fim de retornarem às condições fisiológicas após a realização dos cortes. Fatias hipocampais foram, em seguida, lavadas durante 15 min a 37°C com uma solução tampão de Hank (HBSS), a composição em mM: 1,29 CaCl₂, 136,9 NaCl, 5,36 KCl, 0,65 MgSO₄, 0,27 Na₂HPO₄, 1,1 de KH₂PO₄, 5 e HEPES. A captação foi avaliada através da adição de 0,33 µCi/ml de L-[³H] glutamato com 100 µM de glutamato em um volume final de 300 µL. A incubação foi interrompida imediatamente após 7 min, descartando o meio de incubação e as fatias foram submetidas a duas lavagens com 1 mL de HBSS gelado. As fatias foram solubilizadas pela adição de uma solução com 0,1% NaOH/0,01% de SDS e incubadas durante a noite. Alíquotas das fatias lisadas foram utilizadas para determinação do conteúdo intracelular de L-[³H]glutamato por contagem de cintilação líquida. A captação independente de sódio foi determinada usando o cloreto de colina, ao invés de cloreto de sódio no tampão de HBSS. A captação inespecífica, independente de sódio, foi subtraída da captação total para obter a captação de glutamato específica dependente de sódio. Os resultados foram obtidos e apresentados como nmol de L-[³H]glutamato captado por miligrama de proteína por minuto.

1.8 Dosagem de proteínas

A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando BSA (Sigma) como padrão.

1.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t não pareado para as imunodeteções de proteínas e ensaios de união. As

comparações entre os grupos de testes comportamentais e análise de captação de glutamato foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas em > 95% de confiança em todos os testes.

2 RESULTADOS

2.1 Pré-condicionamento com NMDA e avaliação dos receptores A_{2A}

A fim de avaliar as alterações na biologia dos receptores de adenosina do subtipo A_{2A} ($A_{2A}R$) no hipocampo de camundongos pré-tratados com NMDA, foi analisada a expressão do receptor e as propriedades de união de um ligante seletivo após o pré-condicionamento. Em primeiro lugar, a imunodeteção do $A_{2A}R$ em homogeneizado total de hipocampo foi determinada por imunodeteção de proteínas e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e pré-condicionado com NMDA (Fig. 1A).

Posteriormente, os ensaios de união de radioligandos ao receptor A_{2A} foram realizados, através da utilização de concentração saturante do ligante seletivo, [3H]CGS21680 (100 nM). O pré-condicionamento com NMDA não alterou a união (B_{max}) do ligante seletivo [3H]CGS21680 ao $A_{2A}R$ (Controle: B_{max} = $2,4 \pm 0,3$ fmol/mg proteína; NMDA: B_{max} = $3,6 \pm 0,7$ fmol/mg proteína) (Fig. 1B).

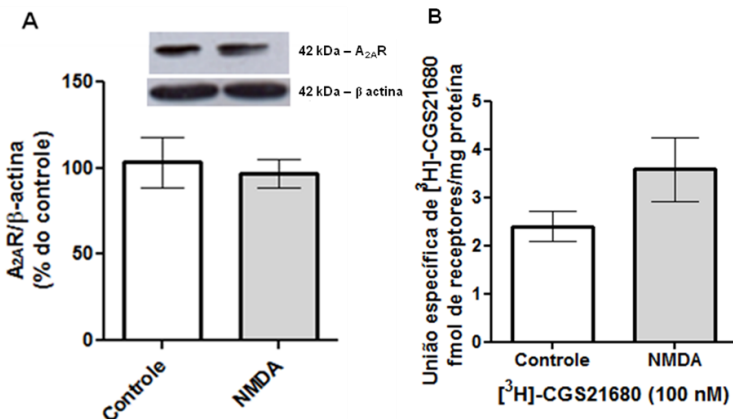


Figura 1: Imunodeteção e propriedades de união do receptor A_{2A} no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NMDA. Os animais foram pré-tratados com NMDA (75 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina 0,9%, i.p.) e 24 h depois os hipocampus foram dissecados, realizado a preparação de amostras para a imunodeteção dos níveis de $A_{2A}R$ e ensaio de união de $A_{2A}R$. **(A)** Representa a imunodeteção de $A_{2A}R$ no hipocampo de camundongos pré-condicionados. As amostras de hipocampo total do grupo controle ou pré-condicionado com NMDA foram analisadas por *Western blot* com anticorpo anti- $A_{2A}R$ ou anticorpo anti- β - actina. A densidade óptica das bandas foi detectada conforme descrito nos procedimentos experimentais. A razão entre $A_{2A}R$ e β -actina foi calculada e normalizada pela razão do grupo controle. Os dados são expressos como a média \pm EPM (n=5). **(B)** União de [3H]CGS21680 (100nM) em $A_{2A}R$ de preparações de membrana hipocampal. Os dados são expressos como a média \pm EPM (n=5).

Com o intuito de avaliar uma possível modulação da funcionalidade dos receptores A_{2A} de adenosina desencadeada pelo pré-condicionamento com NMDA, foi realizado um teste comportamental relacionado com a função do hipocampo, o teste do condicionamento do medo contextual, que avalia memória aversiva (Goossens, 2011).

Para isto, os animais foram pré-condicionados com NMDA e após 24h foram tratados com CGS21680 (0,05 mg/kg, i.p.), 30 min após foram submetidos ao teste do condicionamento do medo contextual. O pré-condicionamento com NMDA, a ativação do $A_{2A}R$ pelo seu agonista CGS21680 (0,05 mg/kg, i.p.), e a interação entre ambos os tratamentos não alterou o tempo de *freezing* durante a reexposição ao ambiente contexto, (ANOVA de duas vias: NMDA [F(1,28)= 4,4537, P>0,05], CGS21680 [F(1,28)= 8,5296, P>0,05], e interação [F(1,28)= 0,29408, P>0,05]) (Fig. 2A).

No novo ambiente, a mesma análise demonstrou que o pré-condicionamento com NMDA e a interação entre os tratamentos (NMDA + CGS21680) também não alterou o tempo de *freezing* dos animais em relação aos controles (NMDA [F(1,28)= 2,2587, P>0,05], interação [F(1,28)= 5,6178, P>0,05]. No entanto, um aumento significativo foi observado para os animais não pré-condicionados tratados com CGS21680 [F(1, 28)=5,3948, P<0,05] (Fig. 2B). Estes resultados indicam que o agonista seletivo $A_{2A}R$, CGS21680 (0,05 mg/kg), aumentou o tempo de *freezing* dos animais durante a exposição ao novo ambiente. O pré-condicionamento com NMDA não afetou o tempo de *freezing* dos animais *per se*, mas preveniu a resposta observada após a ativação do receptor A_{2A} pelo seu agonista.

O efeito do bloqueio da ativação do $A_{2A}R$ pelo seu antagonista seletivo e a interação com o pré-condicionamento com NMDA também foi avaliado. Os animais pré-condicionados com NMDA foram tratados com ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.) e após 30 min submetidos ao teste do

condicionamento do medo contextual. O pré-condicionamento com NMDA, ZM241385 e a interação entre o pré-condicionamento e o antagonista $A_{2A}R$ não alteraram o tempo de *freezing* dos animais testados no ambiente contexto (NMDA [F(1,27)=1,3647, P>0,05], ZM241385 [F(1,27)=,78686, P>0,05], interação [F(1,27)=,35959, P>0,05]) (Fig. 2C). A mesma resposta foi observada no novo ambiente para o pré-condicionamento com NMDA, bloqueio da ativação do $A_{2A}R$ pelo ZM241385 e interação entre os tratamentos (NMDA [F(1,27)=,35765, P>0,05], ZM241385 [F(1,27)=3,2506, P>0,05], interação [F(1,27)=,02364, P>0,05]) (Fig. 2D).

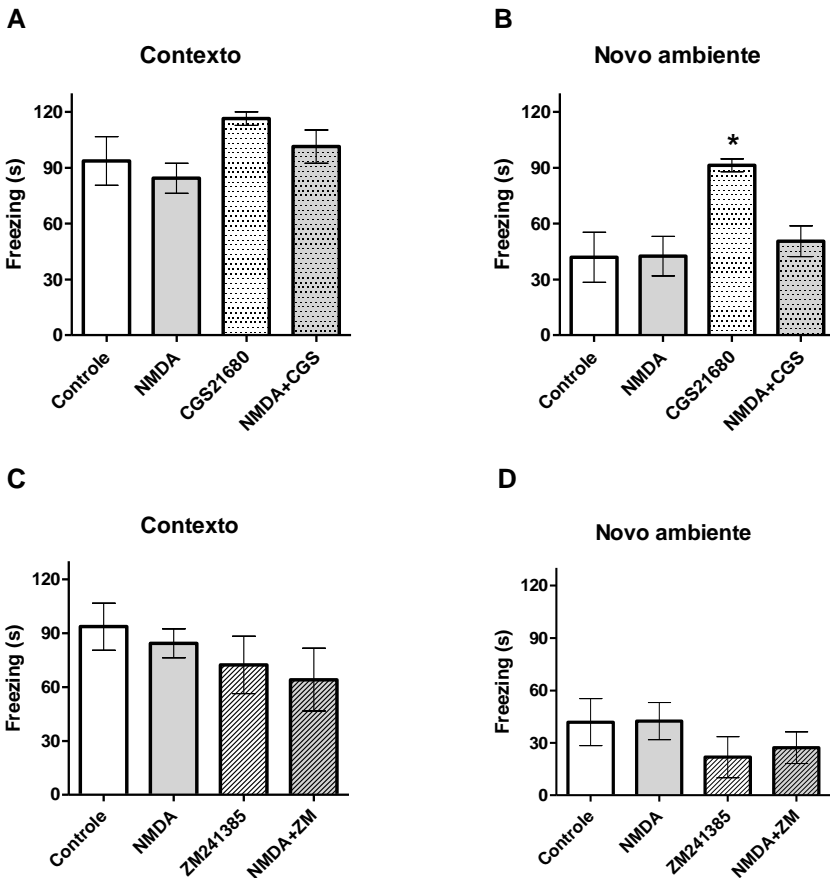


Figura 2: Efeito do pré-condicionamento com NMDA e a modulação do A_{2A}R no teste do condicionamento do medo contextual. Os animais foram pré-tratados com NMDA (75 mg/kg, i.p.) ou solução salina 0.9% e 24 h depois foram submetidos ao condicionamento ao contexto no qual receberam uma estimulação eléctrica (1,5 mA, 2 s). Vinte e quatro horas após o condicionamento ao contexto os animais foram administrados com um agonista seletivo A_{2A}R, CGS21680 (0,05 mg/kg, i.p.) ou antagonista seletivo A_{2A}R, ZM241385 (3 mg/kg, i.p.), 30 minutos antes da exposição ao novo ambiente ao ambiente contexto. **(A)** Efeitos do pré-condicionamento com NMDA e agonista A_{2A}R no tempo de *freezing* no ambiente contexto. **(B)** Efeitos do pré-condicionamento com NMDA e agonista A_{2A}R no tempo de *freezing* no novo ambiente. (n= 8). **(C)** Efeitos do pré-condicionamento com NMDA e antagonista A_{2A}R no tempo de *freezing* no contexto. **(D)** Efeitos do pré-condicionamento com NMDA e antagonista A_{2A}R no tempo de *freezing* no novo ambiente (n = 7-8). Os dados apresentados em gráficos de barras representam as médias ± EPM * P < 0,05 comparado com os demais grupos, (ANOVA duas vias seguida do teste de Newman Keuls).

Considerando que a retirada de glutamato do espaço extracelular é um mecanismo de proteção importante relacionado com a redução da excitotoxicidade glutamatérgica (Schousboe e Waagepetersen, 2005), foi avaliado o pré-condicionamento com NMDA (75 mg/Kg, i.p.) e a modulação do receptor A_{2A} de adenosina sobre a captação de glutamato. Como mostra a figura 3A, 24 h após o pré-condicionamento com NMDA (75mg/Kg, i.p.) observa-se um aumento significativo da captação de glutamato no hipocampo, em relação aos animais controle. Já foi demonstrado que neste período (24 h após a administração de NMDA) o pré-condicionamento com NMDA previne a indução de convulsões por AQ (Boeck et al., 2004). A ativação do A_{2A}R pelo seu agonista seletivo (CGS21680, 0,05 mg/kg, i.p.), reverte este efeito. Além disso, o CGS21680 *per se*, não altera a captação de glutamato basal quando comparado com o grupo controle. No entanto, o mesmo efeito é observado para o antagonista A_{2A}R, ZM241385 (3 mg/kg, i.p.), (Fig. 3B).

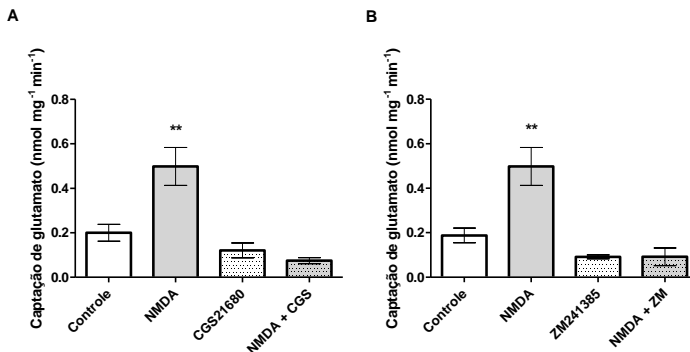


Figura 3: Efeito do pré-condicionamento com NMDA e a modulação do A_{2A}R na captação de L-[³H]glutamato em fatias hipocâmpais. Os animais foram pré-tratados com NMDA (75 mg/kg, i.p.) ou solução salina 0,9% e, após 24 h, foram administrados com um agonista seletivo A_{2A}R, CGS21680 (0,05 mg/kg, i.p.) ou antagonista seletivo A_{2A}R, ZM241385 (3 mg/kg, i.p.) e após 30 min as fatias de hipocampo foram preparadas para o ensaio de captação de glutamato *in vitro*. **(A)** Efeito do pré-condicionamento com NMDA e da administração do agonista seletivo A_{2A}R na captação de L-[³H]glutamato em fatias de hipocampo. **(B)** Efeito do pré-condicionamento com NMDA e da administração do antagonista seletivo de A_{2A}R na captação de L-[³H]glutamato em fatias de hipocampo. Os dados representam a média ± EPM. ** P < 0,01 comparado com os demais grupos, (n = 5-7) (ANOVA duas vias seguida do teste de Newman Keuls).

2.2 Pré-condicionamento com NMDA e avaliação dos receptores A₁

O efeito do pré-condicionamento com NMDA e a modulação dos receptores A₁ também foram analisados no teste do condicionamento do medo contextual que avalia memória aversiva. Para isto, os animais foram pré-condicionados com NMDA (75 mg/Kg i.p.), 24 h após foram submetidos ao condicionamento do contexto no qual receberam um estímulo elétrico (1.5 mA, 2 s) e 24 h após o condicionamento do contexto receberam uma dose sub-analgésica do agonista A₁, CCPA (0,2 mg/Kg i.p.) ou antagonista A₁, DPCPX (3 mg/Kg i.p.) ou salina 0,9%, 30 min antes da exposição ao novo ambiente e ao contexto.

A análise dos dados utilizando ANOVA de duas vias revelou um efeito não significativo para o pré-condicionamento com NMDA [F(1,19)= 1,7190; P>0,05], tratamento com CCPA [F(1,19)= 3,0529; P>0,05] e para a interação do pré-condicionamento com NMDA e a ativação do receptor A₁ pelo seu agonista seletivo, o CCPA (0,2 mg/Kg

i.p.) [$F(1,19)=0,0020$; $P>0,05$], no tempo de *freezing* durante a re-exposição ao ambiente contexto (Fig. 4A).

No novo ambiente, a mesma análise revelou um efeito não significativo para o pré-condicionamento com NMDA [$F(1,19)= 0,8992$; $P>0,05$] e para a interação entre os fatores pré-condicionamento com NMDA e ativação de A₁R pelo agonista CCPA [$F(1,19)=0,3162$; $P>0,05$]. Entretanto, um efeito significativo foi observado para o tratamento com CCPA [$F(1,19)= 23,968$; $P<0,05$] (Fig. 4B). Estes resultados indicam que o agonista seletivo do A₁R CCPA (0,2 mg/Kg) aumenta o tempo de *freezing* durante a exposição ao novo ambiente, enquanto que o pré-condicionamento com NMDA não afetou o tempo de *freezing* dos animais, tampouco a resposta de ativação do A₁R pelo CCPA.

Analisando o efeito do bloqueio da ativação do A₁R pelo seu antagonista seletivo DPCPX (3 mg/Kg i.p.), observa-se que a ANOVA de duas vias revelou um efeito não significativo para o pré-condicionamento com NMDA [$F(1,23)= 1,8454$; $P>0,05$], tratamento com DPCPX [$F(1,23)= 0,2998$; $P>0,05$] e interação entre ambos os tratamentos [$F(1,23)=0,0425$; $P>0,05$] para o teste do condicionamento do medo contextual quando o antagonista A₁R foi testado no ambiente contexto. A mesma resposta do DPCPX foi observada no novo ambiente para o pré-condicionamento com NMDA [$F(1,23)= 0,5455$; $P>0,05$] e a interação entre NMDA e DPCPX [$F(1,23)= 0,1275$; $P>0,05$]. Um efeito do tratamento com DPCPX foi observado [$F(1,23)= 7,5144$, $P=0,01$], embora a análise estatística não mostrou efeito significativo. Juntos, estes resultados sugerem que a ativação do A₁R promoveu uma generalização do medo, independente do pré-condicionamento com NMDA.

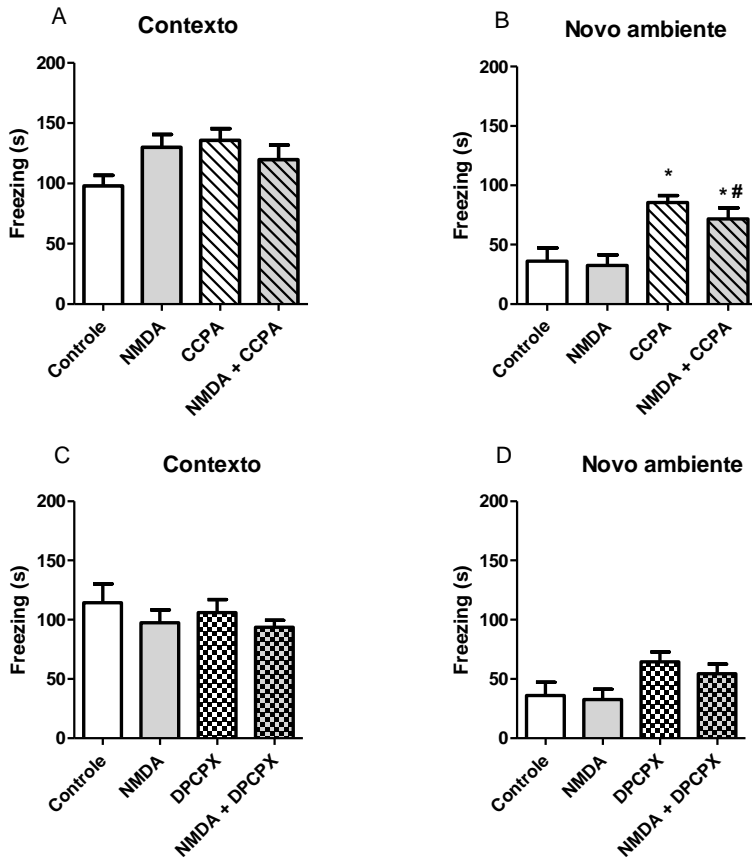


Figura 4: Efeito do pré-condicionamento com NMDA e a ativação do A1R no teste do condicionamento do medo contextual. Os animais foram pré-tratados com NMDA (75 mg/kg, i.p.) ou solução salina 0,9% e 24 h depois foram submetidos ao condicionamento ao contexto no qual receberam uma estimulação eléctrica (1,5 mA, 2 s). Vinte e quatro horas após o condicionamento ao contexto os animais foram administrados com um agonista seletivo A₁R, CCPA (0,2 mg/kg) ou antagonista seletivo, DPCPX (3 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da exposição ao novo ambiente e ao ambiente contexto. (A) Efeitos do pré-condicionamento com NMDA e agonista A₁R no tempo de *freezing* no ambiente contexto. (B) Efeitos do pré-condicionamento com NMDA e agonista A₁R no tempo de *freezing* no novo ambiente (n= 5-6). (C) Efeitos do pré-condicionamento com NMDA e do antagonista do A₁R, DPCPX tempo de *freezing* no contexto. (D) Efeitos do pré-condicionamento com NMDA e do antagonista A₁R, DPCPX no tempo de *freezing* no novo ambiente (n= 6-8). Os dados apresentados em gráficos de barras representam as médias ± EPM. * P<0,05 comparado com o grupo salina, # P<0,05 comparado com grupo NMDA, (ANOVA duas vias seguida do teste de Newman Keuls).

ANEXO DO CAPÍTULO I

ADENOSINE A₁ RECEPTOR ACTIVATION MODULATES N-METHYL-D-ASPARTATE (NMDA) PRECONDITIONING PHENOTYPE IN THE BRAIN

Leandra C. Constantino^a, Fabrício A. Pamplona^c, Filipe C. Matheus^b, Fabiana K. Ludka^{a,d}, Maricel Gomez-Soler^e, Francisco Ciruela^c, Carina R. Boeck^f, Rui D. Prediger^b, Carla I. Tasca^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, ^bDepartamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

^cD'Or Institute for Research and Education (IDOR), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^dCurso de Farmácia, Universidade do Contestado – UnC, 89460-000, Canoinhas, SC, Brazil.

^eUnitat de Farmacologia, Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, IDIBELL-Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain.

^fLaboratório de Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-graduação Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC, Criciúma, 88806-000, SC, Brazil.

Running title: A₁R activation modulates NMDA preconditioning

Number of pages: 26

Abstract: 240 words

Main text: 4,628 words

References: 1,360 words

Fig. legends: 533 words

***Corresponding author:**

Carla I. Tasca, PhD

Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC

Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

Telephone number: + 55 48 3721-5046

FAX number: + 55 48 3721-9672

E-mail: carla.tasca@ufsc.br

Abstract

N-methyl-D-aspartate (NMDA) preconditioning is induced by subtoxic doses of NMDA and it promotes a transient state of resistance against subsequent lethal insults. Interestingly, this mechanism of neuroprotection depends on adenosine A₁ receptors (A₁R), since blockade of A₁R precludes this phenomenon. In this study we evaluated the consequences of NMDA preconditioning on the hippocampal A₁R biology (i.e. expression, binding properties and functionality). Accordingly, we measured A₁R expression in NMDA preconditioned mice (75 mg/kg, i.p.; 24h) and showed that neither the total amount of receptor, nor the A₁R levels in the synaptic fraction was altered. In addition, the A₁R binding affinity to the antagonist [³H] DPCPX was increased in total membrane extracts of hippocampus from preconditioned mice. Next, we evaluated the impact of NMDA preconditioning on A₁R functioning by measuring the A₁R-mediated regulation of glutamate uptake into hippocampal slices and on behavioral responses in the open field and hot plate tests. NMDA preconditioning increased glutamate uptake into hippocampal slices without altering the expression of glutamate transporter GLT-1. NMDA preconditioning also induced antinociception in the hot plate test and both effects were reversed by post-activation of A₁R with the agonist CCPA (0.2 mg/kg, i.p.). NMDA preconditioning or A₁R modulation did not alter locomotor activity in the open field. Overall, the results described herein provide new evidence that NMDA preconditioning increases A₁R binding affinity, and that A₁R modulates NMDA preconditioning-mediated responses, pointing to the importance of the cross-talk between glutamatergic and adenosinergic systems to neuroprotection.

Keywords: NMDA preconditioning; adenosine A₁ receptors; hippocampus; glutamate; pain.

1. Introduction

Preconditioning was originally described in a seminal study proposing that multiple brief ischemic episodes protect the heart from a subsequent sustained ischemic insult (Murry et al., 1986). Interestingly, this preconditioning phenomenon is not limited to the heart tissue but also extended to the central nervous system (CNS) and protection may be achieved, not only against ischemia, but also to different brain insults. Preconditioning can be defined as reaching a state of protection in a given tissue or organism through exposure to sub-lethal insults. Preconditioned individuals or tissues acquire a certain tolerance to a subsequent lethal insult, decreasing cell death resultant from injury (Dirnagl et al., 2003; Murry et al. 1986). This brain tolerance to lethal injury may be achieved after chemical, electrical or anoxic stimuli (Bond et al., 1999; Rejdak et al., 2001, Schaller et al., 2002, Samoilov et al., 2003).

Molecular mechanisms underlying preconditioning are not completely elucidated, but N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors, nitric oxide synthase, cytokines, oxidative stress and mitochondrial bioenergetics modulation and suppression of the innate immune system are some of the elements that have a pivotal role in such process (Vandresen-Filho et al., 2007; Shpargel et al., 2008; Severino et al., 2011; Boeck et al., 2013). Particularly, NMDA and glutamate may act as chemical preconditioning agents in hippocampal slices (Schurr et al. 2001), in cultured cells (Xu et al., 2002) and *in vivo* models of excitotoxicity (Boeck et al. 2004). Subtoxic doses of NMDA (e.g., 75 mg/kg, i.p.) yield preconditioning against chemically-induced seizures (Ogita et al. 2003; Boeck et al. 2004) or trauma brain injury *in vivo* (Costa et al., 2010). Administration of NMDA receptor antagonists, such as MK-801 or ketamine, prevents NMDA-induced preconditioning, confirming the dependence on NMDA receptors activation to achievement of a preconditioned state (Bond et al. 1999; Rejdak et al. 2001; Schaller et al. 2002; Samoilov et al. 2003). Regarding intracellular signaling pathways, we have shown that inhibition of protein kinase A (PKA) or phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathways activation abolishes NMDA preconditioning against the neurotoxicity and seizures induced by quinolinic acid, an NMDA receptor agonist (de Araújo Herculano et al., 2011). Moreover, a proteomic analysis of the hippocampus of NMDA preconditioned mice, showed a differential expression of proteins involved in translation and in protein processing,

in the energy homeostasis maintenance and modulation of glutamatergic transmission (do Amaral e Silva Müller et al., 2013).

The dependence of NMDA preconditioning on adenosine A₁ receptors (A₁R) activation has already been reported *in vivo* and *in vitro*. For instance, the blockade of A₁R with the selective antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine was able to abolish the protective effect evoked by NMDA preconditioning against quinolinic acid-induced seizures in mice (Boeck et al., 2004) or in cerebellar granule cells challenged with glutamate (Boeck et al., 2005). The cellular protection achieved by chemical preconditioning with NMDA occurs by increasing extracellular adenosine levels (Hoehn and White, 1990; Craig and White, 1993; Melani et al., 1999). In its turn, adenosine modulates glutamatergic excitotoxicity caused by overstimulation of NMDA receptors (Poli et al., 1991). Glutamatergic transmission in the hippocampus is also part of a nociceptive pathway, since blockade of NMDA receptors in the hippocampus prevent the induction of chemical pain by formalin (corodimasMcKenna and Melzack, 2001). Since activation of A₁R reduces glutamatergic transmission, modulation of nociception via A₁R inhibition of glutamate release may be a viable mechanism of analgesia (Nascimento et al, 2010). In the present study, we aimed to understand potential NMDA preconditioning-mediated changes in hippocampal A₁R expression and binding properties that may underlie the neuroprotective mechanism of this phenomenon. Moreover, a putative effect of A₁R activation after NMDA preconditioning on its effects on glutamate uptake into hippocampal slices and in behavioral responses in the open field and hot plate tests was assessed.

2 Experimental procedures

2.1 Animals

Male adult Swiss albino mice (30–40g) were maintained on a 12 hours light/ 12 hours dark schedule (lights on at 7:00 a.m.) at 25°C. Mice were housed in plastic cages with food and water *ad libitum*. All manipulations were carried out between 9:00 and 16:00 hours. All experimental procedures involving the animals were performed in accordance with National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23), and were designed to minimize suffering and limit the number of animals used. The experiments were performed after approval of the protocol by the

local Institutional Ethics Committee for Animal Research (CEUA/UFSC PP0549).

2.2. Drugs

N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-chloro-N⁶-cyclopentyl-adenosine (CCPA) was from Sigma-Aldrich Chemical Co (MO, USA). [³H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX, 120.0 Ci/mmol) was from Perkin Elmer (MA, USA) and [³H]L-Glutamate (31.0 Ci/mmol) was from GE-Healthcare (UK).

2.3 NMDA preconditioning and mice treatment

NMDA was dissolved in 0.9 % NaCl (saline) solution and adjusted to pH 7.4 with NaOH 1mEq/mol. Animals were pretreated with NMDA at a subtoxic and non-convulsive dose (75 mg/kg; i.p.) or vehicle (saline 0.9%; i.p.). Animals were observed for 30 minutes immediately after the administration of NMDA, for the occurrence of any behavioral alteration (Boeck, et al., 2004). Preconditioned mice were all evaluated 24 hours after NMDA treatment. When administered *in vivo*, the adenosine A₁R agonist, CCPA, was injected 30 minutes before behavioral evaluations or glutamate uptake assay. CCPA was dissolved in saline with 0.4 % DMSO. The dose of CCPA (0.2 mg/kg, i.p.) was chosen based on previous studies (Prediger et al., 2006). NMDA and CCPA were administered by intraperitoneal (i.p.) route in a constant volume of 10 mL/kg body weight.

2.4 Hippocampal cell viability

Mice were pretreated with NMDA (75 mg/kg, i.p.) or vehicle (saline 0.9%, i.p.). After 24 hours, animals were killed by decapitation and hippocampi were rapidly removed. During dissection hippocampi were maintained in an ice-cold Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB) with the following compositions (in mM): 122 NaCl, 3 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.3 CaCl₂, 0.4 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, and 10 D-glucose. The buffer was bubbled with 95 % O₂-5 % CO₂ up to pH 7.4 (Molz et al., 2008). Slices (0.4 mm) were prepared using a McIlwain Tissue Chopper and separated in KRB at 4° C. Immediately after sectioning, slices were transferred to vials with fresh KRB, bubbled with 95% O₂/5% CO₂ for 30 minutes at 35° C to recover from slicing trauma, before starting the experiments (equilibration period). Cell viability was determined

through the ability of cells to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma). Hippocampal slices were then incubated with MTT (0.5 mg/ml) in KRB for 30 minutes at 37°C (Mosmann, 1983). The tetrazolium ring of MTT can be cleaved through reduction by dehydrogenases into viable cells in order to produce a precipitated formazan. The formazan produced was solubilized by adding 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO), resulting in a colored compound from which optical density was measured in an ELISA reader (550 nm).

2.5 Immunodetection of A₁R and glutamate transporter-1 (GLT-1)

2.5.1 Hippocampal homogenates

Mice were treated with NMDA (75 mg/kg, i.p.) or vehicle (saline 0.9%, i.p.) and after 24 hours they were killed by decapitation and hippocampi were rapidly removed. During dissection hippocampi were maintained in an ice-cold KRB. Hippocampi were solubilized with SDS-stopping solution (4 % SDS, 2 mM EDTA, 8% β-mercaptoethanol, and 50 mM Tris, pH 6.8, 2 mM PMSF) (Molz et al., 2008).

2.5.2 Isolation and purification of synaptosomes

Twenty-four hours after treatment, animals were killed by decapitation and hippocampi was used to prepare synaptosomes on a discontinuous Percoll gradient according to Dunkley et al. (1988). In brief, a pool of six hippocampi was homogenized in 10 mM HEPES, 0.32 M sucrose, pH 7.4 and centrifuged at 2,000 g for 3 minutes, 4°C. The resultant pellet was discarded, and the supernatant was centrifuged again at 9,500 g for 13 minutes, 4°C. The resultant pellet was re-suspended in 10 mM HEPES, 0.32 M sucrose, pH 7.4 and gently transferred onto a three-step gradient of 3%, 10% and 23% Percoll, in 10 mM HEPES, 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, DTT 0.25 mM, pH 7.4. Tubes were centrifuged at 25,000 g for 11 minutes, 4°C. The synaptosomes fractions were collected from the interface of the 10% and 23% Percoll steps. The fraction was washed twice by centrifugation at 22,000 g for 11 minutes 4°C and re-suspended in Tris 50 mM.

2.5.2 Western blot assays

Adenosine A₁ receptor expression was determined by Western blot analysis as described by Molz et al. (2008), with some modifications. Samples of whole hippocampal homogenates or

hippocampal synaptosomal preparations (60 µg of total protein/track) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 2% albumin (1 h) in TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5), followed by three times washing with TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.5). Membranes were incubated with primary antibodies anti-A₁R (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:100), anti-GLT-1 (Millipore, dilution 1:1000), anti-beta actin (Cell Signalling, dilution 1:1000) or anti-alpha actinin (Millipore, dilution 1:1000) overnight, at 4°C, and then, they were exposed to appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:5000), anti-guinea pig (Millipore, dilution 1:5000), anti-mouse (Millipore, dilution 1:5000), or anti-rabbit (Millipore, dilution 1:30000) respectively, for 1 hour at room temperature. Immunocomplexes were visualized using the enhancing chemiluminescence (ECL) detection system (GE Healthcare). Densitometric analysis was performed for the quantification of the immunoblottings using the Scion Image Software (Scion Corporation).

2.6 Adenosine receptor binding assays

2.6.1 Preparation of hippocampal membranes

The procedure was carried out by the method of Bruns et al. (1986), with slight modifications. Briefly, 24 hours after NMDA preconditioning mice were killed and their hippocampi were homogenized in 1 mL of ice-cold 50 mM Tris-HCl containing 320 mM sucrose, 1 mM EDTA and 3 mM MgCl₂, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 1,600 g for 10 minutes, and the supernatant obtained from this centrifugation was centrifuged at 16,000 g for 30 minutes. The pellet obtained from the centrifugation was suspended in a solution containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA and 3 mM MgCl₂, pH 7.4 with 4 U/ml adenosine deaminase and incubated for 30 minutes at 37°C to remove endogenous adenosine. This suspension was centrifuged at 16,000 g for 15 minutes. The pellet was suspended in the incubation solution containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA and 3 mM MgCl₂, pH 7.4 and used for binding assays. These membranes were frozen at -20°C for up to 2 days. On the day of assay, membranes were thawed at room temperature, and were suspended in the same buffer to a protein concentration of approximately 1 mg/ml and used for binding assays. No differences in the results of the binding assay were observed between frozen or fresh membranes.

2.6.2. Binding assays

The selective radiolabeled A₁R antagonist [³H]DPCPX was used to investigate binding properties of A₁R in hippocampal membranes from NMDA preconditioned and controls mice. To this end [³H]DPCPX was incubated for 1 hour at 30°C with 50 µg of hippocampal membrane protein in a final volume of 500 µl of the assay buffer containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA and 3 mM MgCl₂, pH 7.4, with bovine serum albumin (1 mg/mL). Saturation binding assays were carried out with increasing [³H]DPCPX concentrations (0.03 to 100 nM) using CPA (a selective A₁R agonist) at a concentration 1,000 times higher than radioligand to obtain nonspecific binding. Specific binding was determined by subtracting nonspecific binding from total binding. Nonspecific binding represents 20% of the total binding. Binding assay incubations were stopped by vacuum filtration through Whatman GF/B glass fiber filters presoaked with polyethyleneimine (0.1%), followed by three washings of the incubation tubes and filters with 1 mL of a solution containing 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA and 3 mM MgCl₂, pH 7.4, kept at 4°C. The filters were dried at room temperature, placed in scintillation vials, and 1 mL of scintillation liquid was added and incubated overnight. Filter-bound radioactivity was quantified in a scintillation counter with 60 % efficiency. All binding assays were performed in triplicates and performed in polypropylene tubes (Tasca and Souza, 2000). This protocol allows the detection of competitive specific binding at one site. Results were calculated and expressed as pmol [³H]DPCPX bound/mg protein. B_{max} and K_d values were calculated by the non-linear fitting of the one-site saturation specific binding assay equation using the GraphPad 5 software (Statsoft). R² was 0.69 and 0.90 for NMDA and control group, respectively. Comparison between experimental data sets was done with the built-in extra sum of squares F test (Cohen et al., 1996).

2.7 Behavioral tests

2.7.1 Hot plate test

The hot plate (Ugo Basile, model-DS37) was maintained at 54 ± 0.2 °C, as previously described, and this temperature was chosen because lower hot-plate temperatures are more sensitive to the effects of mild analgesics (Plone et al., 1996). Mice were treated with NMDA or saline, 24 hours later they received CCPA (0.2 mg/kg, i.p.) or saline and 30 minutes after they were placed in a glass cylinder of 24 cm diameter on the heated metal surface, and the time between placement and

shaking or licking of the paws, or jumping (whichever occurred first), was recorded as an index of latency to nociception. A 30 seconds (s) cut-off was imposed whereby non responding animals were removed from the hot-plate to prevent tissue damage. The results were expressed as a percentage of maximum possible effect (%MPE) according to the following formula:

$$\% \text{ Maximum possible effect} = \frac{\text{latency Test} - \text{latency Training}}{\text{cut off (30s)} - \text{latency Training}} \times 100$$

2.7.2 Open field test

To evaluate the spontaneous locomotor activity, the animals were placed for 5 minutes in the open field. The apparatus, made of acrylic, had a gray floor of 50 cm × 50 cm and transparent walls, 40 cm high. As described above, the experiments were conducted with NMDA-preconditioned mice 30 minutes after their treatment with saline or CCPA in a sound-attenuated room under low-intensity light (7 lx). Each mouse was placed in the center of the open field and the total distance traveled (m) was registered with the ANY Maze® video tracking program. In order to avoid odor impregnation the open field arena was cleaned with ethanol solution (10%, v/v) and dried with paper towels after each test.

2.8 L-[³H] glutamate uptake

L-[³H]glutamate uptake into hippocampal slices was evaluated as previously described (Molz et al., 2005). After NMDA preconditioning and CCPA treatment, mice were killed, hippocampus dissected and hippocampal slices were prepared and incubated for 30 min in order to normalize to physiological conditions, as described above. Hippocampal slices were then washed for 15 min at 37° C in a Hank's balanced salt solution (HBSS), composition in mM: 1.29 CaCl₂, 136.9 NaCl, 5.36 KCl, 0.65 MgSO₄, 0.27 Na₂HPO₄, 1.1 KH₂PO₄, and 5 HEPES. Uptake was assessed by adding 0.33 μCi/mL L-[³H]glutamate with 100 μM unlabeled glutamate in a final volume of 300 μL. Incubation was stopped immediately after 7 min by discarding the incubation medium and slices were submitted to two ice-cold washes with 1 mL HBSS. Slices were solubilized by adding a solution with 0.1% NaOH/0.01% SDS and incubated overnight. Aliquots of slice lysates were taken for determination of the intracellular content of L-[³H] glutamate by scintillation counting. Sodium-independent uptake was determined by using choline chloride, instead of sodium chloride in

the HBSS buffer. Unspecific sodium-independent uptake was subtracted from total uptake to obtain the specific sodium-dependent glutamate uptake. Results were obtained and presented as nmol of L-[³H] glutamate taken up per milligram of protein per minute.

2.9 Protein measurement

Protein content was evaluated by the method of Lowry et al., (1951) using bovine serum albumin (Sigma) as standard.

2.10 Statistical analysis

Statistical analyses were performed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by unpaired t-test for the immunoblotting and saturation binding experiments. The comparisons among groups on behavioral tests and glutamate uptake analysis were performed by two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test when appropriate. Differences were considered significant at > 95% confidence in all tests.

3 Results

3.1 Effect of NMDA preconditioning on A₁R expression and binding

In order to confirm we were employing a safety administration of NMDA (75 mg/kg, i.p.), cellular viability was assessed by MTT reduction assay in hippocampal slices. Figure 1A shows that slices from preconditioned mice presented no alteration in cellular viability 24 hours after NMDA preconditioning. In addition, we also confirmed the safety of the chosen NMDA dose by means of propidium iodide incorporation, as previously shown (Boeck et al. 2004). Thus, upon NMDA preconditioning no increment of propidium iodide incorporation was observed (data not shown), confirming that NMDA preconditioning did not alter hippocampal cellular viability.

Once the safety of our NMDA preconditioning protocol was demonstrated, we aimed to evaluate potential NMDA-mediated changes in the hippocampal A₁R biology. To this end, we analyzed the receptor expression and binding properties after NMDA preconditioning. Firstly, the amount of A₁R in total hippocampal homogenates (Fig. 1B) or synaptosomes (Fig. 1C) was determined by western blot experiments and no significant differences were observed upon NMDA preconditioning in both hippocampal preparations. Subsequently, radioligand binding experiments were performed, thus we constructed

saturation binding isotherms with the A₁R selective ligand [³H]DPCPX to evaluate receptor affinity (K_D) and maximum ligand binding capacity (B_{max}) in hippocampal membrane extracts (Fig. 1D). Interestingly, while NMDA-mediated preconditioning did not alter the A₁R B_{max} for the selective ligand [³H]DPCPX (Saline: B_{max}= 24.4 ± 2.3 pmol/mg protein, NMDA: B_{max}= 18.0 ± 2.0 pmol/mg protein), the affinity of the receptor for this radioligand antagonist was significantly increased (Saline: K_D= 38.4 ± 8.8 nM, NMDA: K_D=12.0 ± 3.7 nM; p< 0.01). Overall, these results suggested that NMDA preconditioning increased the hippocampal A₁R affinity without altering the total number of receptors.

3.2 Functional assessment of NMDA preconditioning and A₁R modulation: behavioral analysis

In order to investigate the potential functional interplay between A₁R activity and NMDA preconditioning, treated animals were subjected to behavioral tasks. The hot plate test was chosen because it is sensitive to the A₁R activation (Sawynok, 1998). To this end, a sub-analgesic dose of the selective A₁R agonist CCPA (0.2 mg/kg, i.p.) was used in order to unravel a potential interaction between NMDA preconditioning and A₁R activity. Thus, mice were treated with NMDA (75 mg/kg, i.p.) or saline, 24 hours later they received CCPA (0.2 mg/kg, i.p.) or saline and 30 minutes after they were subjected to the behavioral analysis.

Interestingly, the evaluation of the nociceptive behavior in our experimental animal model setting revealed that the NMDA preconditioning induced an antinociceptive phenotype observed as an increase in the % of maximum possible analgesic effect in the hot plate test (Two-way ANOVA [F(1,20)=5.73, p<0.05]).

Another striking result was the fact that a non-effective *per se* dose of CCPA reversed the NMDA preconditioning-mediated analgesia [F(1,20)=3.90, p<0.05] (Fig. 2A).

In order to evaluate the any alteration in the spontaneous locomotor activity of mice, they were evaluated in the open field arena. NMDA preconditioning or A₁R activation with CCPA treatment did not alter mice locomotor activity. The statistical analyses revealed a non-significant effect for the pre-treatment [F(1,38)= 0.3639, p>0.05], treatment [F(2,38)=1.6403, p<0.05] and interaction [F(2,38)=0.9754, p>0.05] factors for the total distance travelled evaluated in the open field test (Fig. 2B). Overall, our results clearly demonstrated that the

post-activation of A₁R with CCPA in NMDA-treated animals precludes the antinociceptive effect evoked by a subtoxic dose of NMDA.

3.3 Functional assessment of NMDA preconditioning and A₁R modulation: L-[³H] glutamate uptake and expression of GLT-1 transporter

Glutamate clearance from extracellular space is an important protective mechanism against glutamate excitotoxicity (Schousboe and Waagepetersen, 2005). Therefore, we investigated whether NMDA preconditioning (75 mg/kg, i.p.) alters glutamate uptake into hippocampal slices. Indeed, *in vivo* NMDA preconditioning increases glutamate uptake into hippocampal slices *ex vivo*, which were evaluated 24 hours after NMDA preconditioning induction, a time window that NMDA preconditioning has been shown to be neuroprotective ($p < 0.01$) (Fig. 3A). Moreover, we investigated the acute modulation of A₁R on glutamate uptake with or without NMDA preconditioning through the administration of the A₁R-selective agonist of CCPA (0.2 mg/kg, i.p.). As show in Figure 3A, CCPA *per se* did not alter the basal glutamate uptake, but the interaction preconditioned animals vs. CCPA administration decreased glutamate uptake relative to NMDA group ($p < 0.001$), suggesting that slices from preconditioned animals were more susceptible to A₁R challenge. Interestingly, the evaluation of the immunocontent of the glial glutamate transporter protein GLT-1 in the hippocampus of NMDA preconditioned mice showed no alteration in GLT-1 protein levels 48 hours after NMDA preconditioning (Fig. 3B). The detection of GLT-1 expression at this time parallels with the identification of NMDA preconditioning-promoted neuroprotection against seizures induced by the NMDA receptor agonist, quinolinic acid (data not shown), as previously reported (Boeck et al., 2004). Altogether, the behavioral tests and the glutamate uptake experiments, show activation of A₁R modulates the functional phenotype of mice in a NMDA preconditioned state.

4 Discussion

Subtoxic doses of NMDA induce chemical preconditioning, which leads to cellular tolerance to noxious stimuli, decreasing cell death (Ogita, 2003; Schurr et al, 2001). This concept was extended to *in vivo* models of quinolinic acid-induced seizures (Boeck et al, 2004), traumatic brain injury (Costa et al. 2010) and *in vitro* model of cellular

excitotoxicity in cerebellar granule neurons (Boeck et al., 2005). We have shown that NMDA preconditioning protects approximately 50% of the animals against quinolinic acid-induced seizures and completely prevents hippocampal degeneration (Boeck et al., 2004; de Araújo Herculano et al., 2011; Vandressen-Filho et al., 2007). Moreover, the data presented here support the notion that NMDA preconditioning does not induce neuronal death *per se*. Instead, these are consistent with a neuroprotective role for NMDA preconditioning, which mechanisms remain to be fully elucidated.

One potential mechanistic explanation considers the role of adenosine and adenosine receptors activation in the process of achieving the preconditioned state (Boeck et al. 2004; Boeck et al. 2005). There is evidence suggesting that activation of NMDA receptors increases adenosine levels, either directly (Manzoni et al. 1994), or as a consequence of primary ATP release and hydrolysis (Craig and White, 1993). The participation of endogenous extracellular adenosine and A₁R on NMDA preconditioning has already been described (Boeck et al., 2004). Therefore, the present study explored for the first time the properties of hippocampal A₁R activity after mice achieved an NMDA preconditioned phenotype. Interestingly, the A₁R underlies the anticonvulsant and neuroprotective properties of adenosine, particularly in the hippocampus. Thus, binding of adenosine to its high affinity A₁R leads to a decreased release of the main excitatory neurotransmitter glutamate (Ciruela et al., 2006) and reduces neuronal excitability (Boison and Stewart, 2009).

This study shows modulation of A₁R functionality in NMDA preconditioned mice *in vivo*. We showed that a subtoxic dose of NMDA does not significantly reduce A₁R levels neither in homogenates of the hippocampal formation, nor in hippocampal presynaptic terminals. Since activation of NMDA receptors promotes adenosine release (Craig and White, 1993), one might consider that NMDA preconditioning could induce A₁R desensitization or internalization. It has been shown that minute-to-hour long activation of A₁R with selective agonists can lead to receptors desensitization (Ramkumar et al., 1991; Palmer and Stiles, 1997; Escriche et al., 2003). However, in the current setting, no reduction in A₁R expression in a synaptic membranes-enriched preparation was observed. Additionally, an increased binding affinity for the A₁R ligand DPCPX was accompanied by an unaltered maximum ligand binding capacity, suggesting the absence of binding sites reduction in synaptic terminals. This renders the receptor desensitization hypothesis unlikely. Accordingly, a previous study showed NMDA

preconditioning did not alter the functionality of A₁R, but it promoted an A_{2A}R desensitization measured by cAMP accumulation (Boeck et al., 2005). It is plausible to hypothesize that NMDA preconditioning might alter the balance among adenosine A₁ and A_{2A} receptors function or oligomerization (Ciruela et al., 2012), which is under investigation in our laboratory. Our current data showed NMDA preconditioning turned hippocampal A₁R into a more sensitive state, putatively leading to increased effects of adenosine at these neuroprotective receptors.

Functional implications of the altered affinity of hippocampal A₁R for its ligands were investigated *in vivo* using behavioral analysis. It is widely accepted that NMDA receptors activation potentiates the glutamate-mediated nociceptive input and NMDA receptors antagonists may represent an antinociceptive strategy (Muir, 2010). However, the moderate NMDA receptor activation achieved with this non-toxic NMDA dose promoted an antinociceptive effect in the hot plate test. This unexpected result, i.e, NMDA preconditioning-mediated antinociception, may be explained by the opposite effect of NMDA activation observed with preconditioning. Whereas excessive activation of NMDA receptor leads to excitotoxicity, moderate activation promotes neuroprotection. Similarly, the moderate NMDA receptors activation evoked by preconditioning, elicited an antinociceptive effect to mice. In order to confirm if the increased binding affinity to A₁R could be expressed as increased receptor functionality *in vivo*, we initially assessed the sensitivity to pain. Adenosine is an important neuromodulator that can regulate the transmission of pain mainly through A₁R, and the activation of peripheral sites can produce an antinociceptive effect via A₁R (Liu et al. 2006). However, the A₁R selective agonist (CCPA, 0.2 mg/kg, i.p.) in an inactive dose *per se*, reverses the antinociceptive effect triggered by NMDA preconditioning. It is important to emphasize that this effect of A₁R activation was observed in mice pre-sensitized by NMDA preconditioning, suggesting that post-activation of A₁R impairs NMDA preconditioning-mediated responses.

In order to further address the functional cross-talk between A₁R activity and NMDA preconditioning we evaluated the glutamate uptake into hippocampal slices *ex vivo*. Activation of A₁R did not significantly alter basal glutamate uptake, but it reversed NMDA preconditioning-promoted increase in this cellular function. This hippocampal A₁R-mediated NMDA preconditioning modulation may further suggest an increased sensitivity of NMDA-treated animals to

adenosine effects, since a previously ineffective dose of CCPA turns out to be effective in preconditioned animals.

The neuroprotection mediated by A_1R is usually explained by the action of adenosine through presynaptic A_1R s which reduces the vesicular release of excitatory neurotransmitters and subsequent activation of postsynaptic receptors, thus resulting in activation of K^+ channels leading to hyperpolarization (Fredholm et al. 2005; Ciruela et al. 2012). Data from the literature argues that adenosine inhibits the action of NMDA receptor, reducing the entry of Ca^{2+} and thereby protecting against excitotoxicity in adult animals (Cunha, 2005; Fredholm, 2005). Thus, our data demonstrate that the pharmacological activation of the A_1R by the selective agonist CCPA (0.2 mg/kg, i.p.) abolished the effect of NMDA preconditioning in hippocampal slices. Since glial transporters are more effective in the clearance of extracellular glutamate we evaluate a putative alteration in GLT-1 expression, which was not confirmed, pointing to a modulation of activity and not expression of glutamate transporters. Additionally, it is important to emphasize that we cannot completely rule out the involvement of neuronal glutamate transporters in the assay of glutamate uptake into hippocampal slices, especially because A_1R are known to act as presynaptic inhibitors of glutamate release (Dunwiddie and Masino, 2001). The different action resulted from adenosine receptors activation at pre- or post-synaptic sites and the putative modulation of glial or neuronal glutamate transporters by adenosine is an important issue to be addressed in the future.

NMDA preconditioning-promoted removal of glutamate from the synaptic cleft may contribute to the mechanism of neuroprotection afforded by preconditioning. Moreover, NMDA preconditioning activates signaling pathways such as PI3K/Akt and MAPK/ERK (de Araujo Herculano et al., 2011) that are involved in the modulation of glutamate plasma membrane transporters traffic and activity. Additionally, we previously reported a proteomic analysis showing a down-regulation of V-type proton ATPase, suggesting a putative reduced vesicular glutamate content or release evoked by NMDA preconditioning (do Amaral e Silva Müller et al., 2013).

In conclusion, this study describes that NMDA-mediated preconditioning modulates A_1R binding affinity without altering its protein levels. Moreover, A_1R activation reversed NMDA preconditioning-mediated antinociceptive effect and glutamate uptake into hippocampal slices, suggesting that post-activation of A_1R may interfere with NMDA preconditioning. The contribution of the cross-

talk between glutamatergic and adenosinergic systems towards the neuroprotective response evoked by NMDA preconditioning has additional mechanisms to be unraveled.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX – Project NENASC), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos-IBN-Net #01.06.0842-00) and INCT (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia) for Excitotoxicity and Neuroprotection. Also supported by grants SAF2011-24779 and CSD2008-00005 from Ministerio de Ciencia e Innovación and ICREA Academia-2010 from the Catalan Institution for Research and Advanced Studies to FC. LCC, FCM and FKL receive scholarships from CAPES, CNPq and FAPESC, respectively. RDP and CIT are supported by research fellowships from CNPq. The authors have no financial or personal conflicts of interest related to this work.

References

- Boeck CR, Ganzella M, Lottermann A, Vendite D (2004), NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia* 45:745-750.
- Boeck CR, Ganzella M, Decker H, Vendite D, Leal RB, Tasca CI (2005), NMDA preconditioning protects mice against necrotic cellular death induced by quinolinic acid. *Journal of Neurochemistry* 94:48-80.
- Boeck, CR, Kroth EH, Bronzatto MJ, Vendite D (2005), Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. *Neuropharmacology* 49:17-24.
- Boeck CR, Carbonera LS, Milioli ME, Constantino LC, Garcez ML, Rezin GT, Scaini G, Streck EL (2013), Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities following trauma brain injury in

brain of mice preconditioned with N-methyl-D-aspartate. *Mol Cell Biochem.* [Epub ahead of print].

Boison D, Steward KA (2009), Therapeutic epilepsy research: from pharmacological ationale to focal adenosine augmentation. *Biochem Pharmacol* 78:1428–1437.

Bond A, Lodge D, Hicks CA, Ward MA, O'Neill MJ (1999), NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *European Journal Pharmacology* 10:91-99.

Bruns RF, Lu GH, and Pugsley TA (1986), Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes. *Molec. Pharmacol* 29:331–346.

Ciruela F, Casadó V, Rodrigues RJ, Luján R, Burgueño J, Canals M, Borycz J, Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortés A, Canela EI, López-Giménez JF, Milligan G, Lluis C, Cunha RA, Ferré S, Franco R (2006), Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci* 26:2080-2087.

Ciruela F, Fernández-Dueñas V, Llorente J, Borroto-EscuelaD, Cuffí ML, Carbonell L, Sánchez S, Agnati LF, Fuxe K, Tasca CI (2012), G protein coupled receptor oligomerization and brain integration: Focus on adenosinergic transmission. *Brain Res* 1476:86-95.

Cohen FR, Lazareno S, Birdsall NJ (1996). The affinity of adenosine for the high- and low-affinity states of the human adenosine A1 receptor. *Eur J Pharmacol* 309: 111-114.

Costa T, Constantino LC, Mendonça BP, Pereira JG, Herculano B, Tasca CI, Boeck CR (2010), N-Methyl-D-Aspartate Preconditioning Improves Short-Term Motor Deficits Outcome After Mild Traumatic Brain Injury in Mice. *Journal of Neuroscience Research* 88:1329–1337.

Craig CG, White TD (1993), N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *Journal of Neurochemistry* 60:1073-1080.

Cunha RA (2005), Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signalling* 1:111–134.

De Araújo Herculano B, Vandresen-Filho S, MARTINS WC, BOECK CR, Tasca CI (2011), NMDA preconditioning protects against quinolinic acid-induced seizures via PKA, PI3K and MAPK/ERK signaling pathways. *Behav Brain Res* 219:92–97.

Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM (2003), Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neuroscience* 26:248-54.

Do Amaral e Silva Müller G, Vandresen-Filho S, Tavares CP, Menegatti ACO, Terenzi H, Tasca CI, Severino PC (2013), Proteomic Analysis of the Mice Hippocampus After Preconditioning Induced by N-Methyl-D-Aspartate (NMDA). *J Mol Neurosci* 50:154-164

Dunkley PR, Heath JW, Harrison SM, Jarvie PE, Glenfield P J, Rostas J AP(1988), A rapid percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res* 441:59-71.

Dunwiddie TV, Masino SA (2001), The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience* 24:31-55.

Escriche M, Burgueño J, Ciruela F, Canela EI, Mallol J, Enrich C, Lluís C, Franco R (2003), Ligand induced caveolae-mediated internalization of A₁ adenosine receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling. *Exp. Cell Res* 285:72-90.

Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM (2005), Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology* 63:191–270.

Hoehn K, White TD (1990), Role of excitatory amino acid receptors in KC- and glutamate-evoked release of endogenous adenosine from rat cortical slices. *Journal of Neurochemistry* 54:256-265.

Liu DZ, Zhao FL, Liu J, Ji XQ, Ye Y, Zhu XZ (2006), Potentiation of adenosine A1 receptor agonist CPA-induced antinociception by paeoniflorin in mice. *Biol Pharm Bull* 29:1630-1633.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A.L, Randall RJ (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193:265-275.

Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA (1994), Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* 265:2098-2101.

McKenna, JE and Melzack R (2001), Blocking NMDA receptors in the hippocampal dentate gyrus with AP5 produces analgesia in the formalin pain test. *Exp Neurol* 172: 92-99.

Melani A, Pantoni L, Corsi C (1999), Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in wake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion. Correlation with neurological deficit and histopathological damage. *Stroke* 30:2448-2455.

Molz S, Decker H, Oliveira IJL, Souza DO, Tasca CI (2005), Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem. Res* 30:83-89.

Molz S, Tharine DC, Decker H, Tasca CI (2008), GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1231:113-20.

Mosmann T (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

Muir KW (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 6, 53-60

Muir WW (2010), NMDA Receptor Antagonists and Pain: Ketamine. *Vet Clin Equine* 26:565-578.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986), Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136.

Nascimento FP, Figueredo SM, Marcon R, Martins DF Macedo SJ Jr, Lima DA, Almeida RC, Ostroski RM, Rodrigues AL, Santos AR (2010), Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2:590-598.

Ogita K, Okuda H, Yamamoto Y Nishiyama N, Yoneda Y (2003), In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neurochemistry* 85:1336-1346.

Palmer TM, Stiles GL (1997), Adenosine receptors. *Neuropharmacology* 7:683- 694.

Pamplona FA, Henes K, Micale V, Mauch CP, Takahashi RN, Wotjak CT (2011), Prolonged fear incubation leads to generalized avoidance behavior in mice. *Journal of Psychiatric Research* 45:354-360.

Plone MA, Emerich DF, Lindner MD (1996), Individual differences in the hotplate test an effect of habituation on sensitivity to morphine, *Pain* 66:265– 270.

Poli, A, Lucchi R, Vibio M, Barnabei O (1991), Adenosine and glutamate modulate each other's release from rat hippocampal synaptosomes. *Journal of Neurochemistry* 57:298-306.

Prediger RD, da Silva GE, Batista LC, Bittencourt AL, Takahashi RN (2006), Activation of adenosine A1 receptors reduces anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal (hangover) in mice. *Neuropsychopharmacology* 31:2210-2220.

Ramkumar V, Olah ME, Jacobson KA, Stiles GL (1991), Distinct pathways of desensitization of A1- and A2 adenosine receptors in DDT1MF-2 cells. *Mol. Pharmacol* 40:639-647.

Rejdak R, Rejdak K, Sieklucka Dziuba M, Stelmasiak Z, Gieb P (2001), Brain tolerance and preconditioning. *Journal Pharmacology* 53:73-79.

Samoilov MO, Lazarevich EV, Semenov DG, Mokrushin AA, Tyul'kova EI, Romanovskii, DY, Milyakova EA, Dudkin KN (2003), The adaptive affects of hypoxic preconditioning of brain neurons. *Neuroscience and behavioral physiology* 33:1-11.

Sawynok J (1998), Adenosine receptor activation and nociception. *European Journal of Pharmacology* 317:1-11.

Severino PC, do Amaral e Silva G, Vandresen-Filho S, Tasca CI (2011), Cell signaling in NMDA preconditioning and neuroprotection in convulsions induced by quinolinic acid. *Life Sciences* 89:570-576.

Schaller B, Graf R (2002), Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinical important entity of stroke prevention. *Journal of Neurology* 249:1503-1511.

Schousboe A, Waagepetersen HS (2005), Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. *Neurotox Res* 8:221-225.

Schurr A, Payne RS, Tseng MT, Gozal D (2001), Excitotoxic preconditioning elicited by both glutamate and hypoxia and abolished by lactate transporte inhibition in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 307:151-154.

Shpargel KB, Jalabi W, Jin Y, Dadabayev A, Penn MS, Trapp BD (2008), Preconditioning paradigms and pathways in the brain. *Cleveland Clinic Journal of medicine* 75:77-82.

Tasca CI, Souza DO (2000), Interaction of Adenosine and Guanine Derivatives in the Rat Hippocampus: Effects on Cyclic AMP Levels and on the Binding of Adenosine Analogues and GMP. *Neurochemical Research* 25: 181-188.

Vandresen-Filho S, Herculano BA, Franco JL, Boeck CR, Darfre AL, Tasca CI (2007), Evaluation of glutathione metabolism in NMDA

preconditioning against quinolinic acid-induced seizures in mice cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res* 1184:38–45.

Xu GP, Dave KR, Vivero R, Schmidt Kastner R, Sick TJ, Perez-Pinzon MA (2000), Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning hippocampal slice cultures. *Brain Research* 952:153-158.

Figures and Legends

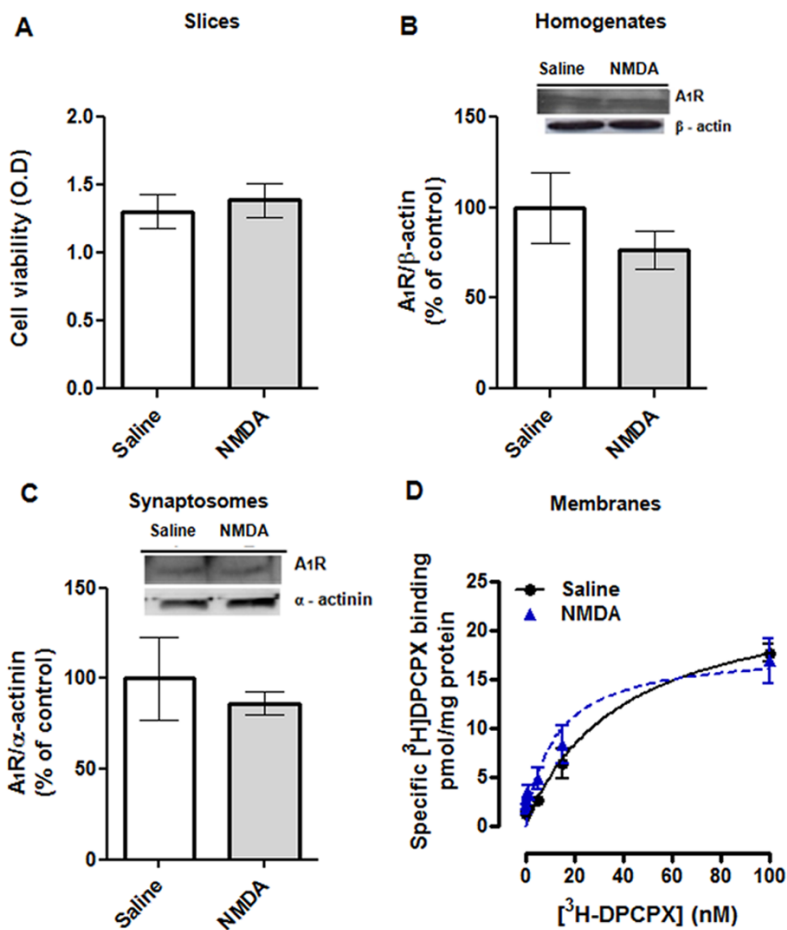


Figure 1. Evaluation of cellular viability and hippocampal A₁R expression and binding properties in NMDA preconditioned mice. Mice were treated with a subtoxic dose of NMDA (75 mg/Kg, i.p.) or saline (0.9 %) 24 h before the hippocampal dissection and preparation of slices, homogenates, synaptosomal fractions or plasma membrane extract samples. **(A)** Graph shows cellular viability of hippocampal slices measured with MTT (0.5 mg/ml) reduction assay for 30 min at 37°C and quantification was assessed at 550 nm (n=9). Expression of A₁R in the hippocampus of NMDA preconditioned mice. Hippocampal homogenates **(B)** and synaptosomes **(C)** of saline or NMDA preconditioned mice were analyzed in Western blotting probed with rabbit anti-A₁R antibody (1 μg/ml) or mouse anti-β-actin/anti-α-actinin (1 μg/ml). Immunoreactive bands were detected as

described in experimental procedures. The ratio between A₁R and β-actin or α-actinin was calculated and normalized to the ratio found in the saline treated animal. Data are expressed as the mean ± SEM of either 5 (A) or 3 (B) independent experiments. **(D)** Saturation curves of [³H]DPCPX binding to A₁R in mice hippocampal plasma membrane extracts. Data represent means ± SEM of 5 independent experiments carried out in triplicates. P < 0.01, compared with control group (one-way ANOVA followed by unpaired t-test) to K_D values, Saline: 38.4 ± 8.8 nM, NMDA: 12.0 ± 3.7 nM.

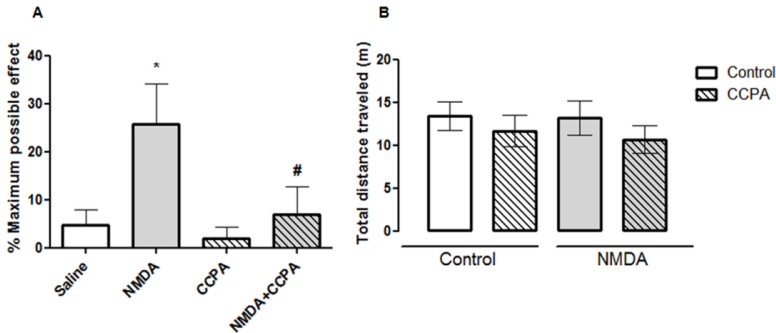


Figure 2. Effect of NMDA preconditioning and A₁R activation in the hot plate and open field tests. **(A)** Mice were pretreated with NMDA (75 mg/kg, i.p.) or saline and 24h after they were subjected to the hot plate test. After habituation session the animals were treated with CCPA (0.2 mg/kg, i.p.) and 30 min after they were tested on the hot plate apparatus (54 ± 0.2 °C) and the latency (s) to nociceptive behavior was registered. Data represent the means ± S.E.M. of percentage of analgesia (% maximum possible effect) of 6 mice per group.* P < 0.05 compared with all other groups, # P < 0.05 compared with NMDA group (two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test). **(B)** Mice were pretreated with NMDA (75 mg/kg, i.p.) or saline, 24h after they were treated with CCPA (0.2 mg/kg, i.p.) or saline and 30 min after they were tested on the open field arena to the assessment of the total distance travelled. Data represent means ± S.E.M of 7 mice per group.

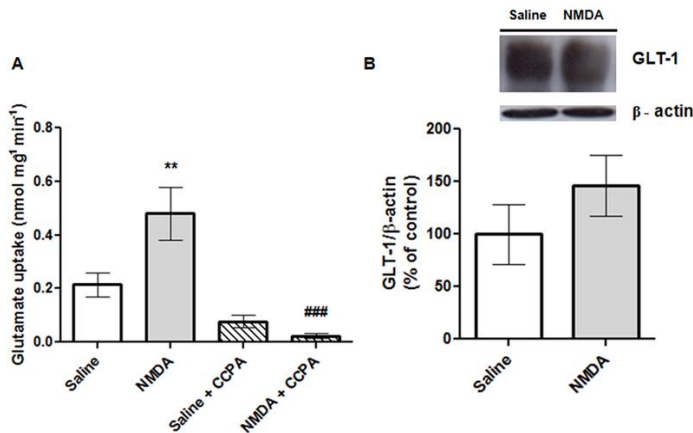


Figure 3. Effects of NMDA preconditioning and A₁R activation on L-[³H]glutamate uptake into hippocampal slices and on glutamate transporter GLUT-1 expression. Mice were acutely treated with NMDA (75 mg/Kg, i.p.) or saline and after 24 h they received a selective A₁R agonist CCPA (0.2 mg/Kg) administration and after 30 min the hippocampal slices were prepared and processed for *in vitro* glutamate uptake assay and GLUT-1 transporter immunodetection. **(A)** Effects of NMDA preconditioning and A₁R activation on L-[³H] glutamate uptake into hippocampal slices. Data represent means ± S.E.M of 4 to 6 mice per group evaluated in independent experiments. **P<0.01 compared with saline group. ### P<0.001 compared with saline and NMDA groups (ANOVA two-way followed by Newman-Keuls post hoc). **(B)** Representative western blotting of GLUT-1 glutamate transporter and β-actin levels and quantification of the ratio of GLUT-1/β-actin levels. Data represent percentage of control ± S.E.M. from 4 independent experiments.

3 DISCUSSÃO

O pré-condicionamento químico com doses sub-tóxicas de NMDA pode levar à tolerância celular a estímulos nocivos, e diminuir a morte celular (Ogita, 2003; Schurr et al., 2001). Este conceito também tem sido descrito para modelos *in vivo* de convulsões induzidas por AQ (Boeck et al., 2004), TCE (Costa et al., 2010) e em modelo *in vitro* de excitotoxicidade celular em neurônios granulares do cerebelo (Boeck et al., 2005). Nosso grupo já demonstrou que o pré-condicionamento com NMDA protege aproximadamente 50 % dos animais contra as convulsões induzidas por AQ e diminui a morte neuronal no hipocampo (Boeck et al., 2004; Vandressen-Filho et al., 2007; de Araújo Herculano et al., 2011). Além disso, em corroboração com esses estudos os dados apresentados neste capítulo reforçam o papel neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA em não alterar a viabilidade celular *per se* (Fig 1A, Anexo1). Apesar disso, os mecanismos que levam a esta neuroproteção, ainda não estão completamente elucidados.

Evidências sugerem que a ativação dos receptores NMDA aumenta os níveis de adenosina, seja diretamente (Manzoni et al., 1994), ou como consequência da liberação e hidrólise de ATP (Craig e White, 1993). A união da adenosina ao A_1R leva a uma diminuição da liberação do principal neurotransmissor excitatório, o glutamato (Ciruela et al., 2006) e reduz a excitabilidade neuronal (Boison e Stewart, 2009). Por outro lado, altos níveis de adenosina promoveriam a ativação de $A_{2A}R$, que é definida como facilitatória, ou seja, aumenta a liberação de neurotransmissores como o glutamato (Cunha, 2005; Ciruela et al., 2012). Em alguns casos, tanto a ativação quanto a inativação do receptor A_{2A} mostraram ter um efeito protetor (Jones et al., 1998; Blum et al., 2003; Chou et al., 2005)

Este estudo mostrou a modulação da funcionalidade dos A_1R e $A_{2A}R$ em camundongos pré-condicionados com NMDA *in vivo*. Os resultados demonstraram que uma dose subtóxica de NMDA não altera a expressão proteica de A_1R e $A_{2A}R$ em homogeneizados do hipocampo total, tampouco a expressão de A_1R nos terminais pré-sinápticos do hipocampo. Entretanto, observou-se um aumento da afinidade de união para o ligante [3H]DPCPX ao A_1R , sem alteração na capacidade máxima de união do ligante ao A_1R , bem como do ligante [3H]CGS21680 para o $A_{2A}R$. Desta forma parece que o pré-condicionamento com NMDA modula a afinidade dos A_1R hipocampais, levando ao aumento dos efeitos da adenosina através dos A_1R .

As implicações funcionais da alteração da afinidade de união do ligante ao A₁R observadas no hipocampo foram investigadas *in vivo* utilizando testes comportamentais. A literatura descreve que a ativação dos receptores NMDA potencializa a nocicepção mediada por glutamato e antagonistas dos receptores NMDA podem representar uma estratégia antinociceptiva (Muir, 2010). No entanto, a ativação moderada do receptor de NMDA através de uma dose sub-tóxica de NMDA (75 mg/Kg, i.p.) promoveu um efeito antinociceptivo no teste da placa quente (Fig. 2, Anexo do capítulo I). Este resultado inesperado, ou seja, a antinocicepção mediada pelo pré-condicionamento com NMDA, pode ser explicado por um efeito diferencial provavelmente devido à intensidade de ativação dos receptores NMDA observados com o pré-condicionamento. Considerando que a excessiva ativação dos receptores NMDA leva à excitotoxicidade e a ativação moderada promove neuroproteção, por comparação, sugerimos que a ativação moderada dos receptores NMDA através do pré-condicionamento, induziu um efeito antinociceptivo em camundongos.

Para confirmar se o aumento da afinidade de união ao A₁R pode ser expresso como um aumento da funcionalidade do receptor *in vivo*, inicialmente avaliou-se a sensibilidade à dor para tentar observar uma alteração dos efeitos modulados pelos A₁R. A adenosina é um neuromodulador importante que pode regular a transmissão da dor, principalmente através do A₁R, e em sítios periféricos a ativação de A₁R pode produzir um efeito antinociceptivo (Liu et al., 2006). No entanto, o agonista selectivo do A₁R (CCPA, 0,2 mg/Kg, i.p.) em uma dose inativa, reverte o efeito antinociceptivo desencadeada pelo pré-condicionamento com NMDA. É importante ressaltar que este efeito da ativação A₁R foi observado em camundongos pré-sensibilizados pelo pré-condicionamento com NMDA, o que sugere que a pós-ativação do A₁R prejudica respostas mediadas pelo pré-condicionamento com NMDA.

Quando observado a modulação dos receptores A₁ e A_{2A} de adenosina sobre o efeito do pré-condicionamento com NMDA em um comportamento dependente de hipocampo (teste do condicionamento do medo contextual), a ativação seletiva de A₁R não alterou a resposta para o tempo de *freezing* no contexto, mas aumentou o tempo de *freezing* para o novo ambiente. O que sugere que a ativação do A₁R induz generalização da memória aversiva. Nos animais pré-condicionados com NMDA, o CCPA foi igualmente eficaz em aumentar o tempo de *freezing* no novo ambiente. Por outro lado, o bloqueio da A₁R pelo antagonista seletivo DPCPX não influenciou o tempo de *freezing* tanto

no contexto quanto no novo ambiente (Fig 4). Juntos, estes resultados sugerem que a ativação do A₁R induz uma resposta generalizada de medo, um evento independente do pré-condicionamento mediado por NMDA.

Em relação à modulação dos A_{2A}R sobre o efeito do pré-condicionamento com NMDA, a ativação do A_{2A}R pelo seu agonista seletivo, CGS21680 (0,05 mg/Kg), também aumentou o tempo de *freezing* dos animais durante a exposição ao novo ambiente. Porém, o pré-condicionamento com NMDA não afetou o tempo de *freezing* dos animais, mas preveniu a resposta observada após a ativação do receptor A_{2A} de adenosina pelo seu agonista (Fig. 2), sugerindo uma alteração na funcionalidade dos A_{2A}R. Corroborando com os resultados observados para a modulação dos receptores A₁ e A_{2A}, um estudo anterior demonstrou que o pré-condicionamento com NMDA não alterou a funcionalidade do A₁R, mas promoveu uma dessensibilização dos A_{2A}R, avaliada pela acumulação de AMPc (Boeck et al., 2005).

É plausível supor que o pré-condicionamento com NMDA pode alterar o equilíbrio entre a sinalização ou a oligomerização dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} (Ciruela et al., 2012), desde que a interação entre estes receptores pode ser modulada pelos diferentes níveis do nucleosídeo adenosina na fenda sináptica (Ciruela et al., 2006). Tendo como base estas evidências, foi proposto avaliar se o pré-condicionamento com NMDA altera a oligomerização dos A₁ e A_{2A}, através da realização de um estágio de doutorado sanduíche. Confirmou-se, que os receptores A₁ e A_{2A} formam oligômeros quando tranfectados em células HEK-293 (pela técnica de BRET, usando A_{2A}R^{Rluc} e A₁R^{YFP}, conforme descrito por Ciruela et al., 2006). No entanto, ainda não foi desenvolvida a metodologia para detectar esta interação *in situ*, ou seja no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NMDA. Dados preliminares de imunocitoquímica para os receptores A₁ e A_{2A} em células HEK-293, indicam que estes receptores estão co-localizados (dados não mostrados). Desta forma, experimentos adicionais são necessários para demonstrar se o pré-condicionamento altera a interação e/ou oligomerização dos receptores A₁ e A_{2A}.

A retirada de glutamato da fenda sináptica é um importante mecanismo de neuroproteção a fim de diminuir a quantidade desse neurotransmissor na fenda, prevenindo a excitotoxicidade (Phillis e O'regan, 2002). A fim de aprofundar a modulação da funcionalidade dos A₁R e A_{2A}R no pré-condicionamento com NMDA, foi avaliada a captação de glutamato em fatias de hipocampo *ex vivo*. A ativação tanto do A₁R quanto do A_{2A}R não alterou a captação de glutamato basal, mas

reverteu o aumento da captação de glutamato promovido pelo pré-condicionamento com NMDA.

A neuroproteção mediada por A_1R é geralmente explicada pela ação da adenosina através dos A_1R expressos em sítios pré-sinápticos, os quais reduzem a liberação vesicular de neurotransmissores excitatórios e subsequente ativação de receptores pós-sinápticos, resultando em ativação de canais de K^+ levando a hiperpolarização (Fredholm et al., 2005; Ciruela et al., 2012). Os dados da literatura afirmam que a adenosina inibe a ação do receptor NMDA (Hoehn e White, 1990), reduzindo a entrada de Ca^{2+} (Vacas et al., 2003) e consequentemente a excitotoxicidade em animais adultos (Cunha, 2005; Fredholm, 2005). Estes dados corroboram com os dados apresentados neste trabalho que demonstram que a ativação farmacológica do A_1R pelo agonista selectivo CCPA (0,2 mg/Kg,) aboliu o efeito do pré-condicionamento com NMDA em aumentar a captação de glutamato em fatias de hipocampo.

A participação dos $A_{2A}R$ também tem sido demonstrada no controle da captação de glutamato (Matos et al., 2012). No presente trabalho, foi demonstrado que tanto a ativação do receptor A_{2A} pelo agonista (CGS21680, 0,05 mg/Kg, i.p.) quanto o bloqueio pelo antagonista (ZM241385, 3 mg/Kg, i.p.) reverte o efeito do pré-condicionamento com NMDA em aumentar a captação de glutamato. Estudos têm demonstrado que a administração crônica de antagonistas de receptores A_{2A} , melhora a sobrevivência neuronal após um evento isquêmico (Von Lubitz et al., 1995). Por outro lado, também já se demonstrou que a ativação crônica também protege neurônios da retina sobre a toxicidade induzida por glutamato (Ferreira e Paes de Carvalho, 2001).

A modulação da transmissão glutamatérgica pode ser mediada pelo gradiente da bomba de Na^+/K^+ ATPase, e a subunidade $\alpha 2$ está ligada ao GLT-1 para regular o transporte de glutamato nos astrócitos. Um estudo recente demonstrou que a ativação do $A_{2A}R$ diminuiu a atividade da Na^+/K^+ ATPase seletivamente em astrócitos, inibindo a captação de glutamato. Além disso, foi encontrada uma associação física do $A_{2A}R$ com Na^+/K^+ ATPase- $\alpha 2$ em astrócitos, sugerindo que este acoplamento dos $A_{2A}R$ astrocitários para a regulação do transporte de glutamato através da modulação da atividade da Na^+/K^+ ATPase- $\alpha 2$ fornece um novo mecanismo que relaciona a atividade neuronal da homeostase iônica com o controle da atividade glutamatérgica (Matos et al., 2013). Esta associação entre a atividade neuronal e a transmissão de glutamato já foi descrita por Pellerin e Magistretti (1994) que

demonstraram que após a liberação de glutamato neuronal, a captação de glutamato em astrócitos depende da atividade da Na^+/K^+ ATPase, através da utilização da glicose.

Desde que os transportadores gliais são mais eficazes na captação de glutamato extracelular, avaliou-se a possível alteração na expressão do GLT-1. Os dados demonstraram que a expressão de GLT-1 não foi alterada, apontando para uma modulação da atividade e não da expressão destes transportadores de glutamato. Além disso, é importante ressaltar que não se pode excluir totalmente o envolvimento de transportadores de glutamato neuronais no ensaio de captação de glutamato em fatias de hipocampo, especialmente porque os A_1R são conhecidos por atuar como inibidores pré-sinápticos da liberação de glutamato (Dunwiddie e Masino, 2001). Dados de análise proteômica do nosso grupo, mostraram uma diminuição na expressão da bomba de próton ATPase do tipo V, sugerindo uma possível redução do conteúdo vesicular de glutamato ou liberação mediada pelo pré-condicionamento com NMDA (do Amaral e Silva Müller et al., 2013). A diferente ação a partir da ativação de receptores de adenosina em sítios pré- ou pós-sinápticos e a possível modulação dos transportadores glial ou neuronais de glutamato pela adenosina, é uma questão importante a ser abordada no futuro.

Em conclusão, este estudo mostrou que o pré-condicionamento com NMDA modula afinidade de união do A_1R , sem alterar seus níveis de proteína. Além disso, a ativação do A_1R reverteu o efeito antinociceptivo mediado pelo pré-condicionamento com NMDA, sugerindo que a pós-ativação do A_1R pode interferir com o pré-condicionamento. Ainda o pré-condicionamento com NMDA não alterou a funcionalidade do A_1R no teste do condicionamento ao medo contextual, mas parece promover uma dessensibilização de $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$. E a ativação de ambos A_1R e $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ reverteu o aumento da captação de glutamato em fatias de hipocampo, mediado pelo pré-condicionamento com NMDA. A comunicação entre os sistemas glutamatérgico e adenosinérgico para o efeito do pré-condicionamento com NMDA ainda apresenta mecanismos a serem desvendados.

CAPÍTULO II

Mecanismos e vias de sinalização intracelular do pré-condicionamento com NMDA envolvidos na prevenção de convulsões e de morte celular hipocampal induzidas pelo ácido quinolínico

Este capítulo apresenta os resultados relacionados ao objetivo 3.2.3 desta tese.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos, adultos (30-40 g), mantidos em temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ em um ciclo de 12 horas claro (a partir das 7 horas) e 12 horas escuro, em caixas plásticas (15 animais por caixa) com água e ração disponíveis. Todos os experimentos foram realizados entre às 9:00 – 16:00 horas, após a aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética Institucional local para Pesquisa Animal (CEUA/UFSC PP0549). Os nossos protocolos para experimentos com animais são projetados de maneira que o animal tenha o mínimo de sofrimento possível.

1.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (700 mg/kg; i.p.) (10 mL/Kg do animal) e uma cânula guia foi implantada para infusão intracerebroventricular (i.c.v.) (Schmidt et al, 2000). Em um estereotáxico, a pele do crânio foi removida e uma cânula guia de 27 G/7 mm foi implantada a 1 mm posterior ao bregma, 1 mm à direita da linha mediana, 1 mm abaixo do ventrículo lateral e fixada com cimento acrílico.

1.4 Tratamento com inibidor da via da PI3K

A wortmanina (0,43 $\mu\text{g/sítio}$, 4 μL) um inibidor seletivo para a via de sinalização intracelular da PI3K, foi infundida através de uma agulha de 30 G/8 mm e introduzida pela cânula guia. O inibidor foi diluído em salina 0,9% e administrado 15 min antes do pré-condicionamento com NMDA. A dose utilizada foi baseada em um estudo prévio (Ozaita et al., 2007).

1.5 Pré-condicionamento com NMDA e infusão do Ácido Quinolínico

Os animais foram pré-tratados com uma dose considerada sub-tóxica e não convulsiva de NMDA (75 mg/Kg; i.p.) ou veículo (salina 0,9%; i.p.). Imediatamente após a administração de NMDA foram observados por 30 min, para ocorrência de alguma alteração comportamental (Boeck, et al., 2004).

Após 24 horas do pré-condicionamento as convulsões químicas foram induzidas pelo ácido quinolínico (4 μ L, 36,8 nM, i.c.v), através de uma agulha de 30 G/8 mm, introduzida pela cânula guia. Os animais foram colocados em caixas de acrílico e observados por 10 min para a ocorrência de mudanças comportamentais como: corrida involuntária (do inglês – *wild running*), episódio convulsivo tônico ou clônico e convulsão tônico-clônica, que devem ocorrer por pelo menos 5 segundos (Hallak et al, 1993). Uma escala quantitativa para avaliar a severidade das convulsões induzidas por AQ foi desenvolvida por Vandresen-Filho e colaboradores (2012) baseada em estudos prévios com outros agentes convulsivantes (Cruz et al., 2003; Marganella et al., 2005). Desta forma, a escala Vandresen-Filho quantifica a severidade das convulsões de camundongos de acordo com as seguintes expressões comportamentais: 0 = sem resposta; 1 = imobilidade – movimentos faciais, clônus facial; 2 = hiper mobilidade; 3 = corrida; 4 = saltos e quedas; 5 = convulsão clônica das patas – hipertonia da cauda; 6 = convulsão clônica – tônica generalizada; 7 = convulsão tônica e morte.

Os animais pré-tratados com NMDA que não apresentaram as convulsões foram considerados protegidos. Os animais retornaram para a sua respectiva caixa e permaneceram por 24 horas para os experimentos de viabilidade celular.

1.6 Ensaio de viabilidade celular

1.6.1 Preparação do tecido

Vinte a quatro horas após a indução das convulsões, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (700 mg/kg; i.p.) e perfundidos transcárdialmente com 0,1 M tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4) seguido por 4% de paraformoldeído em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4). Os encéfalos foram removidos e pós-fixados no mesmo fixador por 4h. Os tecidos cerebrais foram crioprottegidos por infiltração com 30% de sacarose em PBS 0,1 M durante a noite. Posteriormente, os tecidos congelados foram seccionados em um criostato (Leica, CM 1850 UV) em seções coronais (40 μ m), e em seguida foram colocadas em placas de seis poços contendo PBS (1x) mais azida sódica a 0,1%.

1.6.2 Histoquímica para Fluoro-jade B

A histoquímica para Fluoro-Jade B foi utilizada como um indicativo de degeneração neuronal. As fatias histológicas foram imersas em etanol 100 % por 3 min, em seguida, em etanol a 70% por 1 min e água destilada por 1 min, as fatias foram imersas em solução de permanganato de potássio 0,06% durante 15 min sob agitação, em seguida foram lavadas com água destilada por 1 min. A coloração foi realizada através da solução de Fluoro-Jade B (10 mL de 0,01% da solução aquosa de Fluoro-Jade B para 90 mL de ácido acético 0,1% em água destilada) durante 30 min. Após a coloração, as fatias foram lavadas três vezes com água destilada. O excesso de água foi retirado, e as lâminas foram imersas em xilol e as lamínulas foram colocadas utilizando DPX (Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI) como meio de montagem. As fatias foram visualizadas em um microscópio de epifluorescência (Olympus - Modelo BX41) utilizando um sistema de filtro com rodamina, com objetiva de 20x para a visualização fluorescente no hipocampo de camundongos. Imagens digitais do hipocampo total e da região CA1 do hipocampo foram obtidas por meio de uma câmera acoplada ao microscópio. A fluorescência foi analisada pela densitometria em uma magnificação de 40x pelo programa computacional Image J[®] 1.36 (National Institute of Health, USA).

1.7 Imunodeteção de proteínas

1.7.1 Preparação das amostras

A wortmanina (0,43µg/sítio, 4µL) foi administrada 15 min antes do pré-condicionamento com NMDA (75 mg/Kg, i.p.) ou veículo (salina 0,9%, i.p.) e após 24 h os animais foram mortos por decaptação e os hipocampus rapidamente removidos e colocados em nitrogênio líquido e guardados a -80° C até o dia da preparação das amostras. Durante a dissecação os hipocampus foram mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; 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 7,4. As amostras foram homogeneizadas mecanicamente em 400 µL de Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol a 10%, coquetel inibidor de protease (Sigma - P2714) e, em seguida, incubadas durante 10 min em gelo. Os homogenatos foram centrifugados (10.000 xg durante 10 min a 4 ° C). Os sobrenadantes foram diluídos 1/1 (v/v) em 100 mM Tris pH 6,8, EDTA 4 mM, 8% de SDS e fervidos durante 5 min. Depois disso,

foram adicionadas às amostras as seguintes soluções: glicerol a 40%, Tris 100 mM, azul de bromofenol, pH 6,8 na proporção de 25:100 (v/v) e β mercaptoetanol (concentração final de 8%) (Oliveira, et al., 2008).

1.7.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada por método de Peterson (1977). Albumina Bovina Sérica (BSA) (Sigma) foi utilizada como padrão.

1.7.3 Separação de proteínas

As proteínas (60 μ g/poço) foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS), utilizando gel de separação de poliacrilamida com concentração de 10%, 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.

1.7.4 Eletrotransferência e imunodeteção

As proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45 μ m) (1,5 horas a 4°C, 350 mA). Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 1 h com albumina 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). Finalmente as membranas foram incubadas com os anticorpos específicos anti-fosfoAkt e anti-Akt total (Millipore, diluição 1:1000), anti-fosfoGSK-3 β e anti-GSK-3 β total (Millipore, diluição 1:1000), anti-fosfoERK1/2 (Millipore, diluição 1:40000) e anti-ERK1/2 total (Millipore, diluição 1:2000), anti-fosfop38 (Millipore, diluição 1:1000) e anti-p38 total (Millipore, diluição 1:10000) anti-beta actina (Cell Signalling, diluição 1:1000). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário (ligado à peroxidase) anti-rabbit (Millipore, diluição 1:5000) ou anti-mouse (Millipore, diluição 1:5000) e após lavagens, foram reveladas em filme autoradiográfico após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose (Kit ECL), de acordo com as recomendações do fabricante, e impressão de imagem em filme auto-radiográfico. As imagens foram digitalizadas para

quantificação densitométrica das bandas proteicas dos complexos imunes (software Scion Image, Beta 4.0.2; Scion Corporation, Frederick, MD).

1.8 Análise estatística

A incidência de convulsões foi analisada pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$). As demais análises estatísticas foram realizadas com a análise de variância de uma via (ANOVA), seguidas pelo de Tukey quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas em $> 95\%$ de confiança em todos os testes.

2 RESULTADOS

Como previamente descrito, a administração de AQ (36, 8 nmol, i.c.v.) induz convulsão em 100% dos animais (Boeck et al., 2004; Vandresen-Filho et al., 2007). Além disso, o pré-condicionamento com NMDA (75 mg/Kg, i.p.) previne as convulsões induzidas por AQ em aproximadamente 53,3% dos animais. Analisando as vias de sinalização envolvidas no efeito protetor do pré-condicionamento com NMDA, observou-se que a inibição da via de sinalização da PI3K/Akt, pelo inibidor wortmanina (0,43 µg/sítio, 4µL), bloqueia o efeito anticonvulsivante desencadeado pelo pré-condicionamento com NMDA (de Araújo Herculano et al., 2011) (Fig. 1A).

De acordo com a presença ou não de crises tônico-clônicas em resposta à infusão de AQ, os camundongos pré-condicionados com NMDA foram considerados protegidos (NMDA+AQ camundongos que não convulsionaram, grupo NMDA+AQnc) ou não protegidos (NMDA+AQ camundongos que convulsionaram, grupo NMDA+AQc). Os resultados demonstraram que os animais tratados com AQ, NMDA+AQ e Wort+NMDA+AQ apresentaram alterações comportamentais como: corrida, salto e queda, convulsão clônica das patas, convulsão clônica – tônica, seguido ou não por morte. Os animais pré-condicionados com NMDA considerados protegidos (NMDA+AQnc) apresentaram um perfil muito abaixo na escala de severidade em comparação aos grupos AQ, NMDA+AQc e Wort+NMDA+AQ, não demonstrando alterações na análise comportamental, como convulsão clônica ou convulsão clônica – tônica (Fig 1B).

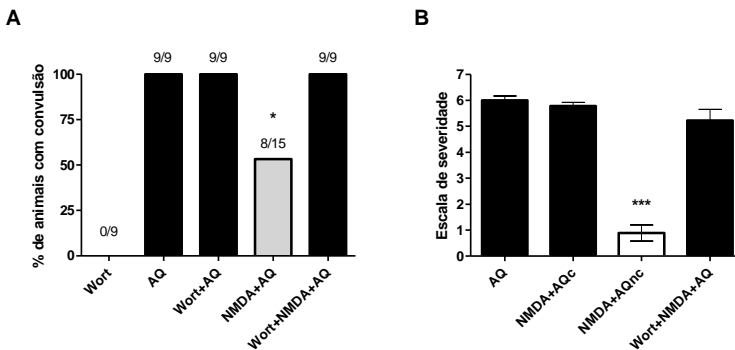


Figura 1: Efeito do pré-condicionamento com NMDA e a inibição da via PI3K, na incidência de convulsões induzidas por AQ e na escala de severidade. Os animais foram tratados com veículo (salina 0,9% - grupo controle) ou NMDA (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8nM, i.c.v) e foram observados por 10 min para a ocorrência de convulsões. Os animais receberam wortmanina (Wort) (0,43 µg/sítio, i.c.v.), um inibidor da via PI3K; grupo controle (Sal+Wort) 15 min antes do NMDA (Wort+NMDA+AQ) ou 15 min antes da infusão de AQ (Wort+AQ). **(A)** Representa a porcentagem de animais com convulsões induzidas por AQ. O número de animais por grupo está indicado acima das barras. * representa diferença em relação a todos os grupos ($P < 0,05$), de acordo com teste exato de Fisher. **(B)** Escala de severidade Vandresen-Filho para quantificação das convulsões induzidas por AQ, em animais pré-condicionados com NMDA. Barras pretas representam animais com convulsão, barra cinza – animais com ou sem convulsão e barra branca – animais que não convulsionam. Valores estão expressos como média \pm EPM (n=9). *** $P < 0,001$ comparado aos demais grupos. (ANOVA de uma via, seguido por Tukey).

A detecção de degeneração neuronal é importante para a compreensão de doenças neurodegenerativas e para avaliação de drogas neuroprotetoras (Schmued et al., 2005). A fim de avaliar se a administração i.c.v de AQ induz degeneração neuronal foi realizada a análise histológica por Fluoro-Jade B. Neste mesmo protocolo avaliou-se o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA e o tratamento com o inibidor da PI3K.

A figura 2A mostra um aumento na densidade óptica para a marcação com Fluoro- jade B nos grupos AQ e NMDA+AQc, enquanto que os animais pré-tratados com NMDA e considerados protegidos das convulsões (NMDA+AQnc) e os animais que receberam o inibidor da PI3K (wortmanina, 0,43µg/sítio, 4µL, i.c.v) apresentaram uma redução na densidade óptica para a marcação com Fluoro- jade B. Os mesmos resultados foram observados para a contagem de neurônios na região CA1 do hipocampo (Fig 2B e 2C). Portanto, a inibição da via da PI3K é efetiva em abolir o efeito protetor do pré-condicionamento sobre a indução de convulsões por AQ, mas não interfere com a proteção neuronal promovida pelo pré-condicionamento com NMDA.

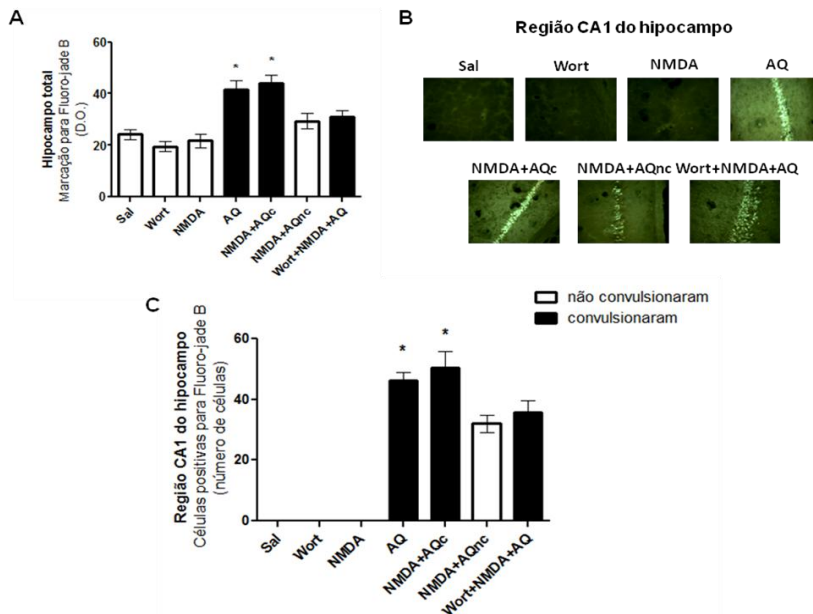


Figura 2: Efeito do pré-condicionamento com NMDA e a inibição da via PI3K, na degeneração neuronal induzida pelo AQ. Os animais foram tratados com veículo (salina 0,9% - grupo controle) ou NMDA (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8nM, i.c.v) e foram observados por 10 min para a ocorrência de convulsões. Os animais receberam wortmanina (Wort) (0,43 µg/sítio, i.c.v.), um inibidor da via PI3K, ou salina (grupo controle -Sal) 15 min antes do NMDA (Wort+NMDA+AQ) ou 15 min antes da infusão de AQ (Wort+AQ). 24 h após a indução das convulsões os animais foram perfundidos para posterior preparação histológica do tecido e realizado a detecção de degeneração neuronal por Fluoro – jade B. **(A)** O gráfico representa a densidade óptica de células marcadas para Fluoro - jade B. **(B)** Figuras representativas para a marcação com Fluoro-jade B na região CA1 do hipocampo (magnificação de 40x). **(C)** Representa o número de células positivas para Fluoro-jade B na região CA1 do hipocampo. Barras pretas representam os animais que apresentaram comportamento convulsivo e barras brancas – os animais que não convulsionaram. NMDA + AQc indica os animais que apresentaram comportamento convulsivo e NMDA + AQnc indica os animais que não convulsionaram. Valores estão expressos como média ± EPM de (n=8). * P <0,05 comparado com todos os grupos.

Para estudar o envolvimento de vias de sinalização celular específicas no mecanismo neuroprotetor do pré-condicionamento químico mediado por NMDA, realizou-se a imunodeteção da proteína Akt, em sua isoforma fosforilada (ativa) e o conteúdo total desta proteína. Desta forma, foi utilizado um inibidor seletivo para a via da PI3K, a wortmanina. Os animais receberam o inibidor da PI3K

(wortmanina, 0,43 μ g/sítio, 4 μ L, i.c.v), após 15 min foram pré-condicionados com NMDA (75 mg/kg, i.p.), após 24 h foram infundidos com AQ (36,8nM, i.c.v) e 24 h após foram mortos e os hipocampus dissecados para imunodeteccção de proteína. Considerando que este é o período onde se identifica a morte neuronal induzida por AQ, a avaliação da participação das vias de sinalização celular foi realizada 48 h após o pré-condicionamento com NMDA.. Os dados demonstraram que não houve alteração nos níveis da proteína Akt tanto no seu estado fosforilado quanto o conteúdo total em nenhum dos grupos (Fig. 3).

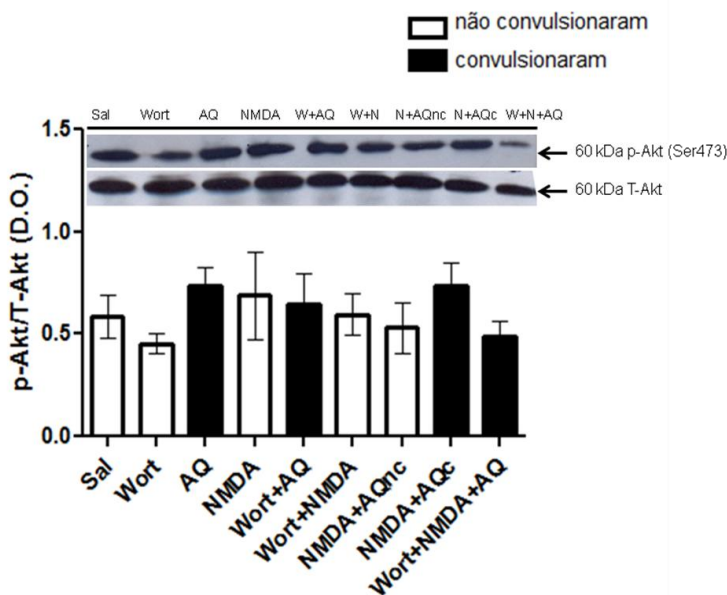


Figura 3: Imunodeteccção da proteína Akt fosforilada e total no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NMDA. Os animais foram pré-tratados com wortmanina (0,43 μ g/sítio, 4 μ L, i.c.v), após 15 min foram pré-condicionados com NMDA (75 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina 0,9%, i.p.), 24 h depois foram infundidos com AQ (36,8 nM, i.c.v) e 24 h após os hipocampus foram dissecados e as amostras foram preparadas para a imunodeteccção dos níveis de Akt fosforilada e total. Barras pretas representam os animais que apresentaram comportamento convulsivo e barras brancas – os animais que não convulsionaram. NMDA + AQc indica os animais que apresentaram comportamento convulsivo e NMDA + AQnc indica os animais que não convulsionaram. O gráfico representa a razão entre p-Akt e T-Akt, a densidade óptica das bandas foi detectada conforme descrito nos procedimentos experimentais. Os dados são expressos como a média \pm EPM (n=6).

Uma vez que não foram observadas alterações nos níveis da proteína Akt no tempo de 48 h após o pré-condicionamento com NMDA, optou-se por analisar a participação desta proteína, bem como a comunicação desta via (do inglês – *crossstalk*) com outras proteínas que participam de mecanismos de proteção ou morte celular, tais como: GSK-3 β , ERK1/2 e p38^{MAPK} em suas isoformas fosforiladas (ativadas, ou inibidas no caso da GSK-3 β) e o conteúdo total destas proteínas, na janela de proteção induzida pelo pré-condicionamento com NMDA (24 h).

Os resultados demonstraram que mesmo quando analisada 24 h após o pré-condicionamento com NMDA, a proteína Akt não apresentou alteração nas suas isoformas fosforilada ou total. A proteína GSK-3 β , um alvo da Akt, também foi analisada e não demonstrou alteração nas suas isoformas fosforilada ou total 24 h após o pré-condicionamento com NMDA (Fig. 4A e 4B).

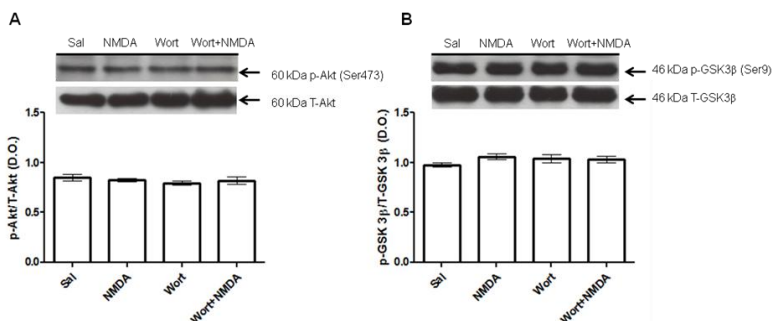


Figura 4: Imunodeteção das proteínas Akt e GSK3 β fosforilada e total no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NMDA. Os animais foram pré-tratados com wortmanina (0,43 μ g/sítio, 4 μ L, i.c.v.), após 15 min foram pré-condicionados com NMDA (75 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina 0,9%, i.p.), e 24 h após os hipocampus foram dissecados e as amostras foram preparadas para a imunodeteção dos níveis de Akt e GSK-3 β fosforilada e total. **(A)** O gráfico representa a razão entre p-Akt e T-Akt, a densidade óptica das bandas foi detectada conforme descrito nos procedimentos experimentais. Os dados são expressos como a média \pm EPM (n=6). **(B)** O gráfico representa a razão entre p-GSK-3 β e T-GSK-3 β , a densidade óptica das bandas foi detectada conforme descrito nos procedimentos experimentais. Os dados são expressos como a média \pm EPM (n=6).

Está bem descrito na literatura que a sinalização pelas vias PI3K-Akt e MEK1/2-ERK1/2 podem colaborar de forma dependente uma da outra para manter a viabilidade da célula (Dent, 2014), além disso, a ativação ou inativação destas proteínas podem ocorrer em

períodos de minutos ou horas. Já foi demonstrado que o inibidor seletivo para MEK, o PD98059, também bloqueia a proteção mediada pelo pré-condicionamento com NMDA contra as convulsões induzidas por AQ, sugerindo a participação da via das MAPKs no mecanismo de proteção do pré-condicionamento (de Araújo Herculano et al., 2011). Por este motivo, utilizando um inibidor da PI3K, foram observados os níveis de fosforilação e conteúdo total das MAPKs: ERK1/2 e p38^{MAPK}. Os resultados para a imunodeteccção demonstraram que tanto o bloqueio da sinalização pela PI3K, como o pré-condicionamento com NMDA não alteraram os níveis destas proteínas na isoforma fosforilada e o conteúdo total (Fig 5A, 5B e 5C).

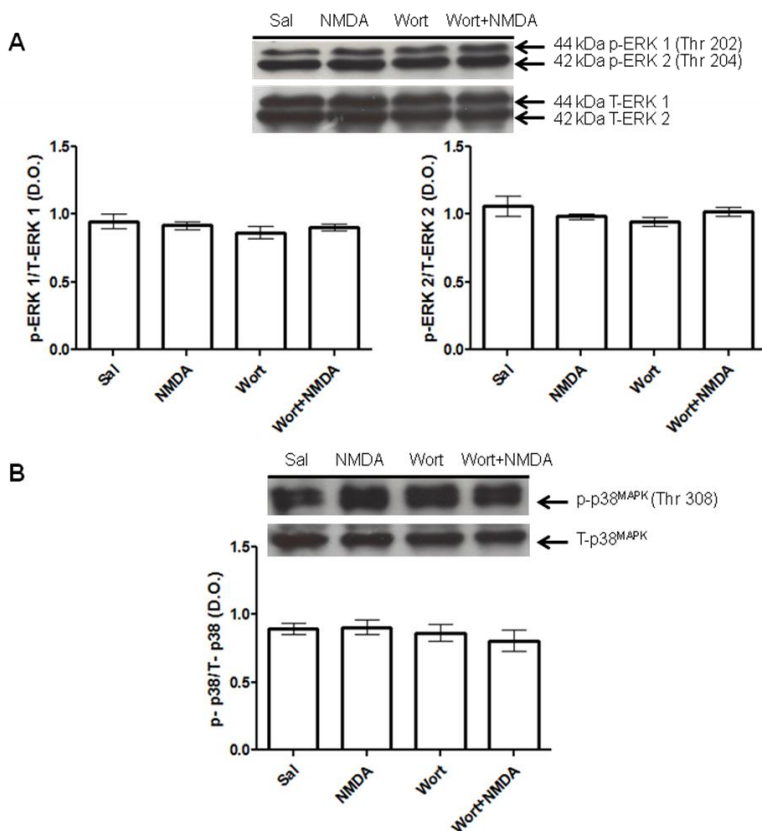


Figura 5: Imunodeteccção das proteínas ERK1/2 e p38^{MAPK} fosforilada e total no hipocampo de camundongos pré-condicionados com NMDA. Os animais foram pré-tratados com wortmanina (0,43µg/sítio, 4µL, i.c.v), após 15 min foram pré-condicionados

com NMDA (75 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina 0,9%, i.p.), e 24 h após os hipocampus foram dissecados, e as amostras para a imunodeteção dos níveis de Akt e GSK-3 β fosforilada e total foram preparadas. **(A)** O gráfico representa a razão entre p-ERK1/2 e T-ERK1/2, a densidade óptica das bandas foi detectada conforme descrito nos procedimentos experimentais. Os dados são expressos como a média \pm EPM (n=6). **(B)** O gráfico representa a razão entre p-p38^{MAPK} e T-p38^{MAPK}, a densidade óptica das bandas foi detectada conforme descrito nos procedimentos experimentais. Os dados são expressos como a média \pm EPM (n=6).

3 DISCUSSÃO

O pré-condicionamento representa uma resposta adaptativa capaz de preparar o tecido cerebral para a proteção contra danos futuros (Shpargel et al., 2008). Portanto a elucidação das vias de sobrevivência envolvidas neste processo de neuroproteção é um importante mecanismo a ser estudado. Sabe-se que um dos importantes mediadores envolvidos na neuroproteção induzida pelo receptor NMDA é a via da PI3K (Soriano et al., 2006). De acordo com de Araújo Herculano e colaboradores (2011), a utilização do inibidor seletivo para a PI3K, a wortmanina, bloqueia completamente o efeito protetor mediado pelo pré-condicionamento com NMDA contra convulsões induzidas por AQ em camundongos. Neste mesmo trabalho, evidenciou-se que o inibidor seletivo para a MEK reduz 75% do efeito protetor do pré-condicionamento e o inibidor para PKA também bloqueia completamente a prevenção de indução de convulsões induzidas pelo AQ. Por esta razão, a participação da via da PI3K foi inicialmente avaliada sobre a sobrevivência neuronal e na fosforilação de proteínas alvo da via PI3K.

Os dados do presente estudo confirmam que a inibição da PI3K pela wortmanina, bloqueia o efeito protetor do pré-condicionamento com NMDA frente às convulsões induzidas por AQ. Por outro lado, nossos dados também demonstram que a inibição desta via é ineficaz em bloquear a prevenção de morte celular hipocampal causada pelo pré-condicionamento. Um estudo anterior demonstrou que o bloqueio do receptor A₁ de adenosina pelo antagonista CPT, também foi capaz de bloquear a proteção mediada pelo pré-condicionamento com NMDA frente à indução de convulsões pelo AQ, mas não bloqueou a proteção observada na morte celular (Boeck et al., 2004). Nosso grupo já mostrou que o pré-condicionamento com NMDA promove um aumento da

excitabilidade neuronal, medida através de registro eletroencefalográfico, em animais que não manifestam comportamento convulsivo. Estes resultados sugerem que o aumento da atividade elétrica diminui a probabilidade de os animais exibirem comportamento convulsivo após a infusão de AQ (Vandresen-Filho et al., 2012). Desta forma, sugere-se que a via da PI3K esteja relacionada com fases iniciais do pré-condicionamento com NMDA, onde se observa um aumento da excitabilidade neuronal e que a inibição desta via não interfere com os mecanismos mais tardios de proteção celular, confirmando que devem existir diferentes mecanismos relacionados à aquisição de proteção comportamental ou tecidual.

Um estudo realizado em um modelo de isquemia que produz morte neuronal tardia em neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo, demonstrou que a isquemia cerebral não apenas inicia um processo de morte celular, mas também ativa fatores de sobrevivência celular. A liberação de citocromo c e ativação de proteases como a caspase – 3 depois de 36 h de reperfusão pode superar a ativação inicial de fatores de sobrevivência como a Akt após isquemia e resultar em morte celular tardia. Este mesmo estudo mostrou que há um aumento da fosforilação da Akt no sítio para serina-473 no hipocampo, durante as primeiras 24 h, mas não após 48 h de reperfusão (Ouyang et al., 1999). Estes achados estão de acordo com a diferença observada no efeito da wortmanina em bloquear a proteção mediada pelo pré-condicionamento com NMDA contra as convulsões induzidas por AQ, mas não afetar o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA frente à morte neuronal.

Estas evidências corroboram com os dados descritos no presente trabalho, demonstrando que tanto a infusão de AQ quanto o pré-condicionamento com NMDA não alteraram os níveis de fosforilação da Akt após 48 h. Ressaltando que o inibidor da PI3K foi administrado 15 min antes do pré-condicionamento com NMDA e 24 h após os animais foram infundidos com AQ e observada a incidência de convulsões, enquanto que a morte celular foi observada 24 h após o tratamento com AQ, ou seja, 48 h após o bloqueio da PI3K e o pré-condicionamento com NMDA. Também já foi demonstrado que a wortmanina atenuou a formação de superóxido e a morte celular em cultura de neurônios corticais, no entanto, bloqueou outras respostas da ativação do receptor NMDA, como o aumento de Ca^{2+} intracelular, despolarização mitocondrial, ou inchaço celular (Brennan-Minnella et al., 2013).

Em contradição ao trabalho de Ouyang e colaboradores (1999), não foram observadas alterações nos níveis de fosforilação da Akt, 24 h

após o bloqueio da PI3K e pré-condicionamento com NMDA. A proteína GSK-3 β , um alvo da Akt, também não demonstrou alteração nos níveis de fosforilação, 24 h após o pré-condicionamento com NMDA, bem como as MAPKs ERK 1/2 e p38^{MAPK}.

Um recente estudo *in vivo*, confirmou que a neuroproteção induzida pelo pré-condicionamento com dexmedetomidina, em um modelo de isquemia cerebral, é mediada pela ativação da PI3K/Akt e ERK1/2, bem como a fosforilação da GSK-3 β após 24 h de reperfusão (Zhu et al., 2013). No entanto, este efeito não foi observado com o pré-condicionamento com NMDA.

Considerando que a participação destas vias de sinalização na proteção contra convulsões induzidas por AQ já foi observada, sugere-se que a neuroproteção pelo pré-condicionamento com NMDA também poderia ativar estas vias de sinalização (PI3K/Akt e MAPK/ERK 1/2), no entanto, é possível que isto ocorra em períodos de tempo mais curtos (minutos ou horas) após o pré-condicionamento. Ou ainda, a via da PI3K poderia atuar sobre o pré-condicionamento com NMDA, através de outros alvos que não foram avaliados neste estudo. Desta forma, os resultados confirmam que a via da PI3K participa dos mecanismos de proteção induzido pelo pré-condicionamento com NMDA contra convulsões induzidas por AQ. Em relação aos mecanismos envolvidos na proteção celular, necessita-se de mais estudos para verificar o tempo de fosforilação das proteínas envolvidas.

CAPÍTULO III

Efeito do pré-condicionamento com NMDA sobre a toxicidade induzida por ácido quinolínico e glutamato em cultura primária de neurônios e em fatias hipocâmpais

Este capítulo apresenta os resultados relacionados ao objetivo 3.2.4 desta tese.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Análise do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por ácido quinolínico em cultura primária de neurônios hipocampais

1.1.1 Preparação de cultura primária de neurônios hipocampais

As culturas primárias de neurônios hipocampais foram preparadas a partir de ratos Wistar de 0 a 3 dias, conforme descrito por Nunez (2008), com algumas modificações. Após a decapitação dos ratos neonatos, os cérebros foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo uma solução estéril de tampão de Hank (HBSS) 1x contendo 0,5% de glicose a 37°C. Com o auxílio de uma lupa, os hipocampos foram dissecados, as meninges foram retiradas e o tecido foi dissociado por tripsinização (0,1% de tripsina (w/v), 37°C, 10 min) e mecanicamente com pipetas Pasteur de pontas flambadas. Em seguida, as células foram colocadas em um tubo Falcon com uma solução contendo HBSS 1x, HEPES 1M, BSA (10 mg/ml – Sigma) e ovomucoide (inibidor de tripsina – 10 mg/ml) e centrifugadas a 122 *xg* por 10 minutos à temperatura ambiente. Após remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) não suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 5% de soro de cavalo inativado (SHI), 5000 U/mL de penicilina/estreptomicina, e 2 mM de glutamina. Após quantificação em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas na densidade de 100.000 células/poço em q.s.p. 500 µL de meio por poço. O plaqueamento foi feito em placas de 24 poços previamente tratadas com solução de poli-L-lisina a 10 µg/mL. As culturas foram mantidas a 37°C, em estufa contendo 5% CO₂/95% ar atmosférico, pelo período de 21 dias *in vitro* (DIV). Depois do período de 24 horas, foi adicionado meio Neurobasal suplementado com 1% v/v B-27, 5000 U/mL de penicilina/estreptomicina, 0,5% v/v de Glutamax e 0,6% v/v de glicose (GIBCO Life Technologies, Paisley, Scotland). O crescimento de células não neuronais foi inibido através da adição de 5 µM de citosina arabinofuranoside (AraC) no 3°, 10° e 17° DIV e o meio foi mantido sem qualquer alteração durante o período de cultura.

1.1.2 Pré-condicionamento com NMDA e toxicidade induzida por AQ

Primeiramente, foi realizada uma curva de tempo para estabelecer o período de exposição em que o AQ é capaz de ocasionar dano neuronal. As culturas primárias de neurônios hipocâmpais com 21 DIV, foram expostas por 15 min, 30 min ou 1 hora ao AQ (500 μ M), seguida pelo protocolo de avaliação de morte celular.

Para induzir o pré-condicionamento com NMDA as células foram expostas por 5 min a uma concentração de 50 μ M de NMDA/10 μ M de glicina em meio Neurobasal suplementado, como descrito acima (Dai et al., 2010). O tratamento foi interrompido pela lavagem das células com PBS 1x e reexposição ao meio de crescimento. Após 24 horas as culturas foram expostas por 30 min ou 1 hora a uma concentração de 500 μ M de AQ para indução da toxicidade. A exposição foi interrompida através de lavagem das células com PBS 1x, seguido pelo protocolo de viabilidade celular ou produção de espécies reativas (ER).

1.1.3 Avaliação de morte celular

A morte neuronal foi determinada através da incorporação de iodeto de propídio. O iodeto é um composto capaz de intercalar-se à molécula de DNA (corante de ácidos nucleicos), gerando fluorescência frente à luz UV, produzindo fluorescência vermelha, quando excitado a 495 nm. O iodeto de propídio não penetra na membrana de células viáveis, sendo um método eficiente para detecção da integridade de membrana e um bom indicativo de morte celular por necrose quando a membrana da célula é rompida após algum dano (Macklis e Madison, 1990).

Para isso as células foram expostas ao iodeto de propídio (80 μ g/ml) por 5 min, a 37 °C e em seguida lavadas com PBS 1x para análise no microscópio invertido (Olympus IX 71), utilizando filtro de rodamina (Ciruela, et al., 2001). As figuras representativas foram tiradas com uma câmera Olympus C5060, e a quantificação realizada pela contagem do número de células marcadas com iodeto de propídio.

1.1.4 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para medir a geração de EROs neuronal, foi utilizada uma sonda molecular H₂DCFDA (Ha et al., 1997). Os neurônios foram expostos a 10 μ M H₂DCFDA por 20 min. O H₂DCFDA se difunde através da membrana da célula e é hidrolisado por esterases intracelulares para a forma não fluorescente, 2',7'-

diclorodihidrofluoresceína (DCFH). DCFH reage com H_2O_2 intracelular e forma 2',7'- diclorofluoresceína (DCF), um corante fluorescente verde. A fluorescência foi quantificada em um leitor de microplacas (Infinite M200 – Tecan). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 485 e 520 nm, respectivamente (Egea et al., 2007).

1.2 Avaliação *in vitro* do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por glutamato

1.2.1 Preparação de fatias hipocampais

Camundongos albinos Swiss machos, adultos (30-40 g), foram mortos por decapitação e os hipocampos foram rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; $CaCl_2$ 1,3 mM; $MgSO_4$ 1,2 mM; KH_2PO_4 0,4 mM; $NaHCO_3$ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O_2 - 5% CO_2) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain e foram pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37 °C, sendo gaseificadas com carbogênio (Molz et al., 2005).

1.2.2 Pré-condicionamento com NMDA e tratamento com bloqueadores em fatias hipocampais

O pré-condicionamento com NMDA foi induzido através da incubação das fatias de hipocampo por 5 min, 30 min, 1 hora ou 2 horas com 50 μ M NMDA/10 μ M glicina em tampão KRB (Dai et al., 2010). Após a curva de tempo de pré-condicionamento, o meio contendo NMDA foi retirado e realizado o protocolo de indução de toxicidade por glutamato.

Quinze minutos antes da indução do pré-condicionamento com NMDA, as fatias foram incubadas com inibidor seletivo do receptor A_1 de adenosina, o DPCPX (250 nM) ou com o bloqueador dos canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}), a Iberiotoxina (10 nM).

1.2.3 Indução da toxicidade induzida por glutamato em fatias hipocampais

O dano celular excitotóxico foi induzido através da incubação das fatias de hipocampo por 1 hora com glutamato (10mM) (Molz et al.,

2008) em tampão KRB. Após este período, o meio foi retirado e substituído por meio de cultura composto por 50% de Krebs-Ringer, 50% de meio de cultura (Dubelco's-MEM), 20 mM de HEPES (pH 7,4) e 100 µg/mL de gentamicina e as fatias incubadas por mais 4 horas. Após esse período, a viabilidade celular das fatias foi avaliada pelo método de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio = Thiazolyl blue).

1.2.4 Ensaio da viabilidade celular

Ao final do experimento de indução da toxicidade glutamatérgica, a viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson e Fowler, 1999). Após o período de exposição ao glutamato, o meio foi substituído por uma solução de 0,5 mg/mL de MTT (em 200 µL) e as fatias hipocâmpais e corticais foram incubadas à 37 °C por 30 minutos. Esta solução foi descartada e o sal de formazam reduzido nas fatias cerebrais foi solubilizado pela adição do mesmo volume de dimetil-sulfóxido (DMSO). A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (550 nm).

1.3 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguidas pelo teste de Tukey quando apropriado para as análises de viabilidade celular e produção de EROs em cultura primária de neurônios hipocâmpais, e para a avaliação *in vitro* em fatias hipocâmpais. As diferenças foram consideradas significativas em > 95% de confiança em todos os testes.

2 RESULTADOS

A fim de observar o efeito do pré-condicionamento com NMDA frente à toxicidade induzida por AQ em cultura primária de neurônios hipocampais, foi avaliada a morte neuronal através da incorporação de iodeto de propídeo.

As culturas primárias de neurônios hipocampais foram expostas por 15 min, 30 min ou 1 hora ao AQ (500 μ M), seguida pelo protocolo de avaliação de morte celular. O tratamento com AQ induz morte neuronal caracterizada pelo aumento do número de células positivas para iodeto de propídeo nos tempos de 30 min e 1 hora (Fig. 1).

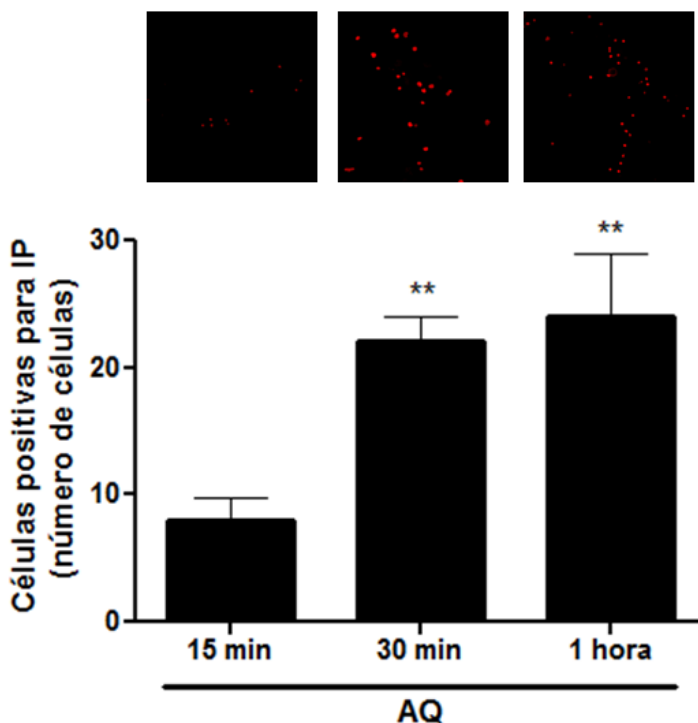


Figura 1: Curva de tempo para a toxicidade induzida por AQ em cultura primária de neurônios hipocampais. As culturas primárias de neurônios hipocampais com 21 DIV, foram expostas a uma concentração de 500 μ M de AQ por 15 min, 30 min ou 1 hora. A exposição foi interrompida através da lavagem das células com PBS 1x, seguido pelo protocolo de avaliação de morte celular. Figuras representativas para células marcadas com iodeto de propídeo e o gráfico representa o número de células positivas

para a incorporação com iodeto de propídeo (IP) (magnificação de 40x). Os dados representam a média \pm EPM ** P <0,05 comparado com todos os grupos, (n = 5) (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

Uma vez que o tratamento com AQ induz morte neuronal nos tempos de 30 min e 1 hora, o efeito do pré-condicionamento com NMDA frente à toxicidade induzida por AQ em cultura primária de neurônios hipocampais foi avaliado nos mesmos períodos. Para isso as células foram expostas por 5 min a uma concentração de 50 μ M de NMDA/10 μ M de glicina e após 24 horas as culturas foram expostas por 30 min ou 1 hora a uma concentração de 500 μ M de AQ para indução da toxicidade.

O pré-condicionamento com NMDA previne a morte celular induzida por AQ no período de 30 min. O mesmo efeito não foi observado para o período de exposição ao AQ por 1 hora (Fig. 2A e 2B).

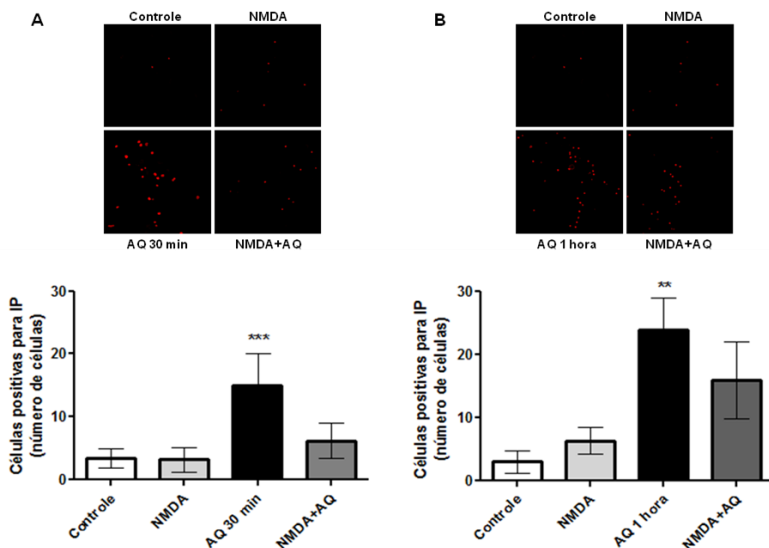


Figura 2: Análise do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por AQ em cultura primária de neurônios hipocampais. As culturas primárias de neurônios hipocampais foram expostas por 5 min a uma concentração de 50 μ M de NMDA/10 μ M de glicina. Após 24 horas as culturas foram expostas por 30 min (A) ou 1 hora (B) a uma concentração de 500 μ M de AQ para indução da toxicidade. A exposição foi interrompida lavagem das células com PBS 1x, seguido pelo protocolo de avaliação de morte celular. Figuras representativas para células marcadas com iodeto de propídeo e o gráfico representa o número de células positivas para a incorporação com iodeto de

propídeo (IP) (magnificação de 40x). Os dados representam a média \pm EPM ***P<0,001 e **P<0,01 comparado com todos os grupos, (n = 5) (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey).

Visto que o pré-condicionamento com NMDA protege os neurônios da morte celular promovida por AQ em cultura primária de neurônios hipocampais, e sabendo que o AQ induz geração de EROs, avaliou-se a geração de EROs pela emissão de fluorescência da sonda H₂DCFDA. A exposição ao AQ no período de 30 min demonstrou um aumento na emissão de fluorescência do H₂DCFDA, indicando aumento na geração de EROs. Observou-se que o pré-condicionamento com NMDA não preveniu o aumento de EROs nos neurônios hipocampais (Fig. 3). Demonstrando que o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA independe do bloqueio da produção de EROs.

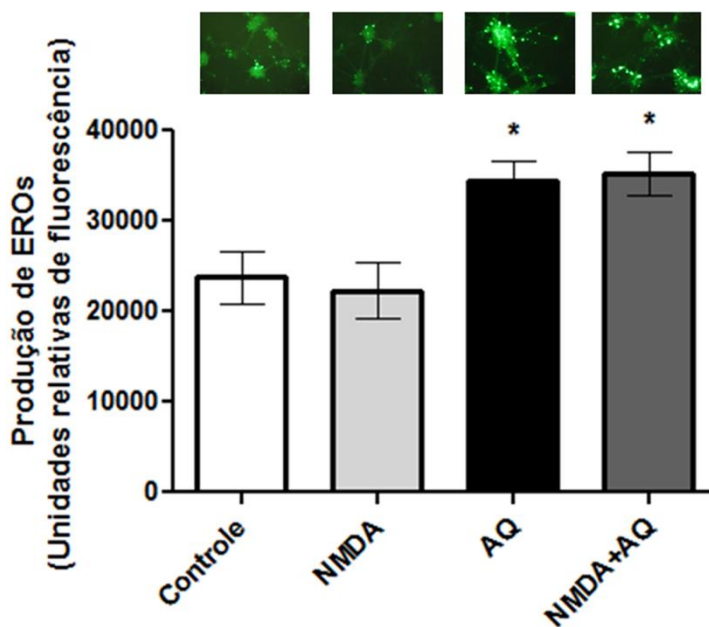


Figura 3: Efeito do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por AQ em cultura primária de neurônios hipocampais na geração de EROs. As culturas primárias de neurônios hipocampais foram expostas por 5 min a uma concentração de 50 μ M de NMDA/10 μ M de glicina. Após 24 horas as culturas foram expostas por 30 min a uma concentração de 500 μ M de AQ para indução da toxicidade. A exposição foi interrompida pela lavagem das células com PBS 1x, seguido pelo protocolo de avaliação de produção de EROs. O gráfico representa a geração de ER

quantificada por unidades relativas de fluorescência do H₂DCFDA. Figuras representativas para células marcadas com H₂DCFDA (magnificação de 40x). Os dados representam a média \pm EPM *** P <0,001 comparado com os grupos controle e NMDA, (n = 4) (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

Técnicas *in vitro* utilizando fatias derivadas de diferentes regiões do cérebro, são importantes ferramentas para o estudo dos mecanismos de neuroproteção e neurotoxicidade. As fatias de tecido apresentam vantagens em relação a outros modelos *in vitro* pelo fato de que mantêm a citoarquitetura do tecido de origem, visto que preservam as interações neurônio-glia (Gähwiler et al., 1997). Por este motivo, o efeito do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por glutamato foi avaliado em fatias de hipocampo de camundongos.

A figura 4 demonstra que o tratamento com NMDA (50 μ M/10 μ M glicina) nos períodos de 5 min, 30 min e 1 hora não foi capaz de induzir pré-condicionamento em fatias de hipocampo expostas a toxicidade induzida por glutamato (10 mM). Porém a incubação das fatias com NMDA (50 μ M/10 μ M glicina) por 2 horas foi capaz de promover uma tolerância celular (pré-condicionamento), uma vez que o NMDA previne a perda de viabilidade celular desencadeada pela toxicidade induzida por glutamato.

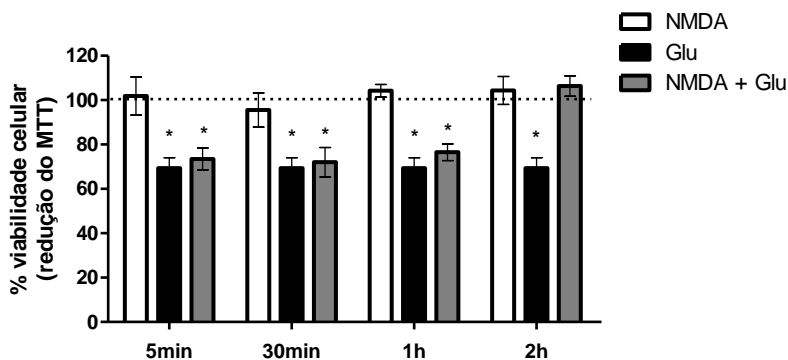


Figura 4: Avaliação *in vitro* do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por glutamato. As fatias de hipocampo foram mantidas em KRB (controle) por 30min, em seguida incubadas com NMDA (50 μ M/10 μ M glicina) por 5 min, 30 min, 1 hora ou 2 horas. A toxicidade foi induzida por glutamato (10 mM) em KRB por 1 hora, após esse período o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) que foi incubado por 20 minutos a 37° C, e a viabilidade celular foi avaliada a 550 nm. O grupo controle foi considerado como tendo

100% de viabilidade celular. Os valores apresentam a média \pm EPM (n=5) (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey). * indica grupos significativamente diferentes do grupo controle (100%) e grupo NMDA; $P < 0,05$.

Uma vez que o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA frente à toxicidade glutamatérgica foi demonstrado no tempo de incubação de 2 horas com NMDA, este protocolo de incubação foi o escolhido para a realização dos experimentos subsequentes.

Embora os mecanismos envolvidos no pré-condicionamento com NMDA não estejam completamente elucidados, sabe-se que a neuroproteção mediada pelo NMDA é dependente da ativação dos receptores A_1 de adenosina, visto que o bloqueio destes receptores por seus antagonistas seletivos bloqueou o efeito do pré-condicionamento com NMDA (Boeck et al., 2004). A ativação dos canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}) também tem sido reconhecida como um alvo para a indução do pré-condicionamento químico. O ativador sintético dos canais BK_{Ca} , o NS1619, é capaz de induzir a despolarização da mitocôndria e aumentar a produção de EROs, promovendo o pré-condicionamento em culturas de neurônios corticais. No entanto, o mecanismo de neuroproteção parece ser independente de uma ativação direta destes canais de BK_{Ca} (revisado em Constantino et al., 2014).

Apoiado nestas evidências, o antagonista do receptor A_1 de adenosina, DPCPX (250 nM) (Dal-Cim et al., 2013) e o bloqueador seletivo do canal BK_{Ca} , Iberiotoxina (10 nM) (Levin e Godukhin, 2009), foram utilizados 15 min antes do pré-condicionamento com NMDA, para avaliar a participação do receptor A_1 e do canal de BK_{Ca} no efeito neuroprotetor do pré-condicionamento no modelo de toxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo. O pré-condicionamento com NMDA (50 μ M/10 μ M de glicina) por 2 horas previne a perda de viabilidade celular induzida pela toxicidade glutamatérgica. A incubação das fatias com o DPCPX bloqueou o efeito neuroprotetor mediado pelo pré-condicionamento. Enquanto que a Iberiotoxina bloqueou parcialmente o efeito protetor do pré-condicionamento nas fatias de hipocampo submetidas à toxicidade induzida por glutamato (Fig. 3A e 3B). Estes resultados confirmam que o receptor A_1 de adenosina participa dos mecanismos envolvidos na proteção desencadeada pelo pré-condicionamento com NMDA e sugerindo um possível envolvimento dos canais BK_{Ca} neste efeito.

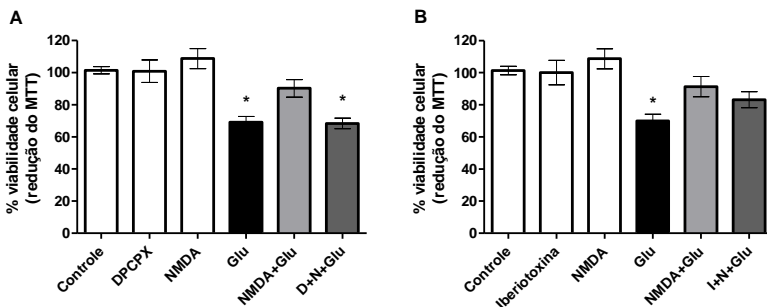


Figura 5: Estudo da participação do receptor A_1 de adenosina e do canal de K^+ no pré-condicionamento com NMDA frente à toxicidade induzida por glutamato. As fatias de hipocampo foram mantidas em KRB (controle) por 30min, em seguida incubadas com DPCPX (250 nM) (A) ou Iberiotoxina (10 nM) (B), 15min depois foi adicionado NMDA (50 μ M/10 μ M de glicina) por 2 horas. A toxicidade foi induzida por glutamato (10 mM) em KRB por 1 hora, após esse período o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) que foi incubado por 20 minutos a 37° C, e a viabilidade celular foi avaliada a 550 nm. O grupo controle foi considerado como tendo 100% de viabilidade celular. Os valores apresentam a média \pm EPM (n=6) (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey) * indica grupos significativamente diferentes do grupo controle (100%) e grupo NMDA+Glu; $P < 0,05$. I = Iberiotoxina; D = DPCPX; N = NMDA.

A D-serina é encontrada em níveis elevados no cérebro, e é considerada como um co-agonista endógeno para o sítio da glicina nos receptores NMDA (Shleper et al., 2005). Estudos relatam que a D-serina parece agir em NMDAR sinápticos contendo a subunidade GluN2A, enquanto que para a glicina foi demonstrado uma preferência por NMDAR extra-sinápticos contendo a subunidade GluN2B (Henneberger et al., 2010; Papouin et al., 2012).

Com intuito de investigar se o pré-condicionamento com NMDA em fatias hipocampais depende da composição das subunidades do NMDAR, foi utilizado a D-serina como co-agonista no protocolo de toxicidade induzida por glutamato. Os resultados demonstraram que o pré-condicionamento com NMDA (50 μ M/30 μ M de D-serina) por 2 horas preveniu parcialmente a perda de viabilidade celular desencadeada pela toxicidade induzida por glutamato.

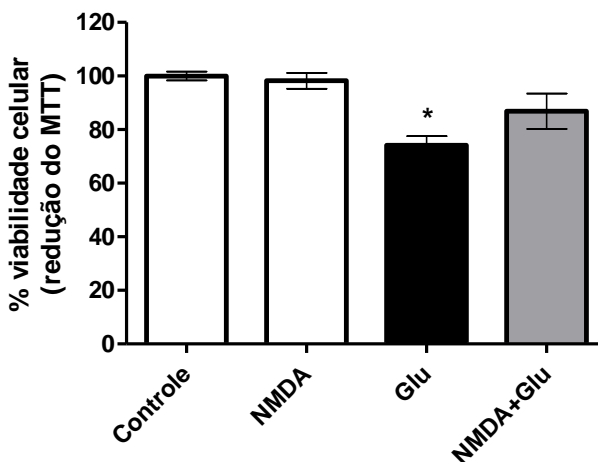


Figura 6: Avaliação *in vitro* do pré-condicionamento com NMDA frente à toxicidade induzida por glutamato, utilizando a D-serina como o co-agonista. As fatias de hipocampo foram mantidas em KRB (controle) por 30min, em seguida incubadas com NMDA (50 μ M/30 μ M de D-serina) por 2 horas. A toxicidade foi induzida por glutamato (10 mM) em KRB por 1 hora, após esse período o meio foi trocado por meio de cultura (DMEM + KRB) sem glutamato e mantido por 4 horas. A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método de redução do MTT (0,5 mg/mL) que foi incubado por 20 minutos a 37° C, e a viabilidade celular foi avaliada a 550 nm. O grupo controle foi considerado como tendo 100% de viabilidade celular. Os valores apresentam a média \pm EPM (n=6) (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey). * indica grupos significativamente diferentes do grupo controle (100%); P <0,05.

3 DISCUSSÃO

A estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos, conhecida como excitotoxicidade, tem sido implicada na morte de neurônios após TCE, convulsões e isquemia cerebral (Choi, 1992). O AQ, um metabólito do triptofano, pode causar excitotoxicidade e provocar lesões neuronais após administração intraestriatal e intrahipocampal em ratos (Schwarcz et al., 1983; Dobrachinski et al., 2012) e intracerebroventricular em camundongos (Boeck et al., 2004; Vandresen-Filho et al., 2007 ; de Araújo Herculano, 2011). Este estudo confirmou que o AQ pode causar excitotoxicidade e morte celular em cultura primária de neurônios hipocampais.

O pré-condicionamento com NMDA (50 μ M, 5 min) previne a morte neuronal induzida por AQ *in vitro*. Já foi demonstrado que uma leve estimulação dos receptores NMDA é capaz de proteger neurônios hipocampais contra a excitotoxicidade induzida por glutamato através da ativação de BDNF (Jiang et al., 2005). Outros estudos já demonstraram que a exposição a doses sub-tóxicas de NMDA por 24 horas, leva a uma tolerância celular após o dano induzido por doses tóxicas de glutamato em cultura de neurônios granulares cerebelares (Chuang et al., 1992; Boeck et al., 2005). Desta forma, no presente trabalho demonstra-se que o pré-condicionamento com NMDA também é eficaz na proteção contra a toxicidade induzida por AQ em cultura primária de neurônios hipocampais.

O tecido cerebral é bastante sensível à exposição de altas concentrações dos metabólitos do triptofano, que podem causar danos significativos no estriado, bem como no córtex, mas principalmente danos no hipocampo, devido à sua maior sensibilidade em relação a outras estruturas cerebrais (Lisy e Stastny, 2002; Ganzella et al., 2006). A excitotoxicidade induzida por AQ tem sido relacionada à sua capacidade de aumentar a geração de radicais livres e o estresse oxidativo (Santamaría e Ríos, 1993; Santamaría et al., 2003). Os dados apresentados neste trabalho confirmam que a exposição ao AQ (50 μ M, 30 min) foi capaz de aumentar a geração de EROs e o pré-condicionamento com NMDA não preveniu este efeito. Estudos têm demonstrado que o pré-condicionamento isquêmico induz a geração de EROs e também espécies reativas de nitrogênio, as quais ativam inúmeras vias de sinalização consideradas adaptativas. Desta forma, é possível que uma moderada geração de EROs esteja contribuindo para a indução do pré-condicionamento com NMDA. Além disto, o fato de

pré-condicionamento com NMDA não reduzir os níveis de EROS após a incubação com AQ não interfere com sua capacidade de proteção celular, já que a viabilidade celular dos neurônios é mantida.

Tendo em vista que as fatias de tecido apresentam vantagens em relação a outros modelos *in vitro* pelo fato de que mantêm a citoarquitetura do tecido de origem (Gähwiler et al., 1997), avaliou-se o efeito do pré-condicionamento com NMDA contra a toxicidade induzida por glutamato em fatias de hipocampo de camundongos em diferentes tempos. Os resultados demonstraram que dentre os tempos de tratamento com NMDA (5 min, 30 min, 1 hora, 2 horas) o único período capaz de gerar tolerância ao tecido foi o tratamento com NMDA por 2 horas. Este período de pré-condicionamento em cultura também já foi demonstrado por (Chuang et al., 1992). Fica evidente que o tempo requerido pelos tecidos ou células para que uma ativação moderada dos receptores NMDA leve a uma tolerância tecidual ou celular é diferente para cada situação. Considerando que o pré-condicionamento com NMDA em culturas de células é observado no período de 5 min, conforme relatado neste estudo e por Dai e colaboradores em 2010. Já em tecido este período necessário para o pré-condicionamento é de 2 horas, e *in vivo* está bem descrito na literatura que a janela de tempo necessária para o pré-condicionamento com NMDA é de 24 horas, sendo este efeito ainda observado até 48 horas (Boeck et al., 2004).

Com o intuito de investigar a participação dos receptores A_1 de adenosina e os canais BK_{Ca} no efeito do pré-condicionamento com NMDA em fatias de hipocampo de camundongos, utilizou-se o protocolo de incubação de NMDA (50 μ M) por 2 horas, na presença do antagonista do receptor A_1 de adenosina, DPCPX (250 nM), ou com o bloqueador seletivo do canal BK_{Ca} , Iberiotoxina (10 nM), utilizados 15 min antes do pré-condicionamento com NMDA. A participação dos receptores de adenosina, já tem sido descrita no pré-condicionamento isquêmico (Tauskela et al., 2003; Chauhan et al., 2012) bem como no pré-condicionamento com NMDA (Boeck et al., 2004). Em corroboração a estes dados, os resultados apresentados neste estudo confirmam que o receptor A_1 de adenosina participa dos mecanismos envolvidos na proteção desencadeada pelo pré-condicionamento com NMDA.

Além disso, os canais BK_{Ca} parecem estar envolvidos na neuroproteção induzida pelo pré-condicionamento com NMDA. Um estudo demonstrou que a utilização de bloqueadores de canais BK_{Ca} preveniu a hiperpolarização da membrana em células neuronais, mas foi completamente ineficaz sobre o pré-condicionamento (Busija et al.,

2008). E outro, sugere que o pré-condicionamento mediado pelo NMDA pode melhorar a recuperação tecidual após insultos agudos, mas pode ter efeitos deletérios sobre a plasticidade neuronal (Youssef et al., 2006; Moojen et al., 2012). Sabe-se que os canais BK_{Ca} desempenham um papel importante tanto na neuroplasticidade induzida por breves episódios de hipóxia, em neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo, quanto na hiperexcitabilidade pós hipóxia e no pré-condicionamento hipóxico rápido (Levin e Godukhin, 2009). Enquanto que os receptores A_1 de adenosina parecem não influenciar os efeitos do pré-condicionamento com NMDA sobre a plasticidade neuronal (Youssef et al., 2006). Em corroboração com o presente estudo, estes achados sugerem que os receptores de adenosina podem atuar por mecanismos diferentes dos canais BK_{Ca} no efeito do pré-condicionamento com NMDA, mas que ambos modulam a neuroproteção mediada pela ativação moderada dos receptores NMDA.

A D-serina tem sido aceita como um co-agonista endógeno para NMDAR sinápticos, envolvidos na modulação da transmissão sináptica e plasticidade (Van Horn et al., 2013). Recentemente, um estudo mostrou evidências de que a liberação de D-serina a partir de astrócitos do hipocampo seja provavelmente através um processo dependente de Ca^{2+} e que um astrócito individualmente pode contribuir para a plasticidade dependente dos NMDAR em sinapses neuronais circundantes (Henneberger et al., 2010).

Há evidências de que a ativação tônica dos receptores NMDA pode induzir tolerância à excitotoxicidade mediada pelos NMDAR através de um mecanismo relacionado com a diminuição da expressão das subunidades GluN2 em neurônios de estriado de ratos (Kambe et al., 2010). Estas subunidades dependem de co-agonistas obrigatórios, como por exemplo, a D-serina que parece agir em NMDAR sinápticos contendo a subunidade GluN2A, e a glicina que demonstrou-se ter uma preferência por NMDAR extra-sinápticos contendo a subunidade GluN2B (Henneberger et al., 2010; Papouin et al., 2012).

Baseado nestes achados investigou-se a participação da D-serina no efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA. Os resultados demonstraram que o pré-condicionamento com NMDA (50 μ M/30 μ M de D-serina) por 2 horas preveniu parcialmente a perda de viabilidade celular desencadeada pela toxicidade induzida por glutamato. Em contrapartida o pré-condicionamento com NMDA (50 μ M) utilizando a glicina (10 μ M) como co-agonista no mesmo período, protege em 100% contra a perda de viabilidade celular desencadeada pela toxicidade induzida por glutamato. Estes resultados

sugerem que a eficácia do pré-condicionamento com NMDA está mais relacionada à ativação moderada de receptores extrasinápticos contendo a subunidade GluN2B, que teriam a glicina como co-agonista preferencial.

Em contrapartida, um recente trabalho de revisão sugere que a ativação dos receptores NMDA sinápticos é neuroprotetora enquanto que a ativação dos receptores extrasinápticos leva à excitotoxicidade (Vizi et al., 2013). Por outro lado, um estudo de outro grupo demonstrou que o silenciamento de receptores NMDA sinápticos, induz neuroproteção, e a inibição dos receptores NMDA extrasinápticos não apresenta efeito neuroprotetor (Papouin et al., 2012). Desta forma fica evidente que ainda há controvérsias na literatura em relação a este tema. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel destas subunidades do receptor NMDA no efeito trófico ou excitotóxico.

Os resultados apresentados neste capítulo apontam para a participação de receptores NMDA seletivos, cuja composição das subunidades e localização celular deverão ainda ser elucidados em estudos futuros. Adicionalmente, apresentam ferramentas importantes para o estudo de mecanismos do pré-condicionamento com NMDA *in vitro*, tanto em cultura primária de neurônios hipocâmpais, quanto com fatias de hipocampo de camundongos.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que o pré-condicionamento com NMDA aumenta afinidade de união do A₁R, mas não altera a capacidade máxima de união de A₁R ou A_{2A}R no hipocampo de camundongos, além de não alterar os níveis proteicos de A₁R e A_{2A}R no hipocampo de camundongos.

Buscando avaliar a modulação da funcionalidade dos receptores A₁ e A_{2A} *in vivo*, verificou-se que o pré-condicionamento com NMDA induz antinocicepção, efeito que é abolido pela ativação de A₁R. Quando observado a modulação destes receptores em um comportamento mais dependente de hipocampo, observou-se que a ativação de A₁R ou A_{2A}R induz uma resposta generalizada de medo no teste de condicionamento do medo contextual e o pré-condicionamento com NMDA previne a resposta observada com a ativação do receptor A_{2A}. Além disso, o pré-condicionamento com NMDA aumenta a captação de glutamato em fatias de hipocampo de camundongos e a ativação de A₁R ou A_{2A}R impede esta resposta funcional mediada pelo NMDA.

Em relação às vias de sinalização celular envolvidas no efeito do pré-condicionamento com NMDA, os resultados do presente estudo confirmam que a via de sinalização da PI3K participa da neuroproteção mediada pelo pré-condicionamento contra as convulsões induzidas por AQ. E que o bloqueio desta via, pela wortmanina, não altera os níveis de fosforilação da Akt, GSK-3 β ERK1/2 e p38^{MAPK}, 24 h após o pré-condicionamento.

Em modelos *in vitro* de indução de pré-condicionamento com NMDA foi demonstrado que o pré-condicionamento previne a morte celular induzida pela exposição ao AQ, em cultura primária de neurônios hipocampais, apesar de induzir geração de EROs. Quando observado em fatias hipocampais, o pré-condicionamento é atingido apenas no período de 2 horas de incubação com NMDA. Neste protocolo, evidenciou-se a participação dos A₁R, o envolvimento parcial dos canais BK_{Ca} e a glicina como co-agonista preferencial nos mecanismos envolvidos na proteção desencadeada pelo pré-condicionamento.

6 PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados nesta Tese demonstraram os últimos avanços do nosso grupo de pesquisa na tentativa de elucidar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes a neuroproteção mediada pelo pré-condicionamento com NMDA, bem como a participação de vias de sinalização e outros sistemas de neurotransmissores ou neuromoduladores envolvidos. Porém, ainda é necessário mais estudos a respeito deste tema.

Desta forma, tem-se como perspectivas:

- 1) Avaliar o efeito do pré-condicionamento com NMDA na interação e possível oligomerização entre os receptores de adenosina A_1 e A_{2A} ;
- 2) Investigar a possível alteração dos níveis de fosforilação de proteínas *downstream* a via de sinalização da PI3K em um período de tempo mais curto após o pré-condicionamento com NMDA;
- 3) Avaliar o efeito da ativação dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} após o pré-condicionamento com NMDA sobre as convulsões induzidas por AQ;
- 4) Investigar o envolvimento de mecanismos celulares no pré-condicionamento com NMDA em fatias hipocâmpais como: as subunidades do receptor NMDA envolvidas e a sua localização.

ANEXO

Review Article

The Role of NMDA Receptors in the Development of Brain Resistance through Pre- and Postconditioning

Leandra Celso Constantino¹, Carla Inês Tasca¹, Carina Rodrigues Boeck²

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Campus Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

²Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Programa de Pós-graduação Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC, Criciúma, 88806-000, SC, Brazil.

[Received November 14, 2013; Revised January 30, 2014; Accepted February 9, 2014]

ABSTRACT: Brain tolerance or resistance can be achieved by interventions before and after injury through potential toxic agents used in low stimulus or dose. For brain diseases, the neuroprotection paradigm desires an attenuation of the resulting motor, cognitive, emotional, or memory deficits following the insult. Preconditioning is a well-established experimental and clinical translational strategy with great beneficial effects, but limited applications. NMDA receptors have been reported as protagonists in the adjacent cellular mechanisms contributing to the development of brain tolerance. Postconditioning has recently emerged as a new neuroprotective strategy, which has shown interesting results when applied immediately, i.e. several hours to days, after a stroke event. Investigations using chemical postconditioning are still incipient, but nevertheless represent an interesting and promising clinical strategy. In the present review pre- and postconditioning are discussed as neuroprotective paradigms and the focus of our attention lies on the participation of NMDA receptors and proteins in the processes related to neuroprotection.

Key words: N-methyl-D-aspartate receptors, preconditioning, postconditioning, neuroprotection

Brain Tolerance

Brain tolerance represents the transient resistance of the cerebral tissue to a lethal insult, which is established by preconditioning with a mild insult of short duration [1]. The term preconditioning was introduced by Janoff [2] and describes the tolerance response of an organism or tissue as the result of protective mechanisms towards potentially recurrent challenges. In fact, any stimulus able to generate damage to an organism or tissue can, when applied below the damage threshold, activate endogenous protective mechanisms, which may mitigate the impact of subsequent stimuli, which are above the damage threshold [3]. The general principle of preconditioning is thus a state of cellular protection, resulting from the exposure to

sublethal insults that confer a significant tolerance to subsequent lethal insults [3,4].

The concept of preconditioning was first used to describe the tolerance towards ischemia in myocardial cells [5]. Ischemic preconditioning in the brain was described for neuroprotection promoted by a brief ischemic episode with respect to subsequent lethal ischemic events in several regions of the brain, e.g. the CA1 and CA3 areas in the hippocampus [6]. Further studies showed that brain tolerance towards lethal injury may be achieved after chemical, electrical or anoxic stimuli [1, 7-9]. It is hardly surprising that preconditioning attracted substantial attention as a novel therapeutic approach for neuroprotection, which could potentially also provide an improved mechanistic understanding of brain tolerance.

*Correspondence should be addressed to: Carina Rodrigues Boeck, Ph.D., Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil. Email: cariboeck@hotmail.com.
ISSN: 2152-5250

Neuroprotection Paradigm

The process of neuroprotection disrupts or prevents a cascade, which occurs during the pathological processes of cell injury [10,11]. Excitotoxicity refers to toxicity caused by an increased concentration of glutamate during the synaptic transmission, which leads to neuronal death [12]. As excitotoxicity is associated with increased extracellular levels of glutamate, glutamate receptor antagonists can be used as neuroprotective agents [13].

Besides the excessive activation of glutamate receptors, it has been suggested that dysfunctions of the release and/or transport of glutamate occurs in acute and chronic forms of neuropathology, e.g. cerebral ischemia [14,15], traumatic brain injury (TBI) [16-18], as well as in neurodegenerative diseases such as Parkinson's [19,20] and Alzheimer's disease [21]. The involvement of excitotoxicity has also been discussed in the context of some neuropsychiatric diseases, e.g. bipolar disorder [22], schizophrenia [23], and depression [24].

Excessive stimulation of glutamate receptors can provoke various deleterious effects, such as a massively increased influx of Ca^{2+} or the release of nitric oxide (NO) [25]. It has been shown that the Ca^{2+} influx through the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is essential for glutamatergic excitotoxicity [26].

The hyperactivation of the Ca^{2+} -permeable ionotropic glutamate receptor (iGluR) is selectively activated by NMDA. Therefore, the NMDA receptor has been considered responsible for the cell death induced by excitotoxicity [27]. The influx of Ca^{2+} can moreover lead to an activation of toxic cascades, including the activation of catabolic enzymes such as phospholipases, proteases or endonucleases (e.g. caspases and calpains) [28]. Still, most of the Ca^{2+} ions are sequestered by the mitochondria, resulting in metabolic acidosis, inhibition of oxidative phosphorylation, opening of permeability transition pores, bioenergetic collapse, and the formation of free radicals from the impairment of the mitochondrial electron transport chain [29-31].

NMDA receptors are heteromeric complexes consisting of four subunits, each one comprising a different isoform: GluN1, GluN2 (GluN2A–GluN2D) and GluN3 (GluN3A and GluN3B). The different subunit composition of NMDA receptors shows distinct brain distribution, properties and regulation. Due to the composition of these heteromeric subunits, NMDA receptors show heterogeneous functionality and pharmacological characteristics [32]. NMDA receptors consist predominantly of the GluN1 form, which is, in combination with the presence of at least one GluN2 isoform, essential for the functionality of the receptor [33,34]. Extrasynaptic NMDA receptors containing GluN2B have been linked to excitotoxicity, whereas

synaptic NMDA receptors containing GluN2A have been associated with the trophic effects of these glutamate receptors, which are responsible for neuroprotection [35].

Several studies have demonstrated the involvement of NMDA receptors in the generation of endogenous neuroprotection in different models of preconditioning via the administration of various antagonists, such as MK-801 and ketamine [1, 7-9]. Despite the evidence resulting from different models, which implicate the activity of NMDA receptors in neuronal loss following ischemia, several clinical trials investigating distinct NMDA receptor antagonists failed to demonstrate positive effects against stroke events, presumably due to poor tolerance and/or efficacy [36]. Moreover, the complete inhibition of NMDA receptors has been shown to be ineffective in clinical trials [37]. On the other hand, the mild activation of NMDA receptors during preconditioning has been considered a more effective clinical strategy.

Preconditioning

Ischemic Preconditioning

For adults, cerebral ischemia is one of the most common causes of death and the main cause of disability. Its pathology is characterized by the interruption of cerebral blood flow, which results in a severe degeneration of neural cells and the loss of brain function [38,39]. In this context, the phenomenon of ischemic preconditioning, i.e. tissue exposure to a brief subtoxic insult, which results in an increased tolerance to a subsequent lethal ischemic event, has been extensively investigated as a neuroprotective strategy in experimental models of cerebral ischemia [3]. Studies have shown that preconditioning in ischemia [40], hypoxia [41] and hypothermia [42] models resulted in a protection against a subsequent ischemic injury in ischemia models using animals and neuron cultures [43,44].

One characteristic of ischemic injury, which is encountered especially in the hippocampus, is delayed cell death, which may be observed in the area affected by the infarct (ischemic core) resulting in a necrotic process [45-47]. Furthermore, apoptosis can occur after an ischemic event [48], triggered by a variety of noxious signals, including the production of reactive oxygen species (ROS), tumor necrosis factor (TNF), neurotrophins, deficiencies of growth factors, as well as the induction of p53 protein, and the release of cytochrome c by mitochondrial damage [49,50]. These events appear to occur in the penumbral region of the ischemic event, where cell integrity can still be preserved [51]. Parallel to the activation of a pathway of programmed cell death, the survival pathways activated in cells resistant to the ischemic injury should also be

considered. In these cells, survival may promote the induction of neurotrophic factors, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), insulin-like growth factor (IGF), and heat shock proteins (HSP) [52-54]. These survival proteins, activated by the noxious signals of ischemia, are potentially linked to the generation of tissue tolerance.

Possible neurotransmitter systems involved in ischemic preconditioning include adenosine A₁ and NMDA-subtype glutamate receptors [55]. In agreement with this notion, a recent study showed that pre-incubation of hippocampal slices with MK-801 (an NMDA receptor antagonist) or 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX, an A₁ receptor antagonist) reduced the tolerance to a second oxygen and glucose deprivation (OGD) event. These results suggest that the activation of NMDA or A₁ receptors induce ischemic preconditioning in mice [56].

Chemical Preconditioning

A large variety of chemical compounds has been proposed as chemical agents inducing preconditioning, resulting in cardio- and neuroprotective effects. Among them are anesthetics, ethanol, selective ligands to the (GABA)_Aergic (GABA = gamma amino butyric acid) system, opioid and glutamate receptors, and K⁺ channel activators.

Volatile anesthetics have also been used to afford cardio- and neuroprotection. Isoflurane and xenon for example induce early and late neuroprotection [57, 58]. Xenon can inhibit NMDA receptors, with little effect on GABA-A and non-NMDA glutamate receptors. The xenon-mediated preconditioning mechanism is connected to the activation of the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) signaling pathway, the preservation of mitochondria function, and the inhibition of Ca²⁺-induced mitochondrial transition permeability pore (MTPP) openings [59].

Agonists of the delta opioid receptors have also been reported to induce chemical preconditioning. Studies of ischemia and reperfusion suggest a potential correlation between opioid agonism and a reduction of the infarct size in models of regional ischemia, similar to that observed in the ischemic preconditioning [60]. Other preconditioning models used a moderate administration of ethanol, in order to protect neurons in cultures against β -amyloid-induced toxicity. Ethanol preconditioning is associated with elevated levels of HSP70, HSP27, and phospho-HSP27 in neuron cultures [61].

Moreover, many studies have emphasized the importance of the activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels (mK⁺_{ATP}) in the development of both acute and delayed ischemic tolerance [62]. Chemical activation of these mK⁺_{ATP} channels with e.g. diazoxide has been shown to be protective against

ischemia-induced cell death via a modulation of apoptotic proteins, a suppression of Bax translocation, and an inhibition of the release of cytochrome c [63]. In addition, a depolarization of the mitochondria caused by the activator of the mitochondrial mK⁺_{ATP} channels induced a protective effect by the attenuation of oxidative stress [64].

Large-conductance Ca²⁺ activated K⁺ (BK_{Ca}) channels, which are activated by depolarization and increase the cytosolic Ca²⁺ concentration, play a regulatory role in physiological processes such as the neuronal excitability [65], and have also been recognized as a target in order to induce chemical preconditioning. The synthetic BK_{Ca} activator NS1619 was shown to induce depolarization of the mitochondria and increase ROS production, promoting acute and delayed preconditioning in cortical neuron cultures. However, the mechanism of neuroprotection seems to be independent from a direct activation of these K⁺ channels [66, 67] and rely on caspase activation and the generation of ROS.

This review will focus on the activation of NMDA receptors as the main target for the induction of cellular tolerance by pre- or postconditioning.

NMDA preconditioning

Increased brain tolerance can be achieved by several induction mechanisms, e.g. by chemical, electrical or anoxic stimulus [3]. The role of NMDA receptors as a major factor in the induction of neuroprotection was clearly established by administering NMDA receptor antagonists such as MK-801 or ketamine [1, 7-9].

The dual function of NMDA, as a putative neuroprotective agent on one hand, and as source of excitotoxicity on the other, has been discussed with respect to its activity at synaptic and extrasynaptic sites [68]. As previously mentioned, the extrasynaptic NMDA receptors (GluN2B) play a crucial role in excitotoxicity, whereas the synaptic NMDA receptors (GluN2A) are responsible for neuroprotection [35].

NMDA-related neuroprotection has also been observed in neuronal cell cultures: subtoxic concentrations of NMDA are able to prevent neuronal death induced by glutamate, NMDA [69-71], or OGD [72, 73]. Neuroprotection resulting from stimulation of NMDA receptors relies on trophic effects, as the activation of the BDNF and neurotrophin signaling pathways protect neurons against glutamate excitotoxicity [74].

The intraperitoneal administration of a subtoxic dose of NMDA has also been evaluated with respect to a chemical preconditioning model against several lethal posterior stimuli *in vivo*. This NMDA administration *in vivo* offers neuroprotection for murine pyramidal

hippocampal neurons against kainate-induced toxicity [75] and ischemia [76]. Our group has previously reported that NMDA preconditioning prevents seizures generated by intracerebroventricular administration of quinolinic acid (QA) in mice, where QA acts as an NMDA receptor agonist at the GluN2B subunit. Moreover, animals were protected from the necrotic cell death observed in the hippocampus as a result of the toxicity of QA [77, 78]. It is also noteworthy that subtoxic NMDA doses do not induce a hallmark parameter of apoptosis, i.e. DNA fragmentation in oligonucleosomes (Vandresen-Filho et al., unpublished observations).

The neuroprotective effect of NMDA is widely recognized, although the neural mechanisms involved in NMDA preconditioning are not completely understood. NMDA-mediated neuroprotection depends on the activation of A₁ receptors, because NMDA preconditioning could not be achieved when NMDA or A₁ receptors were blocked with selective antagonists [77]. However, blocking NMDA receptors with MK-801 neutralized even the neuroprotective effects against behavioral seizures and hippocampal cellular damage, which were promoted by NMDA preconditioning. The inhibition of A₁ receptors with the selective antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) also eliminated any neuroprotection against seizures, but did not alter the hippocampal protection, which was promoted by NMDA preconditioning. It is possible that NMDA preconditioning may involve different signaling pathways: one depending on the activation of NMDA receptors, and another modulating the activation of adenosine receptors. We are currently investigating the role of adenosine receptors in the mechanism of NMDA preconditioning. Recent data from our laboratory show that NMDA preconditioning slightly increases the binding affinity of adenosine A₁ receptors in the hippocampus. Additionally, the activation of A₁ receptors after NMDA preconditioning precludes some of the behavioral and functional responses caused by the preconditioning (Constantino et al., unpublished data). An *in vitro* evaluation of the role of adenosine receptors in the mechanism of NMDA preconditioning in cerebellar granule neurons revealed that preconditioning facilitates a desensitization of the A_{2A} receptor response. The resulting cyclic AMP (cAMP) accumulation favors the activation of A₁ receptors [71] and contributes to NMDA-mediated preconditioning. The antagonistic effect of adenosine receptor activation is well understood and discussed elsewhere [79].

Our group has also investigated the intracellular signaling pathways involved in NMDA preconditioning. The inhibition of either protein kinase A (PKA) or PI3K pathway activation *in vivo* with selective inhibitors, completely eliminated any NMDA preconditioning

against seizures induced by QA [80]. Additionally, the suppression of mitogen-activated protein kinase/kinase (MAPK-MEK) partially decreased the NMDA-mediated neuroprotection. Treatment with protein kinase C (PKC) or calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) inhibitors did not alter the NMDA-generated protection. Thus, important signaling pathways involved in cellular protection such as PKA, PI3K, and MAPK are used in order to provide NMDA-induced neuroprotection. The activation sequence of these signaling pathways, i.e. which enzymes are upstream or downstream in this protection cascade, still remains to be investigated.

NMDA preconditioning is a time-dependent approach to protection. In this *in vivo* protocol, protection is established 24 hours after NMDA administration, maintained up to 48 hours, and no longer observable after 72 hours [77]. Considering the time-dependency of NMDA preconditioning, and in an attempt to better understand the molecular and cellular mechanisms related to the protection of the brain, a proteomic analysis of the hippocampus of mice subjected to NMDA preconditioning was performed [81]. A differential expression of proteins involved in translation, processing, maintenance of energy homeostasis, and modulation of glutamatergic transmission was observed. Within the time-frame of possible neuroprotection after NMDA administration (24 h), proteins involved in protein processing (e.g. aspartyl-tRNA synthetase, HSP70) as well as proteins related to cellular bioenergetics (e.g. creatine kinase) were up-regulated. Simultaneously, a down-regulation of the vacuolar-type proton ATPase catalytic subunit was observed. This is the same protein, which is expressed in synaptic vesicles and is responsible for affording energy for neurotransmitter accumulation. Considering the mechanisms related to preconditioning, it might be speculated that the resulting neuroprotection depends - as previously shown - on protein synthesis [82], as well as on protein processing, increased cellular bioenergetics, and decreased extracellular glutamate levels.

Regarding cellular bioenergetics, the modulation of oxidative stress resulting from an imbalance between ROS production and depletion may also be involved in the protective mechanism of preconditioning. The concept that preconditioning induced by ischemia could be related to an initial oxidative stress event was supported by the observation of an increased activity of antioxidant enzymes, e.g. catalase and superoxide dismutase (SOD) in the hippocampus and striatum. However, the increased enzyme activity was not necessarily accompanied by a complete inhibition of neurodegeneration [83]. By using antioxidants [84], it was possible to show that initial oxidative stress could be responsible for triggering preconditioning, whereas antioxidant enzymes did not

function as end-effectors in such neuroprotection. When we were evaluating antioxidant glutathione levels and the activity of glutathione related enzymes in mice models of NMDA preconditioning *in vivo*, we observed that the glutathione metabolism might not interfere directly with the tolerance level induced by the NMDA preconditioning [85].

Since Ca^{2+} ions permeate the NMDA receptors and increase neuronal excitability, it is very important to remember that the mild activation of NMDA receptors (probably mainly at the synaptic and not the extrasynaptic sites) does not reach the threshold level of toxicity. However, the mechanisms of neuroprotection or excitotoxicity caused by NMDA seem to differ only with regards to intensity and site of action. Accordingly, preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability levels [86]. Using an *in vivo* model of NMDA preconditioning [77], we assessed the electroencephalographic responses of the hippocampus and cerebral cortex of mice with respect to a subconvulsant dose of NMDA and a convulsant dose of QA [87]. With these experiments, we confirmed that 50% of mice were protected against QA-induced seizures after NMDA preconditioning [77,85]. Although the electroencephalographic results did not allow us to deduct a behavioral generalization of the seizures, they showed that NMDA preconditioning induced spike-wave discharges. Moreover, the same 50% of the mice, which were protected against behavioral seizures, exhibited an increased number of spike-wave discharges relative to the mice, which experienced seizures. Therefore, we concluded that we recorded an increased electroencephalographic excitability, when NMDA preconditioning afforded neuroprotection. In addition, we observed a negative correlation between the number of NMDA-induced spike-wave discharges and the severity of QA-induced seizures, which we evaluated with the help of the Vandresen-Filho scale of QA-induced seizures [87]. Accordingly, it can be argued that the increasing excitability induced by NMDA preconditioning results in an increased protection against behavioral seizures.

In this context, it is worth mentioning a recent study, which aimed to evaluate the energy metabolism in the brain of NMDA preconditioned mice. Besides the widely reviewed QA-induced seizures, NMDA preconditioning was also tested against an *in vivo* model, where mice were subjected to TBI. There, NMDA preconditioning prevented a gait distortion of mice suffering from a mild TBI and improved the affected locomotor parameters such as coordination, balance, and sensorimotor activity [88]. Mice subjected to NMDA preconditioning and subsequent TBI showed elevated activity levels for the mitochondria as the master organelle in preconditioning-

triggered neuroprotection. A significant increase in mitochondrial complex II was observed in preconditioned mice and in those subjected to trauma [31]. Again, a similar response for the triggering mechanism of NMDA-mediated neuroprotection and for the event-inducing neurotoxicity was observed.

It seems therefore feasible to conclude that the increased excitability, the induction of mild oxidative stress, the modulation of bioenergetics, the ionic homeostasis, and the modulation of glutamatergic transmission within non-excitotoxic levels comprise the underlying mechanisms for NMDA-mediated preconditioning.

Postconditioning

The clinical approach of preconditioning has obvious limitations, e.g. the inability to predict the onset of the injury. However, it has been indicated that cell mechanisms evoked by preconditioning can be reproduced after the injury. Postconditioning is a neuroprotective strategy that has been studied well for ischemic events, where the reperfusion period is controlled or reduced [89]. Pharmacological postconditioning, as a protection strategy against delayed neuronal death, has been intensively studied in recent years [90-93]. Protective cell pathways activated by postconditioning are - at least in part - identical to those activated in preconditioning. However, postconditioning has the advantage of being able to be applied after the insult. Several studies discuss basic approaches to postconditioning and show two main methods of how this can be achieved: i) rapid postconditioning, where the interruption of reperfusion occurs between minutes and hours after the injury [94,95], and ii) delayed postconditioning, where treatment is applied between hours and days after the incident [96,97]. Neuroprotective signaling pathways, triggered by different conditioning strategies in the brain share some common mediators, e.g. inflammatory cytokines, NO, and the activation of anti-apoptotic proteins. Recently, a growing number of reports have contributed to the understanding of the underlying mechanisms of conditioning effects. This knowledge will permit the development of translational strategies for the clinical practice in order to induce brain resistance.

Ischemic Postconditioning

Protection arising from postconditioning was initially studied within the context of myocardial damage induced by ischemia [98] and this knowledge has subsequently been transferred to the field of protection against damage following cerebral ischemia. Rapid ischemic postconditioning can be achieved in rats by three cycles

of brief obstruction (10 s) of the bilateral common carotid artery (CCA) followed by reperfusion (30 s), combined with a permanent occlusion of the distal middle cerebral artery (dMCA) [94]. It was observed that postconditioning reduced the size of the infarcts in the cerebral cortex two days after ischemia. This means that postconditioning could be induced by repetitive series of brief interruptions of the reperfusion applied after ischemia, conferring neuroprotection probably by an attenuation of the reperfusion-induced injury. Following these findings, several other groups have focused their attention on postconditioning as a viable strategy for the repair of damage resulting from stroke incidents in animal models and in clinical studies. Mechanical postconditioning, induced by four cycles of occlusion-reperfusion (1 min/1 min) via the inflation and deflation of a balloon, reduced the size of infarcts resulting from microvascular obstruction in human patients suffering from acute ST-elevation myocardial infarction (STEMI) [99]. More promising results were obtained for patients sustaining acute myocardial infarcts [100]. These results indicate that postconditioning could potentially be a safe method to induce neuroprotection, although preclinical and clinical trials remain necessary in order to confirm this hypothesis efficiently.

Brain injury following ischemia can be effectively attenuated in animal models when ischemic postconditioning is applied. Ischemic postconditioning ameliorates brain edema and decreases the blood-brain-barrier (BBB) leakage induced by focal cerebral ischemia (occlusion of the middle cerebral artery) [97]. Since glutamate and ROS play a critical role in ischemic damage, their depletion is pivotal for neuroprotection. In fact, ischemic postconditioning increases the levels of glutamine synthetase in the hippocampus of rats. These elevated glutamine synthetase levels contribute to neuroprotection by rapidly converting glutamate to glutamine in the glia, resulting in decreased extracellular glutamate levels after the injury [93]. Concomitantly, the contents of glutamate transporter 1 (GLT-1) were increased following ischemic postconditioning, contributing to the clearance of glutamate [101]. Moreover, the reduction of protein oxidation is accompanied by an increase in SOD (MnSOD and CuZnSOD) and catalase activity levels, which in turn decrease intracellular ROS concentrations [102]. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) plays an important role in ischemic pre- and postconditioning, since the generation of NO is crucial for the vascular functioning and homeostasis [103,104].

Matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) degrades extracellular matrix components contributing to BBB leakage [105] and the co-expression of MMP-9 and activated-caspase-3 following ischemic stroke events was

recently observed for humans. These proteins were co-expressed in the nuclear compartment of glial and neuronal cells at perilesional areas from post-mortem cortical tissue fragments in aged humans [106]. Ischemic postconditioning in rats was reported to reduce the expression of MMP-9, attenuating the focal cerebral ischemia-induced reduction of laminin and fibronectin expression, thus preserving the BBB integrity after injury [107].

Intracellular signaling activated by ischemic postconditioning includes the inhibition of MTPP openings due to an increased influx of Ca^{2+} (during ischemia and reperfusion), a depletion of ATP during ischemia, and the formation of ROS [108,109]. Mitochondrial integrity is closely related to the production of ATP, which in turn is increased by the opening of mK^{+}_{ATP} channels in the brain. This induces a depolarization potential on the mitochondrial membrane and thus promotes an increase of the electron transport chain activity [110]. Postconditioning administered to humans suffering from transient limb ischemia reduced the endothelial injury after ischemia via a mechanism involving mK^{+}_{ATP} channels [111]. In rat models, delayed remote limb ischemic postconditioning was reported to be neuroprotective when mK^{+}_{ATP} channels were activated [112]. Members of the Bcl-2 (anti- and proapoptotic) protein family are located in the outer mitochondria membranes and they control the activation of downstream caspase-9 and -3 enzymes, which represent critical intracellular factors in the mitochondria-mediated apoptosis pathway [113]. Ischemic postconditioning elevates the content of anti-apoptotic Bcl-2 proteins, decreases the content of proapoptotic Bax proteins and down-regulates the proteins caspase-3, -6 and -9 in the hippocampus of rats, which were subjected to early global brain ischemia mitigating cell death by apoptosis [114,115]. Another important neuroprotective pathway associated with ischemic postconditioning involves increased phosphorylation of PI3K/Akt [95] and its activity [116]. Besides PI3K/Akt, other proteins are involved: postconditioning inhibits the cleavage of δ PKC and enhances phospho- ϵ PKC levels. Moreover, it reduces phosphorylation of MAPK pathways including c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) [116,117]. Altogether, the signaling of mK^{+}_{ATP} channels, as well as Akt and ϵ PKC proteins contribute to the inhibition of the MTPP openings and provide a neuroprotective effect after ischemic postconditioning.

In cortical neuron cultures, postconditioning may be induced via hypoxia (0.1% O_2) 14 hours after OGD. Protective effects arise through angiogenesis proteins such as hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes, erythropoietin and adrenomedullin [118].

Hypobaric hypoxia also improves neuronal survival efficiently *in vivo*. However, only delayed postconditioning provides an emotional behavioral recovery (plus-maze task) and an associated increase in corticosterone hormonal levels [119].

In summary, studies reporting the beneficial effects of ischemic postconditioning indicate that postconditioning shares the cellular mechanisms activated when neuroprotection is achieved by preconditioning.

Chemical Postconditioning

After understanding neuroprotection induced by ischemic or hypoxic postconditioning, the next challenge for the clinical translation is the control of brain resistance after injury using pharmacological approaches. Until now, only few studies have investigated the effects of pharmacological postconditioning (with the exception of anesthetics) with respect to neuroprotective effects. The anesthetics isoflurane and sevoflurane can be used as postconditioning agents at early reperfusion stages of strokes *in vivo* or OGD *in vitro* [120,121]. Isoflurane postconditioning reduces brain infarcts and attenuates the neurological damage in rats after cerebral ischemia [120]. In rat models and in cortical neuron cultures, anesthetics provide protection via activation of the PI3K/Akt pathway [122,123] and increased expression of HIF-1 α and the inducible NOS (iNOS) gene [124,125]. Isoflurane postconditioning moreover involves an inhibition of CaMKII [126]. CaMKII is regulated by the complex Ca²⁺/calmodulin, which is highly expressed in the brain and further enriched at excitatory synapses and their postsynaptic densities (PSDs). CaMKII α can interact with a variety of proteins in the PSD, including proteins at the NMDA receptor complex. Interestingly, CaMKII α exhibits a higher binding affinity towards GluN2B relative to GluN1 [127]. McMurtey and Zuo [126] suggested isoflurane postconditioning-induced neuroprotection to involve an inhibition of NMDA receptors, i.e. the exact opposite mechanism shown for the preconditioning, in which the activation of NMDA receptors is crucial to neuroprotection [7].

In fact, the PSD protein complex is pivotal for basic glutamate transmission and the generation of synaptic potentiation. Postconditioning with the sedative propofol inhibits the internalization of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors, containing GluA2 subunits, which is indicative of an active participation of AMPA receptors during postconditioning-induced brain resistance. This was supported by the observed reduced infarct volume and improved spatial memory after ischemia/reperfusion injuries [128]. However, ischemic postconditioning also attenuates the binding of the PSD-95 protein to kainate

receptors containing GluK2 subunits [129]. The participation of iGluRs in neuroprotection induced by postconditioning is still unclear and requires further elucidation.

In contrast, glutamate receptor ligands potentially induce postconditioning against hippocampal ischemia. Low doses of the group I metabotropic glutamate receptor (mGlu1 and mGlu5) agonist 3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) were reported to protect organotypic hippocampal slices from OGD-induced cell damage in a mode dependent on Akt activation [90]. Also, low doses of kainate administered 48 hours after ischemia resulted in recovered spine density and prevented long-term potentiation (LTP) impairment [92].

Our group is currently investigating the potential neuroprotection in mice induced by a low dose of NMDA applied after mild TBI. Preliminary data show that NMDA postconditioning attenuates recognition memory deficits 48 hours after a mild TBI, and hippocampal cell death 96 hours after the trauma (Bavareseco et al., unpublished data). NMDA is more effective when administered 15 minutes after TBI, rather than 1 hour later, indicating that NMDA receptors can be a target of neuroprotection in accordance with the postconditioning paradigm.

From the Laboratory to the Clinical stage

The studies discussed in this review report *in vitro* and *in vivo* approaches, i.e. modifications in cell or organotypic cultures as well as in rodents. All of these investigated pre- and postconditioning as neuroprotective strategies. Moreover, most of the studies aim to unravel the mechanisms operative in these neuroprotective approaches, which can be considered either as preventive or as neuroprotective rescue strategies. From a translational point of view, preconditioning may find clinical applications in prophylactic situations, e.g. inducing neuroprotection in patients, who are undergoing brain surgery or suffer from subarachnoid hemorrhages and are exposed to an elevated risk of immediate brain injury. In this scenario, chemical preconditioning represents an excellent therapeutic approach compared to other forms of protection such as surgical preconditioning, since those procedures can potentially be harmful.

On the other hand, postconditioning is also an interesting therapeutic approach, since the window of application lies after the diagnosis of a stroke or TBI. There is consensus in the scientific literature that the intervention against cerebral damage can be better controlled using pharmacological strategies. Still, little is known about chemical postconditioning, its mechanisms and effects. The pursuit of basic research into chemical

preconditioning will therefore furnish a better comprehension of the underlying mechanisms and signaling pathways associated with the development of tissue tolerance, and ultimately provide the foundation for future clinical applications. Accordingly, there is hardly any doubt that further in-depth investigations are required in order to reveal the mechanisms by which pharmacological agents induce neuroprotection after cerebral injury, so that patients can be treated more efficiently in the future.

References

- [1] Rejdak R, Rejdak K, Sieklucka-Dziuba M, Stelmasiak Z, and Grieb P (2001). Brain tolerance and preconditioning. *Pol J Pharmacol*, 53: 73-79
- [2] Janoff A (1964). Alterations in Lysosomes (Intracellular Enzymes) during Shock; Effects of Preconditioning (Tolerance) and Protective Drugs. *Int Anesthesiol Clin*, 2: 251-269
- [3] Dimagl U, Simon RP, and Hallenbeck JM (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci*, 26: 248-254
- [4] Mergenthaler P, Dimagl U, and Meisel A (2004). Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*, 19: 151-167
- [5] Murry CE, Jennings RB, and Reimer KA (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74: 1124-1136
- [6] Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Tagaya M, Ohtsuki T, Hata R, Ueda H, Handa N, Kimura K, and Kamada T (1991). 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res*, 561: 203-211
- [7] Bond A, Lodge D, Hicks CA, Ward MA, and O'Neill MJ (1999). NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *Eur J Pharmacol*, 380, 91-99
- [8] Schaller B and Graf R (2002). Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinical important entity of stroke prevention? *J Neurol*, 249: 1503-1511
- [9] Samoilo V, Lazarevich EV, Semenov DG, Mokrushin AA, Tyul'kova EL, Romanovskii DY, Milyakova EA, and Dudkin KN (2003). The adaptive effects of hypoxic preconditioning of brain neurons. *Neurosci Behav Physiol*, 33: 1-11
- [10] McIntosh TK (1993). Novel pharmacologic therapies in the treatment of experimental traumatic brain injury: a review. *J Neurotrauma*, 10: 215-261
- [11] Gagliardi RJ (2000). Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. *Arq Neuropsiquiatr*, 58, 583-588
- [12] Meldrum BS (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, 130: 1007S-1015S
- [13] Dempsey RJ, Baskaya MK, and Dogan A (2000). Attenuation of brain edema, blood-brain barrier breakdown, and injury volume by ifenprodil, a polyamine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, after experimental traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery*, 47: 399-404
- [14] Jorgensen MB and Diemer NH (1982). Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: possible role of transmitter glutamate. *Acta Neurol Scand* 66, 536-546
- [15] Tymianski M (2011). Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. *Nat Neurosci*, 14: 1369-1373
- [16] Baker AJ, Moulton RJ, MacMillan VH, and Shedden PM (1993). Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in humans. *J Neurosurg*, 79: 369-372
- [17] Faden AI, Demediuk P, Panter SS, and Vink R (1989). The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*, 244: 798-800
- [18] Koura SS, Doppenberg EM, Marmarou A, Choi S, Young HF, and Bullock R (1998). Relationship between excitatory amino acid release and outcome after severe human head injury. *Acta Neurochir Suppl*, 71, 244-246
- [19] Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, and Rios C (2011). Medical management of Parkinson's disease: focus on neuroprotection. *Curr Neuropharmacol*, 9: 350-359
- [20] Chen L, Liu J, Ali U, Gui ZH, Hou C, Fan LL, Wang Y, and Wang T (2011). Chronic, systemic treatment with a metabotropic glutamate receptor 5 antagonist produces anxiolytic-like effects and reverses abnormal firing activity of projection neurons in the basolateral nucleus of the amygdala in rats with bilateral 6-OHDA lesions. *Brain Res Bull*, 84: 215-223
- [21] Cassano T, Serviddio G, Gaetani S, Romano A, Dipasquale P, Cianci S, Bellanti F, Laconca L, Romano AD, Padalino I, LaFerla FM, Nicoletti F, Cuomo V, and Vendemiale G (2012). Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 33: 1121 e1121-1112
- [22] Ginsberg SD, Hemby SE, and Smiley JF (2012). Expression profiling in neuropsychiatric disorders: emphasis on glutamate receptors in bipolar disorder. *Pharmacol Biochem Behav*, 100: 705-711
- [23] Moghaddam B and Javitt D (2012). From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology*, 37:4-15
- [24] Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, and Manji HK (2008). Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 7: 426-437
- [25] Lau A and Tymianski M (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*, 460: 525-542
- [26] Choi DW (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett*, 58: 293-297

- [27] Stone TW and Addae JI (2002). The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. *Eur J Pharmacol*, 447: 285-296
- [28] Hynd MR, Scott HL, and Dodd PR (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 45: 583-595
- [29] Nichols RA, Dengler AF, Nakagawa EM, Bashkin M, Paul BT, Wu J, and Khan GM (2007). A constitutive, transient receptor potential-like Ca²⁺ influx pathway in presynaptic nerve endings independent of voltage-gated Ca²⁺ channels and Na⁺/Ca²⁺ exchange. *J Biol Chem*, 282: 36102-36111
- [30] Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, and Choi AM (2007). Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 9: 49-89
- [31] Boeck CR, Carbonera LS, Milioli ME, Constantino LC, Garcez ML, Rezin GT, Scaini G, and Streck EL (2013). Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities following trauma brain injury in brain of mice preconditioned with N-methyl-D-aspartate. *Mol Cell Biochem*, in press
- [32] Gonda X (2012). Basic pharmacology of NMDA receptors. *Curr Pharm Des*, 18: 1558-1567
- [33] Hardingham GE (2009). Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans*, 37: 1147-1160
- [34] Cull-Candy S, Brickley S, and Farrant M (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 11: 327-335
- [35] Vizi ES, Kisfalvi M, and Lorincz T (2013). Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. *Brain Res Bull*, 93: 32-38
- [36] Muir KW (2006). Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol*, 6: 53-60
- [37] Ikonomidou C and Turski L (2002). Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol*, 1: 383-386
- [38] Liu XQ, Sheng R, and Qin ZH (2009). The neuroprotective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30: 1071-1080
- [39] Mattson MP and Magnus T (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci*, 7: 278-294
- [40] Chen J and Simon R (1997). Ischemic tolerance in the brain. *Neurology*, 48: 306-311
- [41] Pugliese AM, Latini S, Corradetti R, and Pedata F (2003). Brief, repeated, oxygen-glucose deprivation episodes protect neurotransmission from a longer ischemic episode in the *in vitro* hippocampus: role of adenosine receptors. *Br J Pharmacol*, 140: 305-314
- [42] Nishio S, Yumoki M, Chen ZF, Anzivino MJ, and Lee KS (2000). Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning. *J Neurosurg*, 93: 845-851
- [43] Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, and Jennings RB (1990). Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res*, 66: 913-931
- [44] Tauskela JS, Aylsworth A, Hewitt M, Brunette E, and Mealing GA (2012). Preconditioning induces tolerance by suppressing glutamate release in neuron culture ischemia models. *J Neurochem*, 122: 470-481
- [45] Garcia JH, Liu KF, and Ho KL (1995). Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke*, 26: 636-642
- [46] Rathmell JC and Thompson CB (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 17: 781-828
- [47] Wong CH, Bozinovski S, Hertzog PJ, Hickey MJ, and Crack PJ (2008). Absence of glutathione peroxidase-1 exacerbates cerebral ischemia-reperfusion injury by reducing post-ischemic microvascular perfusion. *J Neurochem*, 107: 241-252
- [48] Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, and Raghurir R (2008). Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol*, 37: 7-38
- [49] Love S (2003). Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry*, 27: 267-282
- [50] Zhang F, Yin W, and Chen J (2004). Apoptosis in cerebral ischemia: executional and regulatory signaling mechanisms. *Neurological Research*, 26: 835-845
- [51] Sharp FR, Lu A, Tang Y, and Millhorn DE (2000). Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20: 1011-1032
- [52] Andersen MB and Sams-Dodd F (1998). Impairment of working memory in the T-maze after transient global cerebral ischemia in the Mongolian gerbil. *Behav Brain Res*, 91: 15-22
- [53] Sastry PS and Rao KS (2000). Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem*, 74: 1-20
- [54] Woodgate A, Walton M, MacGibbon GA, and Dragnunow M (1999). Inducible transcription factor expression in a cell culture model of apoptosis. *Brain Res Mol Brain Res*, 66: 211-216
- [55] Perez-Pinzon MA (2007). Mechanisms of neuroprotection during ischemic preconditioning: lessons from anoxic tolerance. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 147: 291-299
- [56] Chauhan NK, Young AM, Gibson CL, and Davidson C (2013). Inhibition of pre-ischemic conditioning in the mouse caudate brain slice by NMDA- or adenosine A1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, 698: 322-329
- [57] Li Q, Lian C, Zhou R, Li T, Xiang X, and Liu B (2013). Pretreatment with xenon protected immature rabbit heart from ischaemia/reperfusion injury by opening of the mitoKATP channel. *Heart Lung Circ*, 22: 276-283
- [58] Liu W, Liu Y, Chen H, Liu K, Tao H, and Sun X (2013). Xenon preconditioning: molecular mechanisms and biological effects. *Med Gas Res*, 3: 3
- [59] Mio Y, Shim YH, Richards E, Bosnjak ZJ, Pagel PS, and Bienengraeber M (2009). Xenon preconditioning: the role of prosurvival signaling, mitochondrial permeability transition and bioenergetics in rats. *Anesth Analg*, 108: 858-866

- [60] Dragasis S, Bassiakou E, Iacovidou N, Papadimitriou L, Andreas Steen P, Gulati A, and Xanthis T (2013). The role of opioid receptor agonists in ischemic preconditioning. *Eur J Pharmacol*, in press
- [61] Collins MA, Neafsey EJ, Wang K, Achille NJ, Mitchell RM, and Sivaswamy S (2010). Moderate ethanol preconditioning of rat brain cultures engenders neuroprotection against dementia-inducing neuroinflammatory proteins: possible signaling mechanisms. *Mol Neurobiol*, 41: 420-425
- [62] Busija DW, Lacza Z, Rajapakse N, Shimizu K, Kis B, Bari F, Domoki F, and Horiguchi T (2004). Targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels--a novel approach to neuroprotection. *Brain Res Brain Res Rev*, 46: 282-294
- [63] Liu D, Lu C, Wan R, Auyeung WW, and Mattson MP (2002). Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22: 431-443
- [64] Nagy K, Kis B, Rajapakse NC, Bari F, and Busija DW (2004). Diazoxide preconditioning protects against neuronal cell death by attenuation of oxidative stress upon glutamate stimulation. *J Neurosci Res*, 76: 697-704
- [65] Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, and O'Rourke ST (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther*, 110: 103-116
- [66] Gaspar T, Katakam P, Snipes JA, Kis B, Domoki F, Bari F, and Busija DW (2008). Delayed neuronal preconditioning by NS1619 is independent of calcium activated potassium channels. *J Neurochem*, 105: 1115-1128
- [67] Gaspar T, Domoki F, Lenti L, Katakam PV, Snipes JA, Bari F, and Busija DW (2009). Immediate neuronal preconditioning by NS1619. *Brain Res*, 1285: 196-207
- [68] Vanhoutte P and Bading H (2003). Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Curr Opin Neurobiol*, 13: 366-371
- [69] Chuang DM, Gao XM, and Paul SM (1992). N-methyl-D-aspartate exposure blocks glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol*, 42: 210-216
- [70] Dickie BG, Holmes C, and Greenfield SA (1996). Neurotoxic and neurotrophic effects of chronic N-methyl-D-aspartate exposure upon mesencephalic dopaminergic neurons in organotypic culture. *Neuroscience*, 72: 731-741
- [71] Boeck CR, Kroth EH, Bronzatto MJ, and Vendite D (2005). Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. *Neuropharmacology*, 49: 17-24
- [72] Pringle AK, Thomas SJ, Signorelli F, and Iannotti F (1999). Ischaemic pre-conditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). *Brain Res*, 845: 152-164
- [73] Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares A, Cimarosti H, Netto CA, and Salbego CG (2003). Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience*, 118: 379-386
- [74] Jiang X, Tian F, Mearow K, Okagaki P, Lipsky RH, and Marini AM (2005). The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem*, 94: 713-722
- [75] Ogita K, Okuda H, Yamamoto Y, Nishiyama N, and Yoneda Y (2003). In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *J Neurochem*, 85: 1336-1346
- [76] Miao B, Yin XH, Pei DS, Zhang QG, and Zhang GY (2005). Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation. *J Biol Chem*, 280: 21693-21699
- [77] Boeck CR, Ganzella M, Lottermann A, and Vendite D (2004). NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia*, 45: 745-750
- [78] Piermarini TC, Vandresen-Filho S, de Araujo Herculano B, Martins WC, Dal'agnolo D, Stroeh E, Carqueja CL, Boeck CR, and Tasca CI (2009). Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res*, 16: 106-115
- [79] Ciruela F, Fernandez-Duenas V, Llorente J, Borroto-Escuela D, Cuffi ML, Carbonell L, Sanchez S, Agnati LF, Fuxe K, and Tasca CI (2012). G protein-coupled receptor oligomerization and brain integration: focus on adenosinergic transmission. *Brain Res*, 1476: 86-95
- [80] de Araujo Herculano B, Vandresen-Filho S, Martins WC, Boeck CR, and Tasca CI (2011). NMDA preconditioning protects against quinolinic acid-induced seizures via PKA, PI3K and MAPK/ERK signaling pathways. *Behav Brain Res*, 219: 92-97
- [81] do Amaral e Silva Müller G, Vandresen-Filho S, Tavares CP, Menegatti AC, Terenzi H, Tasca CI, and Severino PC (2013). Proteomic analysis of the mice hippocampus after preconditioning induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA). *J Mol Neurosci*, 50: 154-164
- [82] Marini AM and Paul SM (1992). N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection in cerebellar granule cells requires new RNA and protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 6555-6559
- [83] Danielisova V, Nemethova M, Gottlieb M, and Burda J (2005). Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem Res*, 30: 559-565
- [84] Puisieux F, Deplanque D, Bulckaen H, Maboudou P, Gele P, Lhermitte M, Lebuffe G, and Bordet R (2004). Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide

- dismutase and glutathione peroxidase. *Brain Res*, 1027: 30-37
- [85] Vandresen-Filho S, de Araujo Herculano B, Franco JL, Boeck CR, Dafre AL, and Tasca CI (2007). Evaluation of glutathione metabolism in NMDA preconditioning against quinolinic acid-induced seizures in mice cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res*, 1184: 38-45
- [86] Soriano FX, Papadia S, Hofmann F, Hardingham NR, Bading H, and Hardingham GE (2006). Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *J Neurosci*, 26: 4509-4518
- [87] Vandresen-Filho S, Hoeller AA, Herculano BA, Duzzioni M, Duarte FS, Piermartiri TC, Boeck CC, de Lima TC, Marino-Neto J, and Tasca CI (2012). NMDA Preconditioning Attenuates Cortical and Hippocampal Seizures Induced by Intracerebroventricular Quinolinic Acid Infusion. *Neurotox Res*, 24: 55-62
- [88] Costa T, Constantino LC, Mendonca BP, Pereira JG, Herculano B, Tasca CI, and Boeck CR (2010). N-methyl-D-aspartate preconditioning improves short-term motor deficits outcome after mild traumatic brain injury in mice. *J Neurosci Res*, 88: 1329-1337
- [89] Tsang A, Hausenloy DJ, and Yellon DM (2005). Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289: H2-7
- [90] Scartabelli T, Gerace E, Landucci E, Moroni F, and Pellegrini-Giampietro DE (2008). Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K-Akt signaling pathway: a novel postconditioning strategy? *Neuropharmacology*, 55: 509-516
- [91] Danielisova V, Gottlieb M, Nemethova M, Kravcukova P, Domorakova I, Mechirova E, and Burda J (2009). Bradykinin postconditioning protects pyramidal CA1 neurons against delayed neuronal death in rat hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*, 29: 871-878
- [92] Nagy D, Kocsis K, Fuzik J, Marosi M, Kis Z, Teichberg VI, Toldi J, and Farkas T (2011). Kainate postconditioning restores LTP in ischemic hippocampal CA1: onset-dependent second pathophysiological stress. *Neuropharmacology*, 61, 1026-1032
- [93] Zhang W, Miao Y, Zhou S, Jiang J, Luo Q, and Qiu Y (2011). Neuroprotective effects of ischemic postconditioning on global brain ischemia in rats through upregulation of hippocampal glutamine synthetase. *J Clin Neurosci*, 1: 685-689
- [94] Zhao H, Sapolsky RM, and Steinberg GK (2006). Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26: 1114-1121
- [95] Pignataro G, Meller R, Inoue K, Ordóñez AN, Ashley MD, Xiong Z, Gala R, and Simon RP (2008). In vivo and in vitro characterization of a novel neuroprotective strategy for stroke: ischemic postconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28, 232-241
- [96] Burda J, Danielisova V, Nemethova M, Gottlieb M, Matiasova M, Domorakova I, Mechirova E, Ferikova M, Salinas M, and Burda R (2006). Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain. *Cell Mol Neurobiol*, 26: 1141-1151
- [97] Ren C, Gao X, Niu G, Yan Z, Chen X, and Zhao H (2008). Delayed postconditioning protects against focal ischemic brain injury in rats. *PLoS One*, 3: e3851
- [98] Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, and Hong SK (1996). Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. *Am Heart J*, 132: 78-83
- [99] Mewton N, Thibault H, Roubille F, Lairez O, Rioufol G, Sportouch C, Sanchez I, Bergerot C, Cung TT, Finet G, Angoulvant D, Revel D, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Piot C, Sahraroui I, Croisille P, and Ovize M (2013). Postconditioning attenuates no-reflow in STEMI patients. *Basic Res Cardiol* 108: 383
- [100] Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M. (2005). Postconditioning the human heart. *Circulation*, 114: 2143-2148
- [101] Zhang W, Miao Y, Zhou S, Wang B, Luo Q, and Qiu Y (2010). Involvement of Glutamate Transporter-1 in Neuroprotection against Global Brain Ischemia-Reperfusion Injury Induced by Postconditioning in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 4407-4416
- [102] Nemethova M, Danielisova V, Gottlieb M, Kravcukova P, and Burda J (2010). Ischemic postconditioning in the rat hippocampus: mapping of proteins involved in reversal of delayed neuronal death. *Arch Ital Biol*, 148: 23-32
- [103] Gidday JM, Shah AR, Maceren RG, Wang Q, Pelligrino DA, Holtzman DM, and Park TS (1999). Nitric oxide mediates cerebral ischemic tolerance in a neonatal rat model of hypoxic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19: 331-340
- [104] Peng B, Guo QL, He JZ, Ye Z, Yuan YJ, Wang N, and Zhou J (2012). Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway. *Brain Res*, 1445: 92-102
- [105] Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, Fernandez-Cadenas I, Ribo M, Molina CA, Lo EH, and Montaner J (2006). Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*, 37: 1399-1406
- [106] Pirici D, Pirici I, Mogoanta L, Margaritescu O, Tudorica V, Margaritescu C, Ion DA, Simionescu C, and Cocconi M (2012). Matrix metalloproteinase-9 expression in the nuclear compartment of neurons and glial cells in aging and stroke. *Neuropathology* 32, 492-504
- [107] Liu XR, Luo M, Yan F, Zhang CC, Li SJ, Zhao HP, Ji XM, and Luo YM (2012). Ischemic postconditioning diminishes matrix metalloproteinase 9 expression and attenuates loss of the extracellular matrix proteins in rats following middle cerebral artery occlusion and reperfusion. *CNS Neurosci Ther*, 18: 855-863

- [108] Sun J, Luan Q, Dong H, Song W, Xie K, Hou L, and Xiong L (2012). Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening contributes to the neuroprotective effects of ischemic postconditioning in rats. *Brain Res*, 1436: 101-110
- [109] Hausenloy DJ, Duchon MR, and Yellon DM (2003). Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 60: 617-625
- [110] Andrukhiv A, Costa AD, West IC, and Garlid KD (2006). Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291: H2067-2074
- [111] Loukogeorgakis SP, Williams R, Pangiotidou AT, Kolvkar SK, Donald A, Cole TJ, Yellon DM, Deanfield JE, and MacAllister RJ (2007). Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation*, 116: 1386-1395
- [112] Sun J, Tong L, Luan Q, Deng J, Li Y, Li Z, Dong H, and Xiong L (2012). Protective effect of delayed remote limb ischemic postconditioning: role of mitochondrial K(ATP) channels in a rat model of focal cerebral ischemic reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32: 851-859
- [113] Danial NN and Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116: 205-219
- [114] Ding ZM, Wu B, Zhang WQ, Lu XJ, Lin YC, Geng YJ, and Miao YF (2012). Neuroprotective Effects of Ischemic Preconditioning and Postconditioning on Global Brain Ischemia in Rats through the Same Effect on Inhibition of Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 6089-6101
- [115] Zhang W, Wang B, Zhou S, and Qiu Y (2012). The effect of ischemic post-conditioning on hippocampal cell apoptosis following global brain ischemia in rats. *J Clin Neurosci* 19, 570-573
- [116] Gao X, Zhang H, Takahashi T, Hsieh J, Liao J, Steinberg GK, and Zhao H (2008). The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. *J Neurochem* 105: 943-955
- [117] Zhan L, Li D, Liang D, Wu B, Zhu P, Wang Y, Sun W, and Xu E (2012). Activation of Akt/FoxO and inactivation of MEK/ERK pathways contribute to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by delayed hypoxic postconditioning in adult rats. *Neuropharmacology* 63, 873-882
- [118] Leconte C, Tixier E, Freret T, Toutain J, Saulnier R, Boulouard M, Roussel S, Schumann-Bard P, and Bernaudin M (2009). Delayed hypoxic postconditioning protects against cerebral ischemia in the mouse. *Stroke*, 40: 3349-3355
- [119] Rybnikova E, Vorobyev M, Pivina S, and Samoilov M (2012). Postconditioning by mild hypoxic exposures reduces rat brain injury caused by severe hypoxia. *Neurosci Lett*, 513: 100-105
- [120] Lee JJ, Li L, Jung HH, and Zuo Z (2008). Postconditioning with isoflurane reduced ischemia-induced brain injury in rats. *Anesthesiology*, 108: 1055-1062
- [121] Adamczyk S, Robin E, Simerabet M, Kipnis E, Tavemier B, Vallet B, Bordet R, and Lebuffe G (2010). Sevoflurane pre- and post-conditioning protect the brain via the mitochondrial K ATP channel. *Br J Anaesth*, 104: 191-200
- [122] Wang JK, Yu LN, Zhang FJ, Yang MJ, Yu J, Yan M, and Chen G (2010). Postconditioning with sevoflurane protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury via PI3K/Akt pathway. *Brain Res*, 1357: 142-151
- [123] Li L and Zuo Z (2011). Isoflurane postconditioning induces neuroprotection via Akt activation and attenuation of increased mitochondrial membrane permeability. *Neuroscience*, 199: 44-50
- [124] Fang Li Q, Xu H, Sun Y, Hu R, and Jiang H (2012). Induction of inducible nitric oxide synthase by isoflurane post-conditioning via hypoxia inducible factor-1alpha during tolerance against ischemic neuronal injury. *Brain Res*, 1451: 1-9
- [125] Ye Z, Guo Q, Xia P, Wang N, Wang E, and Yuan Y (2012). Sevoflurane postconditioning involves an up-regulation of HIF-1alpha and HO-1 expression via PI3K/Akt pathway in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 1463: 63-74
- [126] McMurtrey RJ and Zuo Z (2010). Isoflurane preconditioning and postconditioning in rat hippocampal neurons. *Brain Res*, 1358: 184-190
- [127] Leonard AS, Bayer KU, Merrill MA, Lim IA, Shea MA, Schulman H, and Hell JW (2002). Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II docking to N-methyl-D-aspartate receptors by calcium/calmodulin and alpha-actinin. *J Biol Chem*, 277: 48441-48448
- [128] Wang H, Luo M, Li C, and Wang G (2011). Propofol post-conditioning induced long-term neuroprotection and reduced internalization of AMPAR GluR2 subunit in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Neurochem*, 119: 210-219
- [129] Liu J, Xu Q, Wang H, Wang R, and Hou XY (2013). Neuroprotection of ischemic postconditioning by downregulating the postsynaptic signaling mediated by kainate receptors. *Stroke*, 44: 2031-2035

REFERÊNCIAS

AARTS, M.; LIU, Y.; LIU, L.; BESSHOH, S.; ARUNDINE, M.; GURD, J.W.; WANG, Y.T.; SALTER, M.W.; TYMIANSKI, M. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. **Science**, v.25, p.846-850, 2002.

BAKER, A.J.; MOULTON, R.J.; MACMILLAN, V.H.; SHEDDEN, P.M. Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in humans. **J Neurosurg**, v.79, p.369-372, 1993.

BHUIYAN, M.I.H.; JUNG, S.Y.; KIM H.J.; LEE, Y.S.; JIN, C. Major Role of the PI3K/Akt Pathway in Ischemic Tolerance Induced by Sublethal Oxygen-Glucose Deprivation in Cortical Neurons *In Vitro*. **Arch Pharm Res**, v. 34, n. 6, p. 1023-1034, 2011.

BLUM, D.; HOUREZ, R.; GALAS, M.C.; POPOLI, P.; SCHIFFMANN, S.N. Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics. **Lancet Neurol**, v.2,p.366-374, 2003.

BOISON, D. Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.27, p.652-658, 2006.

BOISON, D.; STEWARD, K.A. Therapeutic epilepsy research: from pharmacological ationale to focal adenosine augmentation. **Biochem Pharmacol**, v. 78, p.1428-1437, 2009.

BOECK, C.R.; BRONZATTO, M.J.; SOUZA, D.G.; SARKIS, J.J., VENDITE, D. The modulation of ecto-nucleotidase activities by glutamate in cultured cerebellar granule cells. **Neuroreport**, v. 11, n.4, p. 709-712, 2000.

BOECK, C.R.; GANZELLA, M.; LOTTERMANN, A.; VENDITE, D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. **Epilepsia**, n. 45, p. 745-750, 2004.

BOECK, C. GANZELLA, M.; DECKER, H.; VENDITE, D.; LEAL, R.B.; TASCA, C.I. NMDA preconditioning protects mice against

necrotic cellular death induced by quinolinic acid. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, p. 17-24, 2005.

BOECK, C.R.; CARBONERA, L.S.; MILIOLI, M.E.; CONSTANTINO, L.C.; GARCEZ, M.L.; REZIN, G.T.; SCAINI, G.; STRECK, E.L. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities following trauma brain injury in brain of mice preconditioned with N-methyl-D-aspartate. **Mol Cell Biochem**, v. 384, p.129-137, 2013.

BOLL, M.C.; ALCARAZ-ZUBELDIA, M.; RIOS, C. Medical management of Parkinson's disease: focus on neuroprotection. **Curr Neuropharmacol**, v.9, p.350-359, 2011.

BOND, A.; LODGE, D.; HICKS, C.A.; WARD, M.A.; O'NEILL, M.J. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. **European Journal Pharmacology**, v. 10, p. 91-99, 1999.

BRENNAN-MINNELLA, A.M.; SHEN, Y.; EL-BENNA, J.; SWANSON, R.A. Phosphoinositide 3-kinase couples NMDA receptors to superoxide release in excitotoxic neuronal death. **Cell Death Dis**, doi: 10.1038/cddis.111. 2013

BRIDGES, R.; LUTGEN, V.; LOBNER, D.; BAKER, D.A. Thinking Outside the Cleft to Understand Synaptic Activity: Contribution of the Cystine-Glutamate Antiporter (System xc⁻) to Normal and Pathological Glutamatergic Signaling. **Pharmacol Rev**, v. 64, p.780-802, 2012.

BRUNO, A.N.; BONAN, C.D.; WOFCHUK, S.T.; SARKIS, J.J.; BATTASTINI, A.M. ATP diphosphohydrolase (NTPDase 1) in rat hippocampal slices and effect of glutamate on the enzyme activity in different phases of development. **Life Science**, v. 31, p.215-225, 2002.

BRUNS, R.F.; LU, G.H.; PUGSLEY, T.A. Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes. **Molec. Pharmacol**, v. 29, p. 331-346, 1986.

BUNN, S.J.; SIM, A.T.; HERD, L.M.; AUSTIN, L.M.; DUNKLEY, P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal

chromaffin cells: the role of intracellular Ca²⁺ in the histamine H1 receptor-stimulated phosphorylation of Ser8, Ser19, Ser31, and Ser40. **J Neurochem**, v.64, p.1370-1378, 1995.

BUSIJA, D.W.; GASPAR, T.; DOMOKI, F.; KATAKAM, P.V.; BARI, F.; Mitochondrial-Mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: mitochondrial targeted preconditioning. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, p. 1471-1477, 2008.

CASSANO, T.; SERVIDDIO, G.; GAETANI, S.; ROMANO, A.; DIPASQUALE, P.; CIANCI, S.; BELLANTI, F.; LACONCA, L.; ROMANO, A.D.; PADALINO, I.; LAFERLA, F.M.; NICOLETTI, F.; CUOMO, V.; VENDEMIALE, G. Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. **Neurobiol Aging**, v. 33, p. 1121-1132, 2011.

CIRUELA, F.; CASADÓ, V.; RODRIGUES, R.J.; LUJÁN, R.; BURGUEÑO, J.; CANALS, C.; BORYCZ, J.; REBOLA, N.; GOLDBERG, S.R.; MALLOL, J.; CORTÉS, A.; CANELA, E.I.; LÓPEZ-GIMÉNEZ, J.F.; MILLIGAN, G.; LLUÍS, C.; CUNHA, R.A.; FERRÉ, S.; FRANCO, R. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 2080-2087, 2006.

CIRUELA, F.; FERRÉ, S.; CASADÓ, V.; CORTÉS, A.; CUNHA, R.A.; LLUÍS, C.; FRANCO, R. Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 2427-2431, 2006.

CIRUELA, F.; FERNÁNDEZ-DUEÑAS, V.; LLORENTE, J.; BORROTO-ESCUELA, D.; CUFFÍ, M.L.; CARBONELL, L.; SÁNCHEZ, S.; AGNATI, L.F.; FUXE, K.; TASCA, C.I. G protein coupled receptor oligomerization and brain integration: Focus on adenosinergic transmission. **Brain Res**, v.1476, p. 86-95, 2012.

CHAUHAN, N.K.; YOUNG, A.M.J.; GIBSON, C.L.; DAVIDSON, C. Inhibition of pre-ischaemic conditioning in the mouse caudate brain slice by NMDA or adenosine A1 receptor antagonists. **Eur J Pharmacol**, doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.021. Epub 2012 Oct 23.

CHEN, J. F.; HUANG, Z.; MA, J.; ZHU, J.; MORATALLA, R.; STANDAERT, D.; MOSKOWITZ, M.A.; FINK, J.S.; SCHWARZSCHILD, M.A. A2A adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. **J. Neurosci**, v. 19, p. 9192-9200, 1999.

CHEN, L.; LIU, J.; ALI, U.; GUI, Z.H.; HOU, C.; FAN, L.L.; WANG, Y.; WANG, T. Chronic, systemic treatment with a metabotropic glutamate receptor 5 antagonist produces anxiolytic-like effects and reverses abnormal firing activity of projection neurons in the basolateral nucleus of the amygdala in rats with bilateral 6-OHDA lesions. **Brain Res Bull**, v.28, p. 215-223, 2011.

CHEN, J. F.; ELTZSCHIG, H. K.; FREDHOLM, B.B. Adenosine receptors as drug targets - what are the challenges? **Nature Reviews**, v. 12, p. 273-295, 2013.

CHOI, D.W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. **Neurosci Lett**, v. 58, p. 293-297, 1985.

CHOU, S.Y.; LEE, Y.C.; CHEN, H.M.; CHIANG, M.C.; LAI, H.L.; CHANG, H.H.; WU, Y.C.; SUN, C.N.; CHIEN, C.L.; LIN, Y.S.; WANG, S.C.; TUNG, Y.Y.; CHANG, C.; CHERN, Y. CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model. **J Neurochem**, v, 93, p. 310-320, 2005.

CHUANG, D.M.; GAO, X.M.; PAUL, S.M. N-methyl-D-aspartate exposure blocks glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells. **Mol Pharmacol**, v. 42, p. 210-216,1992.

CONSTANTINO, L. C.; TASCA, C. I; BOECK, C. R. The Role of NMDA Receptors in the Development of Brain Resistance through Pre- and Postconditioning. **Aging and Disease**, v. 5, *In press*, 2014.

CORVOL, J. C., STUDLER, J. M., SCHONN, J. S., GIRAULT, J. A. & HERVE, D. Gaolf is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. **J. Neurochem**, v. 76, p. 1585-1588, 2001.

COSTA, T.; CONSTANTINO, L.C; MENDONÇA, B.P.; PEREIRA, J.G.; HERCULANO, B.; TASCA,C.I.; BOECK, C.R. N-Methyl-D-

Aspartate Preconditioning Improves Short-Term Motor Deficits Outcome After Mild Traumatic Brain Injury in Mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, p. 329-1337, 2010.

CRAIG, C.G.; WHITE, T.D. N-methyl-D-aspartato and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, p. 1073-1080, 1993.

CRUZ, S. L.; GAUTHEREAU, M.Y.; CAMACHO-MUNOZ, C.; LOPEZ-RUBALCA, V. A. C.; BALSTER, R.L. Effects of inhaled toluene and 1,1,1-trichloroethane on seizures and death produced by N-methyl-D-aspartic acid in mice. **Behav Brain Res**, v. 140, p. 195-202, 2003.

CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S.; FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, p.327-335, 2001

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 111-134, 2005.

CURTIS, D.R.; WATKINS, J.C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. **J Neurochem**, v. 6, p. 117-141, 1960.

DAI, C.; LIANG, D.; LI, H.; SASAKI, M.; DAWSON, T.M. Functional Identification of Neuroprotective Molecules. **PLoS ONE** 5, v. 11, p. 1-10, 2010.

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

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

DALY, J. W. & PADGETT, W. L. Agonist activity of 2- and 5'-substituted adenosine analogs and their N6-cycloalkyl derivatives at A1- and A2-adenosine receptors coupled to adenylate cyclase. **Biochem. Pharmacol**, v. 43, p. 1089-1093, 1992.

DATTA, S.R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M.E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev**, v. 1, p. 2905-2927, 1999.

De ARAÚJO HERCULANO, B. A.; VANDRESEN-FILHO, S.; MARTINS, W.C.; BOECK, C.R.; TASCA, C.I. NMDA preconditioning protects against quinolinic acid-induced seizures via PKA, PI3K and MAPK/ERK signaling pathways. **Behav Brain Res**, v. 219, p. 92-97, 2011.

DENT, P. Crosstalk between ERK, AKT, and cell survival. **Cancer Biol Ther**, v. 15, p. 245-246, 2014.

DICKIE, B.G.M.; HOLMES, C.; GREENFIELD, S.A. Neurotoxic and neurotrophic effects of chronic N-methyl-D-aspartate exposure upon mesencephalic dopaminergic neurons in organotypic culture. **Neuroscience**, v. 72, p. 731-741.

DIRNAGL, U.; SIMON, R.P.; HALLENBECK, J.M. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. **Trends Neuroscience**, v. 26, p. 248-254, 2003

Do AMARAL E SILVA MÜLLER, G.; VANDRESEN-FILHO, S.; TAVARES, C.P.; MENEGATTI, A.C.; TERENZI, H.; TASCA C.I.; SEVERINO, P.C. Proteomic analysis of the mice hippocampus after preconditioning induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA). **J Mol Neurosci**, v. 50, p. 154-164, 2013.

DOBRACHINSKI, F.; BASTOS, L.L.; BRIDI, J.C.; CORTE, C.L.D.; de ÁVILA, D.S.; da ROCHA, J.B.T.; SOARES, F.A.A. Cooperation of non-effective concentration of glutamatergic system modulators and antioxidant against oxidative stress induced by quinolinic acid. **Neurochem Res**, v. 37 p. 1-11, 2012.

DUNWIDDIE, T.V.; HAAS, H.L. Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. **J Physiol**, v. 369, p. 365-377, 1985.

DUNWIDDIE, T.V.; DIAO, L.; PROCTOR, W.R. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 17, p. 7673-7682, 1997.

DUNWIDDIE, T.V.; MASINO, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 31-55, 2001.

ECKLE, T.; FAIGLE, M.; GRENZ, A.; LAUCHER, S.; THOMPSON, L.F.; ELTZSCHIG, H.K. A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. **Blood**, v. 111, p. 2024-2035, 2008.

ECKLE, T.; HARTMANN, K.; BONNEY, S.; REITHEL, S.; MITTELBRONN, M.; WALKER, L.A.; LOWES, B.D.; BORCHERS, C.H.; BUTTRICK, P.M.; KOMINSKY, D.J.; COLGAN, S.P.; ELTZSCHIG, H.K. Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. **Nature Med**, v. 18, p. 774-782, 2012.

EGEA, J.; ROSA, A.O.; CUADRADO, A.; GARCÍA, A.G.; LÓPEZ, M.G. Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. **J. Neurochem**, v. 2, p. 1842-1852, 2007.

ELTZSCHIG, H.K. Adenosine: an old drug newly discovered. **Anesthesiology**, v. 111, p. 904-915, 2009.

ELTZSCHIG, H.K.; CARMELIET, P. Hypoxia and inflammation. **N. Engl. J. Me**, v. 364, p. 656-665, 2011.

ELTZSCHIG, H.K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion —from mechanism to translation. **Nature Med**, v. 17, p. 1391-1401, 2011.

ELTZSCHIG, H.K.; SITKOVSKY, M.V.; ROBSON, S.C. Purinergic signaling during inflammation. **N. Engl. J. Med**, v. 367, p. 2322-2333, 2012.

FEATHERSTONE, D.E. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. **ACS Chemical Neuroscience**, v.1, p.4-12, 2010.

FERRÉ, S.; CIRUELA, F.; WOODS, A.; LLUÍS, C.; FRANCO, R. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the Central Nervous System. **Trends in Neurosciences**, v. 30, p. 440-446, 2007.

FERREIRA, J. M.; PAES-DE-CARVALHO, R. Long-term activation of adenosine A2A receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. **Brain Res**, v. 900, p. 169-176, 2001.

FREDHOLM BB. Purinoceptors in the nervous system. **Pharmacol Toxicol**, v. 76, p. 228-239, 1995.

FREDHOLM, B. B.; ARSLAN, G.; HALLDNER, L.; KULL, B.; SCHULTE, G.; WASSERMAN, W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol**, v. 362, p. 364-374, 2000.

FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A.P.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.N.; LINDEN, J. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 527-552, 2001.

FREDHOLM, B.B.; CHEN, J.F.; CUNHA, R.A.; SVENNINGSSON, P.; VAUGEOIS, J.M. Adenosine and brain function. **International Review of Neurobiology**, v. 63, p. 191-270, 2005.

FREDHOLM, B. B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death Differ**, v. 14, p. 1315-1323, 2007.

FRICK, J.S.; MACMANUS, C.F.; SCULLY, M.; GLOVER, L.E.; ELTZSCHIG, H.K.; COLGAN, S.P. Contribution of adenosine A2B receptors to inflammatory parameters of experimental colitis. **J. Immunol**, v. 182, p. 4957-4964, 2009.

FUXE, K.; MARCELLINO, D.; BORROTO-ESCUELA, D.O.; FRANKOWSKA, M.; GUIDOLIN, D.; CIRUELA, F.; AGNATI, L.F. The changing world of G protein-coupled receptors: From monomers to dimers and receptor mosaics with allosteric receptor receptor interactions. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 30, p. 272-283, 2010.

GAGLIARDI, R. J. Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. **Arquivos de neuropsiquiatria**, v. 58, p. 583-588, 2000.

GÄHWILER, B.H.; CAPOGNA, M.; DEBANNE, D.; MCKINNEY, R.A.; THOMPSON, S. M. Organotypic slices cultures: A technique has come of age. **Trends Neurosci**, v. 20, p. 471-477, 1997.

GANZELLA, M.; JARDIM, F.M.; BOECK, C.R. VENDITE, D. Time course of oxidative events in the hippocampus following intracerebroventricular infusion of quinolinic acid in mice. **Neuroscience Research**, v. 55, n. 4, p. 397-402, 2006.

GIDDAY, J. M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 7, p. 1-12, 2006.

GONDA, X. Basic pharmacology of NMDA receptors. **Curr Pharm Des**, v. 18, p.1558-1567, 2012.

GOOSENS, K.A. Hippocampal regulation of aversive memories. **Current Opinion of Neurobiology**, v. 21, p. 460-466, 2011.

GRENZ, A.; BAUERLE, J.D.; DALTON, J.H.; RIDYARD, D.; BADULAK, A.; TAK, E.; MCNAMEE, P.T.; CLAMBEY, E.; MOLDOVAN, R.; REYES, G.; KLAWITTER, J.; AMBLER, K.; MAGEE, K.; CHRISTIANS, U.; BRODSKY, K.S.; RAVID, K.; CHOI, D.S.; WEN, J.; LUKASHEV, D.; BLACKBURN, M.R.; OSSWALD, H.; COE, I.R.; NÜRNBERG, B.; HAASE, V.H.; XIA, Y.; SITKOVSKY, M.; ELTZSCHIG, H.K. Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) regulates postischemic blood flow during acute kidney injury in mice. **J. Clin. Invest**, v. 122, p. 693-710, 2012.

GUBELLINI, P.; PISANI, A.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G.; CALABRESI, P. Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic

plasticity: implications for neurological diseases. **Progress Neurobiology**, v. 74, p. 271-300, 2004.

GUILLEMIN, G. J. Quinolinic acid: neurotoxicity. **The FEBS Journal**, v. 279, n. 8, p. 1355, 2012.

HAYASHI, T. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. **Jpn J Physiol**, v. 3, p. 46-64, 1952.

HALLAK, M.; IRTENKAUF, S.M.; JANUSZ, C.A.; COTTON, D.B. Stimulation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in rats: developing a seizure model. **Am J Obstet Gynecol**, v. 169, p. 695-700, 1993.

HARDINGHAM, G.E. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. **Biochem Soc Trans**, v. 37, p. 1147-1160, 2009.

HART, M. L.; HART, M.L.; GRENZ, A.; GORZOLLA, I.C.; SCHITTENHELM, J.; DALTON, J.H.; ELTZSCHIG, H.K. Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent protection from intestinal ischemia/reperfusion injury involves ecto-5'-nucleotidase (CD73) and the A2B adenosine receptor. **J. Immunol**, v. 186, p. 4367-4374, 2011.

HASKO, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B.; PACHER, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature Rev. Drug Discov**, v. 7, p. 759-770, 2008.

HEURTEAUX, C.; LAURITZEN, I.; WIDMANN, C.; LAZDUNSKI, M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v 92, p. 4666-46670, 1995.

HENNEBERGER1, C.; PAPOUIN, T.; OLIET, S.H.R.; RUSAKOV, D.A. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. **Nature Letters**, v. 463, p. 232-237, 2010.

HENNEBERGER, C.; BARD, L.; KING, C.; JENNINGS, A.; RUSAKOV, D.A. NMDA Receptor Activation: Two Targets for Two Co-Agonists. **Neurochem Res**, v. 38, p.1156-1162, 2013.

HEYES, M.P.; MEFFORD, I.N.; QUEARRY, B.J.; DEDHIA, M.; LACKNER, A. Increased ratio of quinolinic acid to kynurenic acid in cerebrospinal fluid of D retrovirus-infected rhesus macaques: relationship to clinical and viral status. **Ann Neurol**, v. 27, p. 666-675, 1990.

HOEHN, K.; WHITE, T.D. Role of excitatory amino acid receptors in KC- and glutamate-evoked release of endogenous adenosine from rat cortical slices. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, p. 256-265, 1990.

HUANG, Z. L.; QU, W.; EGUCHI, N.; CHEN, J.; SCHWARZSCHILD, M.A.; FREDHOLM, B.B.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. **Nature Neurosci**, v. 8, p. 858-859, 2005.

HUETTNER, J. E. Kainate receptors and synaptic transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 70, p. 387-407, 2003.

IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? **Lancet Neurol**, v. 1, p. 383-386, 2002.

IRVING, E.A.; BAMFORD, M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 22, p. 631-647, 2002.

JACOBSSON, S.O.; FOWLER, C.J. Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephalic cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. **Neurochem Int**, v. 34, p. 49-62, 1999.

JANOFF, A. Alterations in Lysosomes (Intracellular Enzymes) during Shock; Effects of Preconditioning (Tolerance) and Protective Drugs. **Int Anesthesiol Clin**, v. 2, p. 251-269, 1964.

JIA, J.; WANG, X.; LI, H.; HAN, S.; ZU, P.; LI, J. Activations of nPKC and ERK1/2 were involved in oxygen-glucose deprivation-induced neuro protection via NMDA receptors in hippocampal slices of mice. **J Neurosurg Anesthesiol**, v. 19, p. 18-24, 2007.

JIANG, X.; TIAN, F.; MEAROW, K.; OKAGAKI, P.; LIPSKY R.H.; MARINI, A.M. The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 94, p. 713-722, 2005.

JONES, P.A.; SMITH, R.A.; STONE, T.W. Protection against hippocampal kainate excitotoxicity by intracerebral administration of anadenosine A2A receptor antagonist. **Brain Res**, v. 800, p. 328-335, 1998 .

KAMBE, Y.; NAKAMICHI, N.; TAKARADA, T.; FUKUMORI, R.; YONEDA, Y. Induced Tolerance to Glutamate Neurotoxicity Through Down-Regulation of NR2 Subunits of N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Cultured Rat Striatal Neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, p; 2177-2187, 2010.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, v. 179, p. 4-29, 2006.

KITAGAWA, K.; MATSUMOTO, M.; TAGAYA, M.; HATA, R.; UEDA, H.; NIINOBE, M.; HANDA, N.; FUKUNAGA, R.; KIMURA, K.; MIKOSHIBA, K. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. **Brain Research**, v. 528, p. 21-24, 1990.

KOURA, S.S.; DOPPENBERG, E.M.; MARMAROU, A.; CHOI, S.; YOUNG, H.F.; BULLOCK, R. Relationship between excitatory amino acid release and outcome after severe human head injury. **Acta Neurochir Suppl**. v. 71, p. 244-246, 1998.

KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 65, p. 1-20, 2006.

KULL, B.; SVENNINGSSON, P.; FREDHOLM, B. B. Adenosine A2A receptors are colocalized with and activate Golf in rat striatum. **Mol. Pharmacol**, v. 58, p. 771-777, 2000.

LAI, T.W.; ZHANG, S.; WANG, Y.T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. **Prog. Neurobiol**, doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.006.

LANDOLT, P. H.; RÉTEY, J. V.; ADAM, M. Reduced neurobehavioral impairment from sleep deprivation in older adults: contribution of adenosinergic mechanisms. **Frontiers in Neurology**, v. 3, p. 1-11, 2012.

LAPIN, I. P. Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. **J Neural Transm**, v. 42, p. 37-43, 1978.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Arch**. v. 460, p. 525-542, 2010.

LAZARUS, M.; SHEN, H.; CHERASSE, Y.; QU, W.; HUANG, ZI.; BASS, C.E. WINSKY-SOMMERER, R.; SEMBA, K.; FREDHOLM, B.B.; BOISON, D.; HAYAISHI, O.; URADE, Y.; CHEN, J. Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. **J. Neurosci**, v. 31, p. 10067-10075, 2011.

LEVIN, S.G.; GODUKHIN, O.V. Comparative roles of ATP-sensitive K⁺ channels and Ca²⁺-activated BK⁺ channels in posthypoxic hyperexcitability and rapid hypoxic preconditioning in hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 461, p. 90-94, 2009.

LI, K.W.; CHEN, N.; SMIT, A.B. Interaction proteomics of the AMPA receptor: towards identification of receptor sub-complexes. **Amino Acids**, v. 44, p. 1247-1251, 2013.

LISTOS, J.; TALAREK, E.; POLESZAK, E.; WRÓBEL, A.; FIDECKA, S. Attenuating effect of adenosine receptor agonists on the development of behavioral sensitization induced by sporadic treatment with morphine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 98, p. 356-361, 2011.

LISÝ, V.; STASTNÝ, F. Nitric oxide synthase inhibition and glutamate binding in quinolinat-lesioned rat hippocampus. **Physiol Res**, v. 51, p. 299-330, 2002.

LIU, D.Z.; ZHAO, F.L.; LIU, J.; JI, X.Q.; YE, Y.; ZHU, X.Z. Potentiation of adenosine A1 receptor agonist CPA-induced

antinociception by paeoniflorin in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 8, p. 1630-1633, 2006.

LIU, X. L.; ZHOU, R.; PAN, Q.; JIA, X.; GAO, W.; WU, J.; LIN, J.; CHEN, J. Genetic inactivation of the adenosine A2A receptor attenuates pathologic but not developmental angiogenesis in the mouse retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v. 51, p. 6625-6632, 2010.

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

LUCENA, G.M.; MATHEUS, F.C.; FERREIRA, V.M.; TESSELE, P.B.; AZEVEDO, M.S.; CECHINEL-FILHO V.; PREDIGER, R.D. Effects of ethanolic extract and naphthoquinones obtained from the bulbs of *Cipura paludosa* on short-term and long-term memory: involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 112, p. 229-35, 2013.

MACKLIS, J.D.; MADISON, R.D. Progressive incorporation of propidium iodide in culture mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: A fluorescence scale of membrane integrity. **J Neurosci. Meth**, v. 31, p. 43-46, 1990.

MADDAHI, A.; EDVINSSON, L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. **J Neuroinflammation**, v. 26, p. 7-14, 2010.

MADDEN, K. NMDA receptor antagonists and glycine site NMDA antagonists. **Curr Med Res Opin**, v. 18, p. 27-31, 2002.

MANZONI, O.J.; MANABE, T.; NICOLL, R.A. Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. **Science**, v. 265, p. 2098-2101, 1994.

MARAIS, E.; GENADE, S.; LOCHNER, A. CREB activation and ischaemic preconditioning. **Cardiovasc Drugs**, v. 22, p. 3-17, 2008.

MATOS, M.; AUGUSTO, E.; DOS SANTOS-RODRIGUES, A.; SCHWARZSCHILD, M.A.; CHEN, J.; CUNHA, R.; AGOSTINHO, P. Adenosine A2A Receptors Modulate Glutamate Uptake in Cultured Astrocytes and Gliosomes. **GLIA**, v. 60, p. 702-716, 2012.

MATOS, M.; AUGUSTO, E.; AGOSTINHO, P.; CUNHA, R.A.; CHEN, J.F. Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and Na⁺/K⁺-ATPase- α 2 controlling glutamate uptake in astrocytes. **J Neurosci**, v. 33, p. 18492-18502, 2013.

MARGANELLA, C.; BRUNO, V.; MATRISCIANO, F.; REALE, C.; NICOLETTI, F.; MELCHIORRI, D. Comparative effects of levobupivacaine and racemic bupivacaine on excitotoxic neuronal death in culture and N-methyl-D-aspartate-induced seizures in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 518, p. 111–115, 2005.

MELANI, A.; PANTONI, L.; CORSI, C. Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in wake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion. Correlation with neurological deficit and histopathological damage. **STROKE**, v. 30, p. 2448-2455, 1999.

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

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metabolic Brain Disease**, v. 19, p. 151-167, 2004.

McINTOSH, T.K. Novel pharmacologic therapies in the treatment of experimental traumatic brain injury – review. **Journal of Neurotrauma**, v. 10, p. 215-261, 1993.

MIYAWAKI, T.; MASHIKO, T.; OFENGEIM, D.; FLANNERY, R. J.; NOH, K. M.; FUJISAWA, S. Ischemic preconditioning blocks BAD translocation, Bcl-xL cleavage, and large channel activity in mitochondria of postischemic hippocampal neurons. **PNAS**, v. 105, p. 4892-4897, 2008.

MOLZ, S.; DECKER, H.; OLIVEIRA, I.J.; SOUZA, D.O.; TASCA, C.I. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. **Neurochem Res**. v. 30, p. 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.** v. 33, p. 27-36, 2008.

MOOJEN, V.K.; DAMIANI-NEVES, M.; BAVARESCO, D.V.; PESCADOR, B.B.; COMIM, C.M.; QUEVEDO, J.; BOECK, C.R. NMDA preconditioning prevents object recognition memory impairment and increases brain viability in mice exposed to traumatic brain injury. **Brain Res.** v. 1466, p. 82-90, 2012.

MORONI, F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. **European Journal of Pharmacology**, v. 375, p. 87-100, 1999.

MUIR, K.W. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, p. 53-60, 2006.

MUIR, W.W. NMDA Receptor Antagonists and Pain: Ketamine. **Vet Clin Equine**, v. 26, p. 565-578, 2010.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, v. 74, p. 1124-36, 1986.

MYINT, A. M. Kynurenines: from the perspective of major psychiatric disorders. **FEBS Journal**, v. 279, p. 1375-1385, 2012.

NAREDO V. I.; POEGGELER, B.; SANCHES, V. S.; CABALLERO, B.; ZAPICO, C.T.; GARCIA, O. A.; TOLIVIA, D.; COLUNGA, M. R.; MONTES, A. C. Melatonin neutralizes neurotoxicity induced by quinolinic acid in brain tissue culture. **J Pineal Res**, v. 39, p. 266-75, 2005.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nature Review Neuroscience**, v. 3, p. 748-755, 2002.

NICHOLS, R.A.; DENGLER, A.F.; NAKAGAWA, E.M.; BASHKIN, M.; PAUL, B.T.; WU, J.; KHAN, G.M. A constitutive, transient receptor potential-like Ca²⁺ influx pathway in presynaptic nerve

endings independent of voltage-gated Ca^{2+} channels and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. **J Biol Chem.** v. 49, p. 36102-36111, 2007.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, p. 656-664, 2012.

NOSHITA, N.; LEWÉN, A.; SUGAWARA, T.; CHAN, P. H. Akt phosphorylation and neuronal survival after traumatic brain injury in mice. **Neurobiol Dis.** v. 3, p. 294-304, 2002.

NUNEZ, J. Primary Culture of Hippocampal Neurons from P0 Newborn Rats. **JoVE.** 19, 2008.

OGITA, K.; OKUDA, H.; YAMAMOTO, Y.; NISHIYAMA, N.; YONEDA, Y. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, p. 1336-1346, 2003.

OLIVEIRA, C.S.; RIGON, A.P.; LEAL, R.B.; ROSSI, F.M. The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, p. 355-362, 2008.

OLNEY, J. W. Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. **Biol Psychiatry**, v. 26, p. 505-525, 1989.

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. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, p. 1126-1135, 1999.

OZAITA, A.; PUIGHERMANAL, E.; MALDONADO, R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. **J Neurochem**, v. 102, p. 1105-1114, 2007.

PAMPLONA F.A.; HENES, K.; MICALÉ, V.; MAUCH, C. P.; TAKAHASHI, R. N.; WOTJAK, C.T. Prolonged fear incubation leads to generalized avoidance behavior in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 45, p. 354-360, 2011.

PAPOUIN, T.; LADÉPÊCHE, L.; RUEL, J.; SACCHI, S.; LABASQUE, M.; HANINI, M.; GROG, L.; POLLEGIONI, L.; MOTHET, J.P.; OLIET, S.H. Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. **Cell**, v. 150, p. 633–646, 2012.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, p. 383-400, 2013.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, p. 10625-10629, 1994.

PÉREZ-DE LA CRUZ, V.; CARRILLO-MORA, P.; SANTAMARÍA, A. Quinolinic Acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. **Int J Tryptophan Res**, v. 5, p. 1-8, 2012.

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.

PHILLIS, J.W.; O'REGAN, M.H. Energy utilization in the ischemic/reperfused brain. **Int Rev Neurobiol**, v.5 1, p. 377-414, 2002.

POLI, A.; LUCCHI, R.; VIBIO, M.; BARNABEI, O. Adenosine and glutamate modulate each other's release from rat hippocampal synaptosomes. **Journal of Neurochemistry**, v. 57, p. 298-306, 1991.

POPESCU, G.; AUERBACH, A. The NMDA receptor gating machine: lessons from single channels. **Neuroscientist**, v. 10, p. 192-198, 2004.

PRINGLE, A.K.; THOMAS, S.J.; SIGNORELLI, F.; IANNOTTI, F. Ischaemic pre-conditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). **Brain Res**, v. 845, p. 152-164, 1999.

REDEL, A.; LANGE, M.; JAZBUTYTE, V.; LOTZ, C.; SMUL, T.M.; ROEWER, N. Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K⁺ channels via protein kinase a mediates desflurane-induced preconditioning. **Anesth Analg**, v. 106, p. 384–91, 2008.

REINER, A.; ARANT, R. J.; ISACOFF, E. Y. Assembly Stoichiometry of the GluK2/GluK5 Kainate Receptor Complex. **Cell Rep**. v. 29, p. 234-240, 2012.

REJDAK, R.; REJDAK, K.; SIEKLUCKA DZIUBA, M.; STELMASIAK, Z.; GIEB, P. Brain tolerance and preconditioning. **Journal Pharmacology**, v. 53, p. 73-79, 2001.

RESHEF, A.; SPERLING, O.; ZOREF-SHANI, E. Role of K(ATP) channels in the induction of ischemic tolerance by the 'adenosine mechanism' in neuronal cultures. **Adv Exp Med Biol**, v. 486, p. 217-221, 2000.

RUDOLPHI, K.A.; SCHUBERT, P.; PARKINSON, F.E. et al. Adenosine and brain ischemia. **CEREBROVASC. Brain Review**, v. 4, p. 346-360, 1992.

RYTER, S. W.; KIM, H. P.; HOETZEL, A.; PARK, J. W.; NAKAHIRA, K.; WANG, X.; CHOI, A.M. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, p. 49-89, 2007.

SAMOILOV, M. O.; LAZAREVICH, E. V.; SEMENOV, D. G.; MOKRUSHIN, A. A.; TYUL'KOVA, E. I.; ROMANOVSKII, D. Y.; MILYAKOVA, E. A.; DUDKIN, K. N.; The adaptive affects of hypoxic preconditioning of brain neurons. **Neuroscience and behavioral physiology**, v. 33, p. 1-11, 2003.

SANTAMARÍA A, RÍOS C. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. **Neurosci Lett.**, v. 159, p. 51-54, 1993.

SANTAMARÍA, A.; SALVATIERRA-SÁNCHEZ, R.; VÁZQUEZ-ROMÁN, B. "Protective effects of the antioxidant selenimon quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies," **Journal of Neurochemistry**, v. 86, p. 479–488, 2003.

SCHALLER, B.; GRAF, R. Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinically important entity of stroke prevention. **Journal of Neurology**, v. 249, p. 1503-1511, 2002.

SHLEPER, M.; KARTVELISHVILY, E.; WOLOSKER, H. D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. **J Neurosci**, v. 25, p. 9413-9417, 2005.

SHPARGEL, K. B.; JALABI, W.; JIN, Y.; DADABAYEV, A.; PENN, M. S.; TRAPP, B. D. Preconditioning paradigms and pathways in the brain. **Cleveland Clinic Journal of medicine**, v. 75, p. 77-82, 2008.

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

SCHMUED, L.C.; STOWERS, C.C.; SCALLET, A.C.; XU, L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Res**, v. 1035, p. 24-31, 2005.

SCHOUSBOE, A.; HERTZ, L. Role of astroglial cells in glutamate homeostasis. **Adv Biochem Psychopharmacol.**, v. 27, p. 103-113, 1981

SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H.S. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. **Neurotox Res**, v. 8, p. 221-225, 2005.

SCHULTE, G.; FREDHOLM, B. B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. **Cell. Signal**, v. 15, p. 813-827, 2003.

SCHURR, A.; PAYNE, R. S.; TSENG, M. T.; GOZAL, D. Excitotoxic preconditioning elicited by both glutamate and hypoxia and abolished by lactate transporter inhibition in rat hippocampal slices. **Neuroscience**, v. 307, p. 151-154, 2001.

SCHWARCZ, R.; WHETSELL, W.O. JR.; MANGANO, R.M.. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. **Science**, v. 219, p. 316-318, 1983.

SCHWARCZ, R.; PELLICCIARI, R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 303, p. 1-10, 2002.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, F. F.; RIBEIRO, J. A. From A1 to A3 en passant Through A2A Receptors in the Hippocampus: Pharmacological Implications CNS & Neurological Disorders **Drug Targets**, v. 11, p. 652-663, 2012.

SIEGEL, G. J.; ALBERS, R.W.; BRADY, S.T.; PRICE, D.L. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects**. 7th ed., Elsevier Academic Press: Burlington, 2006.

SORIANO, F.X.; PAPADIA, S.; HOFMANN, F.; HARDINGHAM, N.R.; BADING, H.; HARDINGHAM, G. E. Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. **J Neurosci**, v. 26, p. 4509-4518, 2006.

STONE, T.; PERKINS, M. N.; Quinolinic acid: regional variations in neuronal sensitivity **Brain Res.** v.17, p. 172-176, 1983.

STONE, T. W. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. **Progress in Neurobiology**, v. 64, p. 185-218, 2001.

STONE, T. W.; ADDAE, J. I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **Eur J Pharmacol**, v. 447, p. 285-296, 2002.

STONE, T.W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, p. 609-620, 2002.

SWANSON, C. J.; BURES, M.; JOHNSON, M. P; LINDEN, A.; MONN, J. A; SCHOEPP, D. D. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Nature reviews Drug discovery**, v.4, p. 131-144, 2005.

SUN, D.; Samuelson, L. C.; Yang, T.; Huang, Y.; Paliege, A.; Saunders, T.; Briggs, J.; Schnermann, J. Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. **Proc. Natl Acad. Sci**, v. 98, p. 9983-9988, 2001.

TAKAMORI, S. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? **Neurosci Res**, v.55, p. 343-351, 2006.

TASCA, C. I.; SOUZA, D. O. Interaction of Adenosine and Guanine Derivates in the Rat hippocampus: Effects on Cyclic AMP Levels and on the Binding os Adenosine Analogues and GMP. **Neurochemical Research**, v. 25, p. 181-188, 2000.

TAVARES, R. G.; TASCA, C. I.; SANTOS, C. E.; WAJNER, M.; SOUZA, D. O.; DUTRA-FILHO, C. S. 2000. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. **Neuroreport** v. 11, p. 249-253, 2000.

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

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

THORN, J.A.; JARVIS, S.M. Adenosine transporters. **Gen Pharmacol**, v. 27, p. 613-20, 1996.

TYMIANSKI, M. Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. **Nat Neurosci**. v.11, p.1369-1373, 2011.

WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis**, v. 11, p. 1382-402, 2010.

VACAS, J.; FERNÁNDEZ, M.; ROS, M.; BLANCO, P. Adenosine modulation of [Ca²⁺]_i in cerebellar granular cells: multiple adenosine receptors involved. *Brain Res*, v. 992, p. 272-280, 2003.

VANDRESEN-FILHO, S.; HERCULANO, B. A.; FRANCO, J. L.; BOECK, C. R.; DAFRE, A. L.; TASCA, C. I. Evaluation of glutathione metabolism in NMDA preconditioning against quinolinic acid-induced seizures in mice cerebral cortex and hippocampus. **Brain Res**, v. 1184, p. 38-45, 2007.

VANDRESEN-FILHO, S.; HOELLER, A. A.; HERCULANO, B. A.; DUZZIONI, M.; DUARTE, F. S.; PIERMARTIRI, T. C.; BOECK, C. C.; DE LIMA, T. C.; MARINO-NETO, J.; TASCA, C.I. NMDA Preconditioning Attenuates Cortical and Hippocampal Seizures Induced by intracerebroventricular Quinolinic Acid Infusion. **Neurotox Res**, v. 24, p. 55-62, 2012.

VALENTIM, L. M.; RODNIGHT, R.; GEYER, A. B.; HORN, A. P.; TAVARES, A.; CIMAROSTI, H.; NETTO, C. A.; SALBEGO, C. G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience**, v. 118, p. 379-386, 2003.

VIZI, E. S.; KISFALI, M.; LORINCZ, T. Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. **Brain Res Bull**, v. 93, p. 32-38, 2013.

VAN HORN, M. R.; SILD, M.; RUTHAZER, E. S. D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 1-13, 2013.

VON LUBITZ, D. K.; LIN, R. C.; POPIK, P.; CARTER, M. F.; JACOBSON, K. A. Adenosine A3 receptor stimulation and cerebral ischemia. **European Journal Pharmacology**, v. 263, p. 59-67, 1994.

XU, G.P.; DAVE, K.R.; VIVERO, R.; SCHIMIDT KASTNER, R.; SICK, T.J.; PEREZ-PINZON, M.A. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning hippocampal slice cultures. **Brain Research**, v. 952, p. 153-158, 2000.

YOUSSEF, F.; ADDAE, J. I.; STONE, T.W. NMDA-induced preconditioning attenuates synaptic plasticity in the rat hippocampus. **Brain Res**, v. 183, p. 1073-1074, 2006.

ZHAN, L.; YAN, H.; ZHOU, H.; SUN, W.; HOU, Q.; XU, E. Hypoxic Preconditioning Attenuates Neuronal Cell Death by Preventing MEK/ERK Signaling Pathway Activation after Transient Global Cerebral Ischemia in Adult Rats. **Mol Neurobiol**, v. 48, p. 109-119, 2013.

ZHAO, L.; LIU, X.; LIANG, J.; HANA, S.; WANG, Y.; YIN, Y.; LUO, Y.; LI, J. Phosphorylation of p38^{MAPK} mediates hypoxic preconditioning-induced neuroprotection against cerebral ischemic injury via mitochondria translocation of Bcl-xL in mice. **Brain Research**, v. 1503, p. 78-88, 2013.

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

ZHU, J.; REBECCHI, M. J.; GLASS, P. S. A.; BRINK, P. R.; LIU, L. Interactions of GSK-3 β With Mitochondrial Permeability Transition Pore Modulators During Preconditioning: Age-Associated Differences. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 68, p. 395-403, 2013.

