

Ma. Débora Lanznaster

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DA GUANOSINA COM
HETERÔMEROS DE RECEPTORES A₁+A_{2A} E SEU EFEITO
NEUROPROTETOR CONTRA A TOXICIDADE DO PEPTÍDEO
β-AMILOIDE₁₋₄₀**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutor em
Neurociências
Orientador: Profa. Dra. Carla I. Tasca

Florianópolis
2016

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

Lanznaster, Débora
ESTUDO DA INTERAÇÃO DA GUANOSINA COM HETERÔMEROS DE
RECEPTORES A1+A2A E SEU EFEITO NEUROPROTETOR CONTRA A
TOXICIDADE DO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE1-40 / Débora Lanznaster ;
orientadora, Carla I. Tasca - Florianópolis, SC, 2016.
145 p.

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

Inclui referências

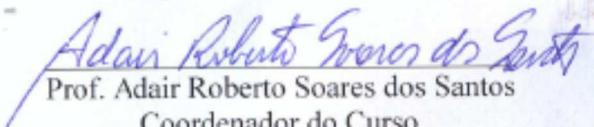
1. Neurociências. 2. guanosina. 3. heterômeros de GPCR.
4. neuroproteção. 5. Alzheimer. I. Tasca, Carla I.. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Neurociências. III. Título.

DÉBORA LANZMASTER

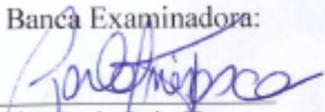
**“ESTUDO DA INTERAÇÃO DA GUANOSINA COM
HETERÔMEROS DE RECEPTORES A₁R/A_{2A}R E DO SEU
EFEITO NEUROPROTETOR CONTRA A TOXICIDADE
DO PEPTÍDEO B-AMILOIDE₁₋₄₀”**

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

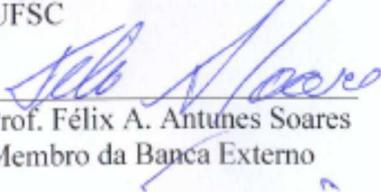
Florianópolis, 01 de março de 2016.

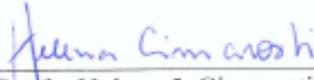

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

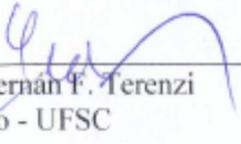
Banca Examinadora:


Prof. Carla Inês Tasca
Orientadora – UFSC


Prof. Alexandre Pastoris Müller
Membro da Banca Externo


Prof. Félix A. Antunes Soares
Membro da Banca Externo


Prof. Helena I. Cimarosti
Membro - UFSC


Prof. Hernán F. Terenzi
Membro - UFSC


Prof. Manuella Pinto Kaster
Membro - UFSC

AGRADECIMENTOS

À prof. Dra. Carla I. Tasca, pela oportunidade, paciência, confiança e pelos ensinamentos repassados nesses anos. Obrigada pela tua amizade!

Aos amigos do laboratório de Neuroquímica 4, pela convivência e pelo companheirismo; pelas inúmeras risadas e por aguentarem minha tensão pré-tese. Obrigada, minhas amigas e meus amigos!

Ao prof. Dr. Francisco Ciruela, pelas oportunidades e ensinamentos; aos companheiros de laboratório, por terem sido uma família quando eu estive longe da minha. ¡*Muchisisisimas gracias, guapos!*

Ao prof. Dr. Rui D. Prediger pela colaboração nos estudos de comportamento e pelos ensinamentos no momento da minha qualificação. Ao Josiel, pelas constantes discussões científicas e filosóficas e pelo companheirismo nos fins de semana de trabalho.

Ao prof. Dr. Diogo O. Souza, pelos ensinamentos e pela estrutura física e pessoal emprestada durante meu estágio no seu laboratório. Obrigada à sua equipe, principalmente ao Marcelo, Roberto, Gisele e Eduardo Zimmer pelo auxílio nos experimentos e convivência nos meus dias em Porto Alegre.

À minha mãe, pelo amor incondicional, por todo o auxílio financeiro e emocional que me permitiu realizar este trabalho.

À minha família, pelo apoio incondicional.

À Fernanda, pela amizade desde a graduação, por me ajudar a acreditar em mim quando eu mais precisei.

Ao Bruno, pela presença à distância, pela paciência nos meus momentos de tensão, por sempre me incentivar a seguir em frente. *T'estimo molt!*

À equipe do 1007, pelos finais de semana de companheirismo e pelas risadas.

Aos funcionários dos LAMEBs e do LCME da UFSC.

À CAPES e CNPq, pelos auxílios financeiros indispensáveis à realização desta Tese.

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente”.

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

A guanosina, nucleosídeo derivado da purina guanina, exerce efeitos neuroprotetores e neurotróficos no Sistema Nervoso Central (SNC). Recentemente, um sistema de neurotransmissão purinérgica dos derivados da guanina, ou sistema guanosinérgico, foi proposto. Deste sistema de neurotransmissão, já são conhecidos transportadores de nucleosídeos e enzimas responsáveis pelo metabolismo intra e extracelular, porém os receptores de membrana seletivos para a guanosina ainda não foram claramente caracterizados. Alguns efeitos neuroprotetores da guanosina parecem depender da ativação dos receptores de adenosina A_1R e $A_{2A}R$. Nesta tese, foi avaliada (i) a interação da guanosina com oligômeros de receptores de adenosina A_1R - $A_{2A}R$; e (ii) o efeito da guanosina em um modelo animal da doença de Alzheimer. No capítulo I, através da superexpressão heteróloga dos receptores A_1 e A_{2A} em células HEK293, demonstramos que a guanosina não altera a colocalização destes receptores na membrana celular e sua heteromerização, quando avaliada por BRET e complementação de fluorescência. A guanosina não tem efeito *per se*, mas inibe o aumento de Ca^{2+} intracelular induzido por agonista de A_1R (CCPA) em células que expressam A_1R . Em células que expressam $A_1R+A_{2A}R$ guanosina previne o aumento de Ca^{2+} induzido por agonista de A_1R ou de $A_{2A}R$. Guanosina induz aumento de AMPc em células $A_{2A}R$, mas inibe o aumento de AMPc na presença dos agonistas $A_{2A}R$, adenosina e CGS21680. Experimentos de nanoBRET sugerem que a guanosina desloca a ligação do agonista $A_{2A}R$ (APEC) em células que expressam $A_{2A}R$ e oligômeros $A_1R+A_{2A}R$. O efeito neuroprotetor da guanosina, não é observado em um modelo de isquemia *in vitro* realizado em fatias hipocâmpais de camundongos *knock-out* para o $A_{2A}R$. Os resultados sugerem que guanosina pode interferir com a sinalização celular ativada por A_1R e $A_{2A}R$, e na presença de agonistas $A_{2A}R$, guanosina bloqueia a ativação deste receptor. Além disso, o efeito neuroprotetor da guanosina depende da expressão de $A_{2A}R$. No capítulo II desta tese, o efeito neuroprotetor da guanosina foi avaliado em um modelo de toxicidade do peptídeo beta-amiloide ($A\beta_{1-40}$), um modelo animal da doença de Alzheimer. Guanosina administrada logo após a infusão i.c.v do $A\beta_{1-40}$ e durante 14 dias consecutivos reverteu o déficit cognitivo e o comportamento tipo-anedônico induzidos pelo $A\beta_{1-40}$. Guanosina preveniu o aumento na captação de glutamato independente de Na^+ induzido pelo $A\beta_{1-40}$. A análise dos níveis de purinas mostra que $A\beta_{1-40}$ aumentou os níveis de ADP e ATP no hipocampo dos animais, e que o tratamento com guanosina aumentou os níveis de GDP. $A\beta_{1-40}$

reduziu a expressão de GFAP na região CA1 do hipocampo dos camundongos e guanosina não alterou esse efeito. Não foi observada alteração nos níveis de sinaptofisina no hipocampo dos animais. Os resultados obtidos sugerem que guanosina previne alterações cognitivas e no transporte de glutamato induzidas pelo $A\beta_{1-40}$ em camundongos. Esta tese contribuiu para identificar os sítios extracelulares de interação da guanosina e adicionou evidências sobre o efeito neuroprotetor da guanosina.

Palavras-chave: guanosina, receptores de adenosina, oligomerização de receptores, neuroproteção, glutamato, neurotoxicidade, $A\beta_{1-40}$

ABSTRACT

Guanosine, the guanine-based nucleoside, exerts neurotrophic and neuroprotective effects in the Central Nervous System (CNS). A guanine-based purinergic system - or guanosinergic system – has been recently proposed. In this neurotransmitter system some components are known, as nucleosides transporters and enzymes responsible for intra and extracellular metabolism. However, a selective extracellular site for guanosine interaction or guanosine receptor has not yet been clearly characterized. Some of guanosine neuroprotective effects seem to be dependent upon the activation of adenosine A₁ or A_{2A} receptors. In this study, we investigated (i) the possible guanosine interaction with A₁R-A_{2A}R oligomers, and (ii) guanosine neuroprotective effect in an animal model of Alzheimer's disease. Using A₁R and A_{2A}R heterologous expression in HEK193 cells, we showed that guanosine did not alter the colocalization of these receptors at the cellular membrane. Guanosine also did not modify A₁R-A_{2A}R heteromeric formation, evaluated with BRET and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) techniques. Guanosine alone had no effect on intracellular Ca²⁺ signaling, but it inhibited the increase in Ca²⁺ induced by an A₁R agonist (CCPA) in A₁R-cells. In A₁R+A_{2A}R-expressing cells, guanosine prevents Ca²⁺ signaling evoked by A₁R or A_{2A}R agonists. Guanosine increased cAMP levels in A_{2A}R cells, but it inhibited cAMP increase induced by adenosine or CGS21680 (A_{2A}R agonists). NanoBRET experiments suggested that guanosine displaced the binding of an A_{2A}R agonist (APEC), both in A_{2A}R and A_{2A}R+A₁R cells. Guanosine neuroprotective effect in an *in vitro* model of ischemia was not observed in hippocampal slices of A_{2A}R-knockout mice. Data presented here suggest that guanosine can interfere on A₁R and A_{2A}R activated signaling pathways. However, in the presence of an A_{2A}R agonist, guanosine blocks A_{2A}R activation. Furthermore, the neuroprotective effect of guanosine is dependent on A_{2A}R expression. In chapter II, we assessed guanosine neuroprotective effects against amyloid-beta peptide (Aβ₁₋₄₀) intracerebroventricular infusion, an animal model of Alzheimer's disease. Guanosine treatment soon after Aβ₁₋₄₀ i.c.v infusion and once a day during the 14 consecutive days, inhibited the cognitive deficit and the anhedonic-like behavior induced by Aβ₁₋₄₀. Guanosine prevented the impairment in Na⁺-independent glutamate transport induced by Aβ₁₋₄₀. Purines levels analysis showed that Aβ₁₋₄₀ increased ATP and ADP at mice hippocampus, and guanosine increased GDP levels. Aβ₁₋₄₀ infusion decreased GFAP at CA1 hippocampal region, an effect not modified by guanosine. No changes in synaptophysin levels

were observed. Presented data show that guanosine prevents cognitive alterations and the unbalance in glutamate transmission evoked by A β ₁₋₄₀ in mice. Therefore, this thesis has contributed to identify extracellular sites to guanosine action and add information on the neuroprotective effects of guanosine.

Keywords: guanosine, adenosine receptors, receptors oligomerization, glutamate, A β ₁₋₄₀.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo dos derivados da guanina.	29
Figura 2. Representação de uma sinapse no sistema derivado da guanina – ou sistema guanosinérgico.....	30
Figura 3. Representação esquemática da transferência de energia ressonante bioluminescente entre A ₁ R e A _{2A} R.	41
Figura 4. Constructos dos receptores de adenosina fusionados à proteína SNAP e aos <i>splits</i> -SNAP.	47
Figura 5. Ativação dos genes repórteres pelos segundos mensageiros induz à transcrição da enzima luciferase.	49
Figura 6. Constructos dos receptores de adenosina fusionados à enzima Nanoluciferase utilizados no presente estudo.	50
Figura 7. Colocalização na membrana celular dos receptores A ₁ R e A _{2A} R após o tratamento com guanosina.	53
Figura 8. Sinal de BRET entre os receptores A ₁ R e A _{2A} R após tratamento com guanosina.	54
Figura 9. Expressão dos receptores SNAP-A ₁ R, SNAP-A _{2A} R e do oligômero nSNAP-A ₁ R/cSNAP-A _{2A} R em células HEK2893.	55
Figura 10. Efeito do tratamento com guanosina sobre os níveis de Cálcio intracelular quantificado através da expressão do gene repórter NFAT em células HEK293 transfectadas com o receptor A ₁ R (A) ou A ₁ R+A _{2A} R (B).	56
Figura 11. Efeito da guanosina e da toxina Pertussis (PTx) sobre os níveis de Cálcio intracelular quantificado através da expressão do gene repórter NFAT induzido por CCPA e CGS 21680.	58
Figura 12. Efeito do tratamento com guanosina sobre os níveis de AMP cíclico intracelular quantificado através da expressão do gene repórter CRE em células HEK293 transfectadas com o receptor A _{2A} R (A) ou A ₁ R+A _{2A} R (B).	59

Figura 13. Caracterização da luminescência emitida pelos constructos Nanoluc-A ₁ R (A) e Nanoluc-A _{2A} R (B).	60
Figura 14. Efeito do ZM 241385 (A) e da guanosina (B) sobre o nanoBRET entre o agonista APEC ⁶⁴⁷ e o receptor A _{2A} R.	62
Figura 15. Efeito da guanosina sobre a perda de viabilidade celular induzida por PGO em fatias hipocampais de camundongos selvagens (A) e KO-A _{2A} R (B).	63
Figura 16. Esquema de tratamentos utilizados no presente trabalho. ...	84
Figura 17. Imagens do peptídeo Aβ ₁₋₄₀ obtidas em Microscopia Eletrônica de Transmissão.	91
Figura 18. Avaliação da atividade motora de camundongos submetidos à toxicidade induzida pelo peptídeo Aβ ₁₋₄₀ no teste do campo aberto.	92
Figura 19. Efeito da infusão i.c.v. do Aβ ₁₋₄₀ sobre a memória espacial de curto prazo avaliada no teste de realocação de objetos.	93
Figura 20. Efeito da infusão i.c.v. do Aβ ₁₋₄₀ sobre a memória espacial de curto prazo avaliada no labirinto em Y.	94
Figura 21. Efeito da infusão i.c.v. do Aβ ₁₋₄₀ sobre o comportamento de autolimpeza.	95
Figura 22. Efeito da infusão i.c.v. do Aβ ₁₋₄₀ sobre o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda.	96
Figura 23. Efeito do tratamento com Guanosina sobre a captação e liberação de aminoácidos excitatórios no hipocampo de camundongos submetidos à infusão i.c.v. do Aβ ₁₋₄₀	97
Figura 24. Avaliação da expressão de NeuN nas regiões CA3, CA1 e giro denteado (DG) dos hipocampos de camundongos submetidos à infusão i.c.v. de Aβ ₁₋₄₀	98

Figura 25. Avaliação da expressão de GFAP nas regiões CA3, CA1 e giro denteado (DG) dos hipocampos de camundongos submetidos à infusão i.c.v de $A\beta_{1-40}$ 99

Figura 26. Avaliação da expressão de sinaptofisina nas regiões CA3, CA1 e giro denteado (DG) dos hipocampos de camundongos submetidos à infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de IC₅₀ obtidas para ZM241385 e guanosina nas diferentes condições de NanoBRET. 61

Tabela 2. Quantificação por HPLC dos nucleotídeos derivados da Guanina e Adenina e seus metabólitos no hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com guanosina e à infusão i.c.v. de A β ₁₋₄₀. ..103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β ₁₋₄₀	Peptídeo β -amiloide ₁₋₄₀
A ₁ R	Receptor de adenosina do tipo 1
A _{2A} R	Receptor de adenosina do tipo 2A
A _{2B} R	Receptor de adenosina do tipo 2B
A ₃ R	Receptor de adenosina do tipo 3
ACh	Acetilcolina
ADA	Adenosina deaminase
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina-5'-difosfato
Akt (PKB)	Proteína cinase B
AMP	Adenosina-5'-monofosfato
AMPA	Alfa-amino-3'-hidróxi-5'-metilisoxasole-propionato
AMPc	Adenosina-5'-monofosfato cíclico
APP	Proteína precursora amiloide
AQ	Ácido quinolínico
AraC	Citosina arabinofuranosídeo
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BRET	Transferência de Energia Ressonante Bioluminescente
BSA	Albumina de soro bovino
BK	Canal de Potássio de alta condutância dependente de Cálcio
CCPA	2-cloro-N6-ciclopentiladenosina
CGS 21680	Ácido hidrocloreto 4-[2-[[6-Amino-9-(N-etil- β -D-ribofuranuronamidossil)-9H-purino-2-il]amino]etil] benzenopropanoico
CNT	Transportador concentrativo de nucleosídeos
CRE	Elemento responsivo ao AMP cíclico
D2R	Receptor de dopamina subtipo 2
DA	Doença de Alzheimer
DG	Derivados da guanina
DIV	Dias <i>in vitro</i>
DPCPX	8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina
EAAT1-5	Transportador de aminoácidos excitatórios 1-5
EAAC	Carreador de aminoácidos excitatórios
ENT	Transportador equilibrativo de nucleosídeos
ERK 1/2	Cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRET	Transferência de Energia Ressonante Fluorescente

GDP	Guanosina-5'-difosfato
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Transportador de glutamato e aspartato
GLT-1	Transportador glial de glutamato
Glu	Glutamato
GMP	Guanosina-5'-monofosfato
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
GUA	Guanina
GUO	Guanosina
HBSS	Solução tampão de Hank
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
i.c.v.	Via intracerebroventricular
i.p.	Via intraperitoneal
KRB	Tampão Krebs-Ringer
KO-A _{2A} R	Camundongo <i>knock-out</i> A _{2A} R
LPA	Ácido lisofosfatídico
LCE	Líquido cérebro-espinhal
LTP	Potenciação de longo prazo
LPS	Lipopolissacarídeos bacterianos
MAPK p38	Proteína cinase ativada por mitógeno p38
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
mUB	Mili Unidades de BRET
NF-κB	Fator nuclear κB
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NGF	Fator de crescimento neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEI	Poliétilenimina
PGO	Privação de glicose e oxigênio
PI3K	fosfatidilinositol-3-cinase
PNP	Fosforilase de nucleosídeos de purinas
Rluc	<i>Renilla</i> luciferase
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

YFP

ZM 241385

Proteína fluorescente amarela

4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazol-5-ylamino]etil)fenol

SUMÁRIO

1. Introdução	25
1.1 Transmissão Purinérgica	25
1.1.1 Transmissão purinérgica – os derivados da guanina	26
1.1.2 Sistema purinérgico dos derivados da guanina (ou Sistema guanosinérgico)	27
1.2 Efeitos da Guanosina no SNC	30
Capítulo I: Avaliação da interação da guanosina com os receptores de adenosina A₁ e A_{2A} e com o heterômero A₁R+A_{2A}R	35
1. Fundamentação teórica	37
1.1 Identificação do sítio de interação para a guanosina na membrana celular	37
1.2 Interação da guanosina com os receptores de adenosina A ₁ e A _{2A} e com o heterômero A ₁ R+A _{2A} R	39
2. Justificativa	43
3. Objetivos	44
3.1 Objetivos específicos	44
4. Materiais e Métodos	45
4.1 Cultura de células e transfecção	45
4.1.1 Transfecção com PEI	45
4.1.2 Transfecção com Transfectina	45
4.2 Imunocitoquímica	45
4.3 Ensaio de transferência de energia ressonante bioluminescente	46
4.4 Clonagem do <i>split</i> -SNAP fusionado ao receptor A ₁ e complementação dos <i>splits</i> nSNAP-A ₁ R e cSNAP-A _{2A} R	47
4.5 Avaliação do conteúdo intracelular de Ca ²⁺ e AMP cíclico através do uso de genes repórteres	48
4.6 Clonagem de receptores A ₁ e A _{2A} fusionados à enzima Nanoluciferase – ensaio de NanoBRET	50
4.7 Privação de glicose e oxigênio (PGO) em fatias hipocâmpais de camundongos e avaliação da viabilidade celular	52
4.8 Análise estatística	53
5. Resultados	54
5.1 Colocalização de receptores A ₁ e A _{2A} após tratamento com guanosina.....	54
5.2 Sinal de BRET entre os receptores A ₁ e A _{2A} expressos em células HEK293 após tratamento com guanosina	55
5.3 Expressão do oligômero A ₁ R+A _{2A} R na membrana celular após tratamento com guanosina	56

5.4 Avaliação dos níveis intracelulares de Ca ²⁺ e AMP cíclico através do uso de genes repórteres	57
5.5 Aplicação de NanoBRET para investigação da interação da guanosina com os receptores A ₁ e A _{2A}	61
5.6 Ausência de neuroproteção por guanosina em fatias hipocámpais de camundongos que não expressam o receptor A _{2A} (<i>knock-out</i> A _{2A} R) submetidas a um modelo de isquemia <i>in vitro</i>	64
6. Discussão	66
7. Conclusões	71
Apêndice I – Interação entre guanosina e o canal BK – Resultados preliminares.....	73
Capítulo II - Estudo do efeito neuroprotetor da guanosina sobre a toxicidade do peptídeo β-amiloide₁₋₄₀	77
1. Fundamentação teórica	79
1.1 Doença de Alzheimer e o peptídeo β-amiloide	79
1.2 Aβ e a transmissão glutamatérgica	80
1.3 Aβ e guanosina	82
2. Justificativa	84
3. Objetivos	85
3.1 Objetivos específicos	85
4. Materiais e métodos	86
4.1 Preparação do peptídeo β-amiloide ₁₋₄₀	86
4.2 Infusão intracerebroventricular do peptídeo β-amiloide ₁₋₄₀	86
4.3 Protocolo de tratamento	86
4.4 Análises comportamentais	87
4.4.1 <i>Habituação no campo aberto</i>	87
4.4.2 <i>Realocação de objetos</i>	88
4.4.3 <i>Labirinto em Y</i>	88
4.4.4 <i>Teste de borriço de sacarose</i>	89
4.4.5 <i>Teste de suspensão pela cauda</i>	89
4.5 Captação de aminoácidos excitatórios	89
4.6 Liberação de aminoácidos excitatórios	90
4.7 Obtenção de amostras para realização de ensaios de imunoistoquímica	90
4.7.1 <i>Imunoistoquímica de fluorescência</i>	91
4.8 Imunodeteção de proteínas	92
4.9 Quantificação de purinas e metabólitos	92
4.10 Análise estatística	93
5. Resultados	94

5.1 Alterações comportamentais induzidas pela infusão i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos	94
5.2 Efeito do tratamento com guanosina sobre alterações na captação e liberação de aminoácidos excitatórios induzidas pelo peptídeo A β ₁₋₄₀	99
5.3 Avaliação do efeito da guanosina sobre a neurodegeneração induzida pela infusão do peptídeo A β ₁₋₄₀	100
5.4 Avaliação da expressão da proteína glial fibrilar acídica (GFAP) após infusão do peptídeo A β ₁₋₄₀	101
5.5 Avaliação da expressão da proteína sináptica sinaptofisina após infusão do peptídeo A β ₁₋₄₀	103
5.6 Avaliação dos níveis de purinas e metabólitos em hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com guanosina e infusão i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀	105
6. Discussão	107
7. Conclusões	114
Perspectivas	115
Publicações realizadas em colaboração durante o desenvolvimento da Tese	116
Referências	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transmissão Purinérgica

As purinas constituem uma classe de moléculas orgânicas essenciais para as células e são derivadas das bases nitrogenadas adenina e guanina, incluindo os nucleotídeos com um ou mais fosfatos, como adenosina-5'-trifosfato (ATP), adenosina-5'-difosfato (ADP), adenosina-5'-monofosfato (AMP), guanosina-5'-trifosfato (GTP), guanosina-5'-difosfato (GDP), guanosina-5'-monofosfato (GMP), os nucleosídeos adenosina, inosina e guanosina, as bases nitrogenadas adenina, guanina, hipoxantina e seus metabólitos xantina e ácido úrico. Os nucleotídeos purínicos intracelulares foram identificados primeiramente como componentes estruturais dos ácidos nucleicos, mas também têm funções importantes no metabolismo energético, na biossíntese de macromoléculas, na constituição de coenzimas. Além disso, os nucleotídeos cíclicos desempenham papéis como segundos mensageiros (Lippman, 1941).

O papel extracelular das purinas na sinalização celular foi inicialmente reconhecido pelos efeitos das purinas derivadas da adenina em diferentes tipos celulares. Funções biológicas importantes da adenosina foram demonstradas por Drury e Szent-Gyorgyi (1929), que observaram um aumento na liberação de adenosina no meio extracelular após a isquemia cardíaca, promovendo efeito cronotrópico negativo no coração (ou seja, diminuindo a frequência cardíaca) e agindo como vasodilatador das artérias coronárias.

No cérebro, além de agirem como neurotransmissores e neuromoduladores, o ATP e a adenosina também atuam em processos de plasticidade, como aprendizado e memória, brotamento de processos nervosos, regulam o número de células através da indução de apoptose e atuam como agentes neuroprotetores contra estímulos nocivos (Ciccarelli *et al.*, 1999; Schmidt, Lara e Souza, 2007). Os efeitos extracelulares das purinas derivadas da adenina são mediados pelos receptores purinérgicos do tipo P1 ou P2. Os receptores pertencentes à família P2 são receptores de ATP e ADP, e são subdivididos em P2X [receptores ionotrópicos, ou seja, canais iônicos permeáveis a Cálcio (Ca^{2+}), Sódio (Na^+) e Potássio (K^+)] e P2Y (receptores metabotrópicos acoplados às proteínas G) (Burnstock, 2007). Os receptores da família P1 são receptores metabotrópicos para adenosina, e são divididos em quatro subtipos: A_1 , $\text{A}_{2\text{A}}$, $\text{A}_{2\text{B}}$ e A_3 (Fredholm *et al.*, 2005). Os receptores A_1 são acoplados à proteína G_i levando a uma diminuição da atividade da adenilato ciclase e

consequente diminuição nos níveis de AMP cíclico intracelular e são expressos em todo o Sistema Nervoso Central (SNC), enquanto que os receptores A_{2A} são acoplados à proteína Gs, levando ao aumento dos níveis de AMP cíclico. São principalmente expressos no estriado, núcleo accumbens, hipocampo e córtex cerebral. Os receptores A_{2B} também são acoplados à proteína Gs, mas são pouco expressos no cérebro, enquanto os receptores A_3 são moderadamente expressos no cerebelo e hipocampo (Palmer e Stiles, 1995; Burnstock, 2007).

1.1.1 Transmissão Purinérgica

As purinas constituem uma classe de moléculas orgânicas essenciais para as células e são derivadas das bases nitrogenadas adenina e guanina, incluindo os nucleotídeos com um ou mais fosfatos, como adenosina-5'-trifosfato (ATP), adenosina-5'-difosfato (ADP), adenosina-5'-monofosfato (AMP), guanosina-5'-trifosfato (GTP), guanosina-5'-difosfato (GDP), guanosina-5'-monofosfato (GMP), os nucleosídeos adenosina, inosina e guanosina, as bases nitrogenadas adenina, guanina, hipoxantina e seus metabólitos xantina e ácido úrico. Os nucleotídeos purínicos intracelulares foram identificados primeiramente como componentes estruturais dos ácidos nucleicos, mas também têm funções importantes no metabolismo energético, na biossíntese de macromoléculas, na constituição de coenzimas. Além disso, os nucleotídeos cíclicos desempenham papéis como segundos mensageiros (Lippman, 1941).

O papel extracelular das purinas na sinalização celular foi inicialmente reconhecido pelos efeitos das purinas derivadas da adenina em diferentes tipos celulares. Funções biológicas importantes da adenosina foram demonstradas por Drury e Szent-Gyorgyi (1929), que observaram um aumento na liberação de adenosina no meio extracelular após a isquemia cardíaca, promovendo efeito cronotrópico negativo no coração (ou seja, diminuindo a frequência cardíaca) e agindo como vasodilatador das artérias coronárias.

No cérebro, além de agirem como neurotransmissores e neuromoduladores, o ATP e a adenosina também atuam em processos de plasticidade, como aprendizado e memória, brotamento de processos nervosos, regulam o número de células através da indução de apoptose e atuam como agentes neuroprotetores contra estímulos nocivos (Ciccarelli *et al.*, 1999; Schmidt, Lara e Souza, 2007). Os efeitos extracelulares das purinas derivadas da adenina são mediados pelos receptores purinérgicos do tipo P1 ou P2. Os receptores pertencentes à família P2 são receptores

de ATP e ADP, e são subdivididos em P2X [receptores ionotrópicos, ou seja, canais iônicos permeáveis a Cálcio (Ca^{2+}), Sódio (Na^+) e Potássio (K^+)] e P2Y (receptores metabotrópicos acoplados às proteínas G) (Burnstock, 2007). Os receptores da família P1 são receptores metabotrópicos para adenosina, e são divididos em quatro subtipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (Fredholm *et al.*, 2005). Os receptores A_1 são acoplados à proteína G_i levando a uma diminuição da atividade da adenilato ciclase e consequente diminuição nos níveis de AMP cíclico intracelular e são expressos em todo o Sistema Nervoso Central (SNC), enquanto que os receptores A_{2A} são acoplados à proteína G_s , levando ao aumento dos níveis de AMP cíclico. São principalmente expressos no estriado, núcleo accumbens, hipocampo e córtex cerebral. Os receptores A_{2B} também são acoplados à proteína G_s , mas são pouco expressos no cérebro, enquanto os receptores A_3 são moderadamente expressos no cerebelo e hipocampo (Palmer e Stiles, 1995; Burnstock, 2007).

1.1.2 Sistema purinérgico dos derivados da guanina (ou Sistema guanosinérgico)

Estudos demonstram que o GTP pode desempenhar uma possível ação como neurotransmissor. Sua presença foi confirmada em vesículas sinápticas (Wagner, Carlson e Kelly, 1978) e posteriormente foi demonstrada que sua captação para as vesículas depende de um sistema de transporte dependente de gradiente eletroquímico (Santos, Souza e Tasca, 2006), similar ao observado para o transporte de neurotransmissores clássicos.

Tanto neurônios quanto células gliais podem liberar DG em situação fisiológica, e a quantidade de DG liberados por astrócitos em condições basais e após vários tipos de estimulação, incluindo hipóxia/isquemia, é maior que os níveis de derivados da adenina (Ciccarelli *et al.*, 1999). Após a ocorrência de uma lesão cerebral, os nucleotídeos liberados podem ser hidrolisados aos seus respectivos nucleosídeos, que por sua vez desempenham papéis protetores ou mesmo restaurativos. Além disso, evidências indiretas indicam que a guanosina pode ser liberada por neurônios após despolarização (Fredholm *et al.*, 2005).

Os derivados da adenina e da guanina já foram identificados no líquido cerebrospinal (LCE) de animais e humanos (Castro-Gago *et al.*, 1992; Regner *et al.*, 1997), e a presença de nucleotidases solúveis já foi demonstrada no LCE de ratos (Portela *et al.*, 2002). Essas enzimas podem ser liberadas no LCE pelo plexo coroide, pelas células endoteliais e mesmo por células da micróglia, exercendo importante função sobre o

sistema purinérgico em situações fisiológicas e patológicas (Zimmermann, 2001; 2006a; b).

As enzimas envolvidas no metabolismo extracelular dos nucleotídeos incluem as ecto-nucleotidases ligadas à superfície celular, as ecto-nucleotidases liberadas da membrana e as nucleotidases solúveis. As ecto-nucleotidases associadas à superfície celular são também denominadas de ecto-nucleosidases trifosfato (ecto-NTPases) (Zimmermann e Braun, 1996). As ecto-NTPases incluem a ecto-ATPase que hidrolisa ATP e GTP a ADP e GDP, respectivamente; a ecto-ATP-difosfohidrolase ou apirase (ecto-NTPDase), que hidrolisa tanto ATP/GTP ou ADP/GDP a AMP/GMP (Schadeck *et al.*, 1989); e a ecto-5'-nucleotidase que hidrolisa AMP/GMP aos nucleosídeos adenosina/guanosina (Zimmermann, 1996). Em astrócitos em cultura, a inibição da atividade da ecto-5'-nucleotidase reduz significativamente o acúmulo extracelular de guanosina indicando que, assim como a adenosina, a guanosina extracelular também é derivada principalmente da hidrólise extracelular dos nucleotídeos (Schmidt, Lara e Souza, 2007).

Os astrócitos participam de inúmeros processos relacionados a danos cerebrais, isolando a área afetada e atuando no reparo da lesão (Chen e Swanson, 2003). A guanosina e a guanina são ativamente captadas por astrócitos corticais em cultura (Giuliani, Romano, *et al.*, 2012) provavelmente por transporte facilitado, sendo que o transporte da guanina é mais rápido que de guanosina (Nagasawa *et al.*, 2007). A captação dos nucleosídeos é importante para a síntese de ácidos nucleicos e dos nucleotídeos (Rathbone *et al.*, 1999). Esse transporte pode ocorrer principalmente por sistemas de transportadores espécie-específicos identificados na membrana celular de astrócitos e que são sensíveis ao bloqueio por agentes farmacológicos (Peng *et al.*, 2005). Enquanto os sistemas de transporte equilibrativo (ENT) transportam nucleosídeos de maneira bidirecional de acordo com o gradiente de concentração, o transportador concentrativo de nucleosídeos (CNT) permeia o influxo de nucleosídeos acoplado ao gradiente transmembrana de Na^+ .

Os transportadores de nucleosídeos são ferramentas importantes para a via de salvação das purinas, já que o SNC possui pouca capacidade para a síntese *de novo* de purinas (Spector e Johanson, 2007). A via de salvação consiste na síntese de nucleotídeos a partir das bases púricas recuperadas do metabolismo de nucleosídeos. A fosforilase de nucleosídeos de purinas (ou PNP em inglês) catalisa a clivagem da ligação N-glicosídica da guanosina na presença de fosfato inorgânico como segundo substrato, gerando guanina e uma pentose-1-fosfato (Bzowska, Kulikowska e Shugar, 2000). Na via de salvação da guanina, a

fosforibosilação da guanina ocorre pela ação da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT em inglês), gerando novamente GMP (Figura 1).

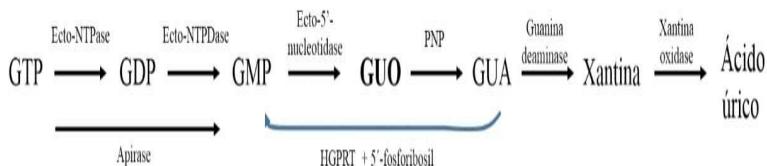


Figura 1. Metabolismo dos derivados da guanina. GTP, GDP e GMP são sequencialmente hidrolisados por ecto-nucleotidasas, gerando guanosina (GUO). GTP/GDP podem ser hidrolisados diretamente a GMP pela ação da apirase. Guanosina é clivada pela PNP (fosforilase de nucleosídeos de purinas) dando origem à guanina (Matheus *et al.*), que por ação da enzima guanina deaminase é convertida à xantina. Xantina, por sua vez, é convertida a ácido úrico por ação da xantina oxidase. A seta azul representa a via de salvaguarda das purinas, onde por ação da enzima HGPRT (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase), guanina é convertida a GMP.

As informações apresentadas sugerem a organização de um sistema de purinas derivadas da guanina com vários papéis importantes no SNC. Foram identificados mecanismos de captação e liberação dos DG, além da caracterização dos metabolismos extra e intracelular. Atenção especial tem sido dada ao efeito biológico da guanosina, pois muitas evidências sugerem que a guanosina é a molécula com atividade biológica dentre os DG (Lanznaster *et al.*, 2016), apesar de ainda não ter sido completamente caracterizado um possível receptor para a guanosina (Figura 2).

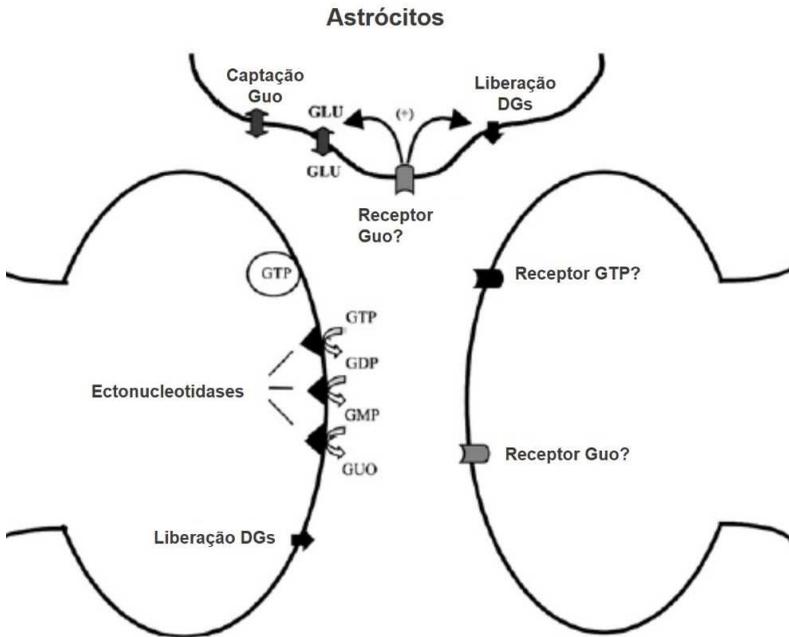


Figura 2. Representação de uma sinapse no sistema purinérgico derivado da guanina – ou sistema guanósinérgico. Os DG podem ser liberados para o meio extracelular principalmente por astrócitos, e metabolizados pelas ectonucleotidasas localizadas na face extracelular da membrana. Os DG e a guanosina podem ser captados para o meio intracelular pelos transportadores de nucleosídeos, onde serão metabolizados de acordo com o esquema da Figura 1. Um possível receptor para os DG ainda não foi completamente caracterizado. Guo: guanosina; DG: derivados da guanina; Glu: glutamato (Adaptado de Schmidt *et al.*, 2007).

2. Efeitos da guanosina no SNC

Muitos estudos já demonstraram o efeito da guanosina em modelos de neurotoxicidade e doenças neurológicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Quando administrada em camundongos, demonstrou-se que a guanosina previne as convulsões e a toxicidade induzida por drogas que superestimulam o sistema glutamatérgico (Schmidt *et al.*, 2000; Lara *et al.*, 2001; Schmidt, Avila e Souza, 2005), além de possuir efeito antinociceptivo, ansiolítico e anticonvulsivante (Vinadé *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2008; Schmidt, Böhmer, *et al.*, 2009). Recentemente, o

efeito tipo-antidepressivo da guanosina também foi demonstrado (Bettio *et al.*, 2012; Bettio *et al.*, 2014).

Estudos *in vitro* mostraram que a guanosina exerce efeito neuroprotetor (Rathbone *et al.*, 2008) estimula a regeneração nervosa (Jiang *et al.*, 2008), reduz os danos induzidos por isquemia (Frizzo *et al.*, 2002; Dal-Cim *et al.*, 2011), e também previne a excitotoxicidade induzida por NMDA (Ciccarelli *et al.*, 2001). Em cultura de células, a guanosina reverte a excitotoxicidade glutamatérgica induzida pela PGO e pelo peptídeo β -amiloide (respectivamente, modelos de isquemia e da doença de Alzheimer) através do aumento da recaptação de glutamato pelos transportadores não-neuronais (D'alimonte *et al.*, 2007; Dal-Cim *et al.*, 2011). Pettifer e colaboradores (2004) também demonstraram que a guanosina é capaz de reduzir a apoptose em células expostas ao peptídeo β -amiloide em cultura de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).

Um importante efeito que tem sido atribuído à guanosina é a sua capacidade de restabelecer alterações no transporte de glutamato, associadas à excitotoxicidade glutamatérgica. Em fatias hipocâmpais, a guanosina recuperou a diminuição na captação de glutamato induzida pela PGO, além de diminuir o aumento na liberação de glutamato observado nesse modelo de isquemia *in vitro* (Dal-Cim *et al.*, 2011; Dal-Cim *et al.*, 2013; Dal-Cim *et al.*, 2016). Uma vez que a recaptação do glutamato por astrócitos é o mecanismo mais importante para o término da ação deste neurotransmissor nas sinapses, a modulação provocada pela guanosina pode ser considerada um processo relevante para a regulação da transmissão glutamatérgica, contribuindo para a proteção de células neuronais contra a excitotoxicidade induzida pelo glutamato (Duan *et al.*, 1999; Chen e Swanson, 2003; Schousboe e Waagepetersen, 2005; Matute, Domercq e Sanchez-Gomez, 2006).

Estudos recentes demonstraram que a guanosina diminui a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida pela PGO em fatias hipocâmpais e previne a perda de potencial de membrana da mitocôndria (Dal-Cim *et al.*, 2013). Em um protocolo de indução de estresse oxidativo através do bloqueio dos complexos I e V da cadeia respiratória em células SH-SY5Y, a guanosina induziu efeito protetor através da indução da heme-oxigenase-1, uma enzima importante na defesa celular antioxidante (Dal-Cim *et al.*, 2012). A heme-oxigenase-1 também está envolvida na proteção induzida pela guanosina contra o estresse oxidativo e o aumento de citocinas pró-inflamatórias induzidos pelo tratamento com azida (um inibidor do complexo IV da cadeia respiratória) em células astrogliais C6 (Quincozes-Santos *et al.*, 2014). Além disso, um estudo recente demonstrou que a guanosina reduz a

inflamação e dano oxidativo induzido pela incubação com lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) em cultura de astrócitos hipocâmpais, diminuindo os níveis de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e fator nuclear κ B (NF- κ B) pela indução da heme-oxigenase-1 (Bellaver *et al.*, 2015).

Além dos efeitos neuroprotetores mencionados anteriormente, o efeito neurotrófico da guanosina também já foi demonstrado. A guanosina promove efeito trófico em cultura de astrócitos (Cicarelli *et al.*, 2001) e em coculturas de neurônios e astrócitos cerebelares (Decker *et al.*, 2007). O efeito trófico da guanosina também parece envolver a heme-oxigenase-1, pois o tratamento de feocromocitomas (PC12) com guanosina e o fator de crescimento neuronal (NGF) promoveu o crescimento de neuritos através da indução da heme-oxigenase-1 (Bau *et al.*, 2005).

Além das vias anti-inflamatórias, vários estudos já demonstraram a participação da via de sinalização da fosfo-inositol-5-cinase (PI3K) nos efeitos biológicos da guanosina, uma via que atua na neuroproteção (Decker *et al.*, 2007; Bettio *et al.*, 2012; Dal-Cim *et al.*, 2012). Como citado anteriormente, a guanosina é capaz de induzir um aumento na captação de glutamato, sendo este efeito dependente da via de sinalização intracelular modulada pela PI3K/Akt (proteína cinase B) (Dal-Cim *et al.*, 2011). Além disso, o efeito anti-apoptótico da guanosina em cultura de células SH-SY5Y submetida à incubação com o peptídeo β -amiloide também envolve a ativação das vias PI3K/Akt, MAPK p38 (proteína cinase ativada por mitógeno p38) e ERK1/2 (cinase regulada por sinal extracelular 1/2) (Pettifer *et al.*, 2004).

Como demonstrado anteriormente, tem sido proposto um sistema purinérgico derivado da guanina – ou sistema guanosinérgico – onde a guanosina seria a molécula com principal atividade biológica. Apesar de todas as evidências de neuroproteção induzida pela guanosina mencionadas aqui, o exato sítio de ação da guanosina ainda não está elucidado e os possíveis sítios de interação da guanosina com receptores nas membranas celulares estão pouco caracterizados (Tasca, Cardoso e Souza, 1999; Traversa *et al.*, 2002; Traversa *et al.*, 2003).

Diante do exposto, essa Tese dividiu-se em dois objetivos principais, organizados em capítulos: no Capítulo I está apresentada a investigação dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A} e em sua forma oligomérica como um possível sítio de interação da guanosina. A participação destes receptores no efeito neuroprotetor da guanosina também será abordada neste Capítulo.

O Capítulo II compreende o estudo do possível efeito neuroprotetor da guanosina frente a um modelo de toxicidade induzida

pelo peptídeo β -amiloide em camundongos, um modelo animal da Doença de Alzheimer.

Cada capítulo contém uma breve introdução ao tema a que se refere, os objetivos estabelecidos, materiais e métodos utilizados para desenvolvimento dos objetivos, os resultados encontrados e a discussão, relacionada à interpretação dos resultados obtidos. Segue-se uma Conclusão dos principais achados do capítulo.

Capítulo I
Avaliação da interação da guanosina com os receptores de adenosina A₁ e A_{2A} e com o heterômero A₁R+A_{2A}R

Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Neuroquímica 4 no Departamento de Bioquímica da UFSC e no laboratório de Farmacologia e Dor na Universidade de Barcelona, sob supervisão do professor Dr. Francisco Ciruela, durante o desenvolvimento de estágio de doutorado-sanduíche pelo período de março/2013 a fevereiro/2014, financiado pelo projeto Pesquisador Visitante Especial (CAPES/PVE 052/2012), e de março a julho/2015 em estágio financiado pelo CNPq (SWE 2014/03). Os resultados obtidos neste capítulo estão sendo organizados para submissão ao periódico Journal of Biological Chemistry.

1. Fundamentação teórica

1.1 Identificação do sítio de interação para a guanosina na membrana celular

Apesar de todas as evidências de neuroproteção induzida pela guanosina expostas anteriormente, o exato sítio de ação da guanosina ainda não está elucidado e os possíveis sítios de interação da guanosina com receptores nas membranas celulares estão pouco caracterizados (Tasca, Cardoso e Souza, 1999; Traversa *et al.*, 2002). Além disso, a maioria dos efeitos tróficos dos DG não são afetados por inibidores da captação de nucleosídeos, indicando que eles são independentes de internalização ou que são dependentes de interações com alvos extracelulares (Gysbers e Rathbone, 1992).

Vários estudos já demonstraram que os DG, inclusive a guanosina, modulam o sistema glutamatérgico. De fato, demonstrou-se que os nucleotídeos GTP, GDP e GMP podem se ligar aos sítios ricos em glicina presentes na região N-terminal extracelular dos receptores de glutamato, deslocando a interação do glutamato com seus receptores e inibindo as respostas intracelulares induzidas pelo glutamato (Paas *et al.*, 1996; Tasca, Cardoso e Souza, 1999). No entanto, a guanosina diminuiu em apenas 23% a ligação do glutamato aos receptores glutamatérgicos, não sendo capaz de deslocar os agonistas AMPA do seu sítio de interação (Souza e Ramirez, 1991; Porciuncula *et al.*, 2002). Estudos prévios demonstraram o efeito da guanosina sobre o transporte de glutamato (Dal-Cim *et al.*, 2013; Dal-Cim *et al.*, 2016), porém ainda não há evidência de interação direta da guanosina com os transportadores de glutamato.

Os primeiros estudos que investigaram o sítio de ação da guanosina na membrana celular foram realizados em membranas isoladas obtidas de cérebro de ratos, demonstrando sítios seletivos para ligação da guanosina (Traversa *et al.*, 2002; Traversa *et al.*, 2003). A incubação das membranas com [³H]guanosina levou à identificação de sítios de alta afinidade para a guanosina, com constantes de associação e dissociação similares às observadas na ligação de compostos naturais aos seus receptores endógenos. Outras purinas derivadas da guanina e metabólitos da guanosina não deslocaram a [³H]guanosina do seu sítio de interação, assim como a adenosina e os antagonistas não-seletivos dos receptores de adenosina, cafeína e teofilina. O efeito de inibidores dos sistemas de transporte de purinas também foi investigado, já que a guanosina poderia interagir com esses sistemas. O inibidor do sistema equilibrativo de

nucleosídeos nitrobenziltioinosina demonstrou um pequeno deslocamento, mas não significativo (cerca de 30%), porém o inibidor do transporte de nucleosídeos nitrobenziltioguanosina e o inibidor da recaptação de adenosina propentofilina não tiveram nenhum efeito sobre a interação da guanosina. A incubação das membranas com a toxina Pertussis (PTx), um inibidor da família das proteínas G inibitórias (Gi), reduziu a ligação da guanosina em 45% (Traversa *et al.*, 2003), sugerindo que este sítio de interação da guanosina seria um receptor da grande família dos receptores acoplados às proteínas G (GPCR). Em outro estudo, utilizando um ensaio de ligação de GTP à proteína G, confirmou-se que o sítio de interação para a guanosina é um GPCR diferente dos conhecidos receptores de adenosina, já que os agonistas dos receptores de adenosina não tiveram nenhum efeito sobre a ligação da guanosina (Volpini *et al.*, 2011).

Recentemente, o receptor GPR23 foi considerado como possível candidato ao receptor de guanosina. O GPR23 é um receptor para o ácido lisofosfatídico (LPA), identificado como LPA4. O silenciamento gênico do GPR23 em cultura de glioma U87 diminuiu o efeito da guanosina em inibir a proliferação celular, enquanto que sua superexpressão aumentou o efeito anti-proliferativo da guanosina (Di Liberto *et al.*, 2012). Outro estudo deste grupo de pesquisa demonstrou que o córtex cerebral possui a maior expressão de GPR23 e também a maior ligação de [³H]guanosina entre as estruturas testadas (córtex, hipocampo, estriado e medula espinhal) (Grillo *et al.*, 2012). Porém, a interação direta da guanosina com este receptor ainda não foi demonstrada, não descartando a possibilidade de que a guanosina interaja com outras proteínas de membrana.

Além da possível interação com GPCRs, foi demonstrado que o tratamento com guanosina em astrócitos aumenta a atividade e expressão de canais de K⁺ retificadores (Benfenati *et al.*, 2006). Nosso grupo de pesquisa evidenciou que o efeito protetor da guanosina depende da ativação de canais de potássio (K⁺) (Oleskovicz *et al.*, 2008). O uso de bloqueadores farmacológicos de diferentes canais de K⁺ sugeriu uma interação da guanosina com o canal de K⁺ de alta condutância e dependente de Ca⁺ (maxiK ou BK), pois o bloqueio destes canais abole os efeitos benéficos da guanosina sobre a redução da viabilidade celular e captação de glutamato induzidas pela isquemia *in vitro* (Oleskovicz *et al.*, 2008; Dal-Cim *et al.*, 2011). Em células SH-SY5Y, o bloqueio dos canais BK inibe o efeito da guanosina em prevenir o estresse oxidativo induzido pelo bloqueio da cadeia respiratória mitocondrial (Dal-Cim *et al.*, 2012). Além disso, ensaios de eletrofisiologia realizados em células HEK293 transfectadas com a subunidade funcional do canal BK mostram

que a guanosina aumenta a condutância deste canal, efeito que não foi observado em células transfectadas com a subunidade funcional do canal SK (canais de K^+ de baixa condutância dependentes de Ca^{2+}) (Tasca *et al.*, 2013). Esses resultados indicam uma possível interação direta da guanosina com o canal BK. Resultados preliminares sobre o efeito da guanosina em células HEK293 que expressam o canal BK de forma estável foram desenvolvidos durante esta Tese e estão apresentados no Apêndice I ao final deste capítulo.

1.2 Interação da guanosina com os receptores de adenosina A_1 e A_{2A} e com o heterômero $A_1R+A_{2A}R$

Apesar do estudo de Volpini e colaboradores (2011) sugerir que a guanosina interage com um GPCR diferente dos conhecidos receptores de adenosina, muitos estudos demonstram uma participação dos receptores de adenosina nos efeitos da guanosina. Por exemplo, o efeito trófico da guanosina em cultura de neurônios cerebelares em aumentar a adesão e sobrevivência neuronal foi bloqueado pelo antagonista do receptor de adenosina do subtipo A_{2A} ($A_{2A}R$), ZM241385 (4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol; (Tasca *et al.*, 2010). Em cultura de neuroblastoma SH-SY5Y, o efeito protetor da guanosina contra o estresse oxidativo mitocondrial foi abolido pelos antagonistas dos receptores do subtipo A_1 (A_1R) e $A_{2A}R$, DPCPX (8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina) e ZM241385, respectivamente. Em estudo avaliando o efeito neuroprotetor da guanosina em fatias hipocâmpais submetidas à PGO, foi observado que o bloqueio de A_1R com o antagonista DPCPX reverteu o efeito da guanosina em diminuir a produção de EROs e manter o potencial de membrana mitocondrial, porém não teve efeito sobre a captação de glutamato recuperada pela guanosina. Por outro lado, o efeito da guanosina sobre a captação de glutamato foi bloqueado pela PTx e pela ativação do $A_{2A}R$ com seu agonista sintético CGS21680 (Dal-Cim *et al.*, 2013). Dados obtidos em nosso laboratório sugerem que em cultura de astrócitos, a inibição do A_1R e ativação do $A_{2A}R$ também bloqueiam o efeito da guanosina em reestabelecer a captação de glutamato alterada pela PGO (Dal-Cim, comunicação pessoal). Desta forma, este efeito da guanosina parece depender de um GPCR e de uma interação antagônica entre os receptores de adenosina, A_1R e $A_{2A}R$.

Estudos demonstraram que a guanosina induz liberação de adenosina (Rathbone *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2013), e isso poderia induzir a ativação dos receptores de adenosina. De fato, a liberação de

adenosina parece ser parcialmente responsável pelo efeito mitogênico da guanosina, pois a adição de adenosina desaminase (ADA, a enzima que metaboliza adenosina em inosina) no meio reduz parcialmente o efeito da guanosina, enquanto um inibidor da ADA potencializa o efeito mitogênico da guanosina (Ciccarelli *et al.*, 2000). No entanto, o efeito trófico da guanosina também foi observado na presença de dipiridamole, um inibidor de transporte de nucleosídeos (Decker *et al.*, 2007; Tasca *et al.*, 2010), e nesta situação é pouco provável que ocorra liberação de adenosina. Mesmo assim, os antagonistas dos receptores de adenosina bloquearam o efeito trófico da guanosina, sugerindo uma interação da guanosina com estes receptores de forma independente da presença de adenosina extracelular.

Dos receptores de adenosina conhecidos, os receptores A_1 e A_{2A} são os principais responsáveis pelos efeitos centrais da adenosina (Dunwiddie e Masino, 2001), e são encontrados tanto nos terminais pré-sinápticos quanto pós-sinápticos em diferentes regiões do cérebro. A estimulação do A_1R pré-sináptico diminui a excitabilidade neuronal e a atividade sináptica, além de diminuir a probabilidade de liberação de neurotransmissores como o glutamato, dopamina, serotonina, noradrenalina e acetilcolina. O $A_{2A}R$ é um receptor excitatório e está expresso principalmente em regiões dopaminérgicas, como o núcleo estriado, além do hipocampo e córtex cerebral.

Alguns estudos prévios demonstraram evidências de uma interação antagonista entre os dois receptores, ao modular a liberação de glutamato no estriado e hipocampo (O'kane e Stone, 1998; Lopes *et al.*, 2002; Quarta *et al.*, 2004). O conceito de que GPCRs podem interagir na membrana plasmática, formando oligômeros de receptores (antigamente denominado mosaico de receptores) foi inicialmente postulado por Luigi Agnati e Kwell Fuxe nos anos 80 (Agnati *et al.*, 1980; Fuxe *et al.*, 1983). Os receptores de adenosina podem formar oligômeros entre si e com receptores para outros neurotransmissores, como receptores de dopamina (Agnati *et al.*, 2005; Fuxe *et al.*, 2013). Ciruela e colaboradores (2006) demonstraram a existência de heterômeros (oligômeros de receptores distintos) $A_1R+A_{2A}R$ após superexpressão por transfecção heteróloga em culturas de células e também em tecido nativo, nos terminais estriatais glutamatérgicos. Utilizando ensaios de BRET (sigla de *bioluminescence resonance energy transfer*, em inglês), o estudo demonstrou um sinal de BRET positivo e saturante entre os receptores $A_{2A}R$ -Rluc (receptor A_{2A} fusionado à enzima *Renilla luciferase*) e A_1R -YFP (receptor A_1 fusionado à *Yellow fluorescent protein*), em células HEK293 cotransfectadas com uma quantidade constante de $A_{2A}R$ -Rluc (enzima doadora de energia após

adição do substrato Coelenterazina) e quantidades crescentes da molécula aceptora A₁R-YFP. Essa transferência de energia ocorre somente quando as proteínas aceptora e doadora estão separadas em distância até 10 nm, sugerindo uma interação física entre os receptores. As metodologias de transferência de energia ressonante (RET) de bioluminescência ou fluorescência (FRET) constituem uma ferramenta importante para a identificação e caracterização de interação proteína-proteína na membrana celular de células vivas (Kaczor e Selent, 2011; Fernandez-Duenas *et al.*, 2012).

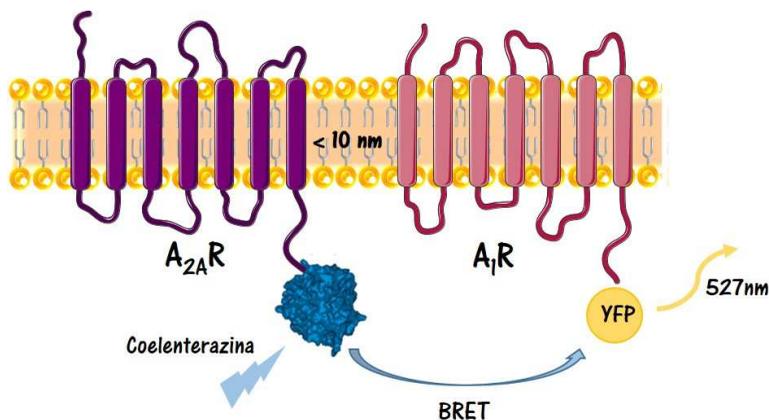


Figura 3. Representação esquemática da transferência de energia ressonante bioluminescente entre A₁R e A₂AR. A energia bioluminescente gerada pela metabolização da Coelenterazina pela luciferase (proteína azul) fusionada ao receptor A_{2A} excita a proteína YFP fusionada ao receptor A₁ quando estes receptores estão distanciados a menos de 10 nm. Representação criada com imagens disponíveis em www.servier.com/Powerpoint-image-bank.

Vários estudos suportam a evidência de que após heteromerização (ou seja, formação de oligômeros heterogêneos entre distintos receptores de membrana), a farmacologia dos receptores formadores do oligômero pode sofrer alteração (Franco *et al.*, 2008). Este evento também ocorre no heterômero de receptores A₁R+A₂AR, pois quando cotransfectados, a afinidade do A₂AR pelo antagonista não-seletivo cafeína diminui em doze vezes em relação à afinidade do A₂AR pela cafeína quando expresso sozinho (Ciruela *et al.*, 2006). Porém, quando o A₂AR forma um heterômero com o receptor de dopamina D₂ (D₂R), a afinidade do A₂AR para a cafeína e para o CGS21680 (agonista seletivo do A₂AR) não se altera (Canals *et al.*, 2003). Uma característica

da interação do heterômero A_1R+A_2AR é que a ativação do A_2AR pode diminuir a afinidade dos ligantes pelo A_1R , sugerindo um mecanismo de controle onde baixos níveis de adenosina inibem a liberação de glutamato através de interação com A_1R e altos níveis induzem a liberação deste neurotransmissor no estriado, através de modulação de A_2AR (Ciruela *et al.*, 2006). No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar como o oligômero A_1R+A_2AR sinaliza em resposta a diferentes ligantes, principalmente em relação a possíveis ligantes endógenos.

2. Justificativa

A guanosina é uma molécula com reconhecido efeito neuroprotetor em modelos *in vitro* e *in vivo* (Lanznaster *et al.*, 2016). Apesar de modular o sistema glutamatérgico, a guanosina parece não interagir diretamente com os receptores glutamatérgicos (Souza e Ramirez, 1991; Paas *et al.*, 1996; Tasca, Cardoso e Souza, 1999). Enquanto a participação dos receptores de adenosina já foi demonstrada no que se refere ao seu efeito neuroprotetor (Dal-Cim *et al.*, 2013), a guanosina não parece deslocar os agonistas dos receptores de adenosina dos seus sítios de interação (Traversa *et al.*, 2002; Traversa *et al.*, 2003). Porém, os receptores A_1 e A_{2A} formam heterômeros funcionais, e essa interação pode alterar a farmacologia dos receptores individuais. Considerando que o sítio de interação da guanosina na membrana celular ainda não foi identificado, a investigação da possível modulação do heterômero $A_1R+A_{2A}R$ pela guanosina representa uma perspectiva interessante na identificação do possível sítio de interação da guanosina na membrana celular.

3. Objetivos

O objetivo deste capítulo foi investigar a possível interação da guanosina com os receptores A_1 e A_{2A} e possivelmente com o heterômero $A_1R+A_{2A}R$, além de investigar o papel do receptor A_{2A} no efeito neuroprotetor da guanosina.

3.1 Objetivos específicos

1. Determinar a distribuição celular dos receptores A_1 e A_{2A} expressos por transfecção heteróloga em células HEK293 após tratamento com guanosina;
2. Avaliar se o tratamento com guanosina altera a interação entre A_1R e $A_{2A}R$ cotransfectados em células HEK293;
3. Investigar a interação da guanosina com o oligômero $A_1R+A_{2A}R$ em células HEK293;
4. Avaliar o efeito da guanosina sobre os níveis de mensageiros intracelulares (AMP cíclico e Ca^{+2}) em células HEK293 transfectadas com A_1R e $A_{2A}R$;
5. Determinar o efeito neuroprotetor da guanosina em fatias de hipocampo oriundas de animais que não expressam o $A_{2A}R$.

4. Materiais e Métodos

4.1 Cultura de células e transfecção

Células HEK293 (*human embrionary kidney cells 293*) foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado com 5% soro fetal bovino, 1% antibiótico/antimicótico e 1% aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich), a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂. As células foram transfectadas após alcançarem 80% de confluência, utilizando PEI (PolyEthylenimine, Polysciences Inc, EUA) ou Transfectina (Bio-Rad, EUA) como agentes de transfecção. Antes da transfecção, os plasmídeos foram incubados por 5 min a 50 °C.

4.1.1 Transfecção com PEI

PEI (14,5 µL) foi diluído em 35,5 µL de NaCl 150 mM, enquanto os plasmídeos (3 µL) foram diluídos em 47 µL de NaCl 150 mM. As duas soluções (PEI e cDNA) foram unidas no mesmo frasco durante 30 min a temperatura ambiente, para formação dos complexos PEI-cDNA. Após, 100 µL da solução PEI-plasmídeos foram adicionadas às células (100 µL para cada 1×10^6 células, mantidas em 900 µL de DMEM). Após 4h, o meio das células foi repostado por apenas DMEM.

4.1.2 Transfecção com Transfectina

Os cDNAs (4 µL) foram diluídos em 250 µL de DMEM, enquanto 4 µL de Transfectina foram diluídos em 250 µL de DMEM. As soluções de plasmídeos e Transfectina foram unidas por 20 min a temperatura ambiente para formação dos complexos Transfectina-plasmídeos. 500 µL da solução Transfectina-plasmídeos foram adicionados às células ($2,5 \times 10^5$ células mantidas em 1,5 mL de DMEM sem soro).

4.2 Imunocitoquímica

Células HEK293 foram plaqueadas (2×10^5 células/poço) em lamínulas de vidro previamente tratadas com poli-L-ornitina (0,1 mg/mL), e transfectadas transientemente com plasmídeos codificantes para os receptores A₁ e A_{2A}. Após 36h, as células foram tratadas com

guanosina (100 μ M) ou DMEM sem soro (grupo controle) por 2h, lavadas com PBS 0,1 M (0,15 M NaCl, 0,1 M Na_2HPO_4 , 0,1 M NaH_2PO_4) e fixadas em paraformaldeído 4% durante 20 min. Após três lavagens com PBS 0,1 M, as células foram permeabilizadas com PBS 0,1 M/ Triton 0,2% durante 10 min e lavadas novamente. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com solução PBS 0,1 M/ BSA 5% durante 60 min, seguido de lavagem com PBS 0,1 M/ Triton 0,2% durante 10 min. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários anti- A_1R (1:100, obtido em coelhos; Sigma-Aldrich) e anti- $A_{2A}R$ (1:100, obtido em camundongos; Sigma-Aldrich) diluídos em PBS 0,1 M/ Triton 0,2% por aproximadamente 16 h (4° C), lavadas com PBS 0,1 M/ Triton 0,2%, e incubadas com anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo (1:100) durante 2 h a temperatura ambiente. As lâminas foram montadas sobre lâminas utilizando Vectashield® (Vector Laboratories, Inc.), e as imagens adquiridas em microscópio confocal de fluorescência Olympus Fluoview 500.

4.3 Ensaio de transferência de energia ressonante bioluminescente

Os receptores de adenosina A_1 e A_{2A} foram subclonados “in frame” respectivamente, com as proteínas YFP (yellow fluorescent protein) e *Rluc* (*Renilla* luciferase), conforme descrito anteriormente (Ciruela *et al.*, 2006). Vinte e quatro horas após serem plaqueadas, as células HEK293 foram transfectadas transitoriamente com quantidades constantes (0,5 μ g) do plasmídeo que codifica $A_{2A}R^{Rluc}$ e quantidades crescentes (0,25-3,5 μ g) do plasmídeo para A_1R^{YFP} . Para manter a mesma quantidade de cDNA entre cada condição, as células foram transfectadas com o vetor vazio (pcDNA3), completando 4 μ g de cDNA por condição. No dia seguinte, as células foram suspensas com Accutase (Sigma-Aldrich), centrifugadas (5 min, 1100 rpm) ressuspensas em DMEM completo, e plaqueadas na concentração $1,2 \times 10^5$ células/poço em placas negras de fundo transparente e placas brancas com 96 poços (Corning), previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) para aumentar a adesão celular. No dia do experimento, as células foram tratadas com Adenosina deaminase (ADA; 0,5 U/mL em DMEM sem soro) para remover a adenosina endógena. Após 2h, a solução de ADA foi retirada dos poços, e as células foram incubadas com DMEM sem soro (grupo controle), guanosina (100 μ M), adenosina (100 μ M) ou uma solução contendo guanosina e adenosina (100 μ M cada) durante 2 h, em duplicatas. A seguir, os meios de incubação foram retirados e 90 μ L de

HBSS foi adicionado aos poços. Para medição de BRET, 10 μL do substrato para a luciferase, h-Coelenterazina (concentração final 5 μM) foram adicionados aos poços da placa branca, e as medições obtidas 1 e 10 min após em leitor de placa POLARstar Optima (BMG Labtechnologies, Alemanha), permitindo a integração sequencial dos sinais detectados com dois filtros: 475 nm (30 nm bandwidth) para a luminescência emitida pela luciferase e 535 (30 nm bandwidth) para a fluorescência emitida pela YFP após ser excitada pela luminescência emitida pela luciferase. O sinal total da YFP foi obtido com excitação a 488 nm e emissão a 535 nm, em placa negra. O sinal de BRET foi calculado de acordo com a fórmula: $\text{BRET} = \text{Taxa}/\text{YFP}/\text{Lum total}$, onde: a Taxa é o sinal integrado obtido a 535 nm dividido pelo sinal obtido a 475 nm; YFP é o sinal total obtido em placa negra, e corresponde à expressão total de YFP; Lum é a luminescência obtida após 10 min e corresponde à expressão total de *Rluc*.

4.4 Clonagem do split-SNAP fusionado ao receptor A_1 e complementação dos splits *nSNAP-A₁R* e *cSNAP-A_{2A}R*

Os constructos foram obtidos de acordo com Mie e colaboradores (Mie *et al.*, 2012). A proteína SNAP-tag foi dividida entre os aminoácidos 91 e 92, resultando em fragmentos N- e C- terminais (*nSNAP* e *cSNAP*, respectivamente). Os fragmentos de DNA codificantes para *nSNAP* e *cSNAP* foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) desde o cDNA SNAP- A_1R usando os *primers* FEcoN/RXhoN (N-terminal) e FBamC/RXhoC (C-terminal), e inseridos no plasmídeo SNAP- A_1R após a digestão do SNAP com EcoRI e XhoC. O constructo *cSNAP-A_{2A}R* foi fornecido pelo Dr. Francisco Ciruela (Universitat de Barcelona, Espanha). A complementação da proteína foi confirmada após visualização em microscópio de fluorescência na combinação *nSNAP-A₁R* e *cSNAP-A_{2A}R*, restaurando a fluorescência após coloração com SNAP⁴⁸⁸ *Cell surface* (New England BioLabs, Inc.).

Para os experimentos, células HEK293 (5×10^6 células/poço) foram transfectadas com 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (utilizando PEI como agente de transfecção) dos plasmídeos *nSNAP-A₁R* e *cSNAP-A_{2A}R*, e plaqueadas em placas negras de fundo transparente com 96 poços previamente tratados com poli-L-lisina. Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram tratadas com ADA (0,5 U/mL em DMEM sem soro). Após 2 h, a solução de ADA foi retirada e as células foram incubadas com soluções contendo adenosina (100 μM), guanosina (100 μM) ou adenosina e guanosina (100 μM cada) durante 2 h. Durante todo o

experimento, as células foram mantidas a 37° C (5% CO₂). O corante SNAP⁴⁸⁸ *Cell surface* foi utilizado para visualizar a complementação. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovert 40 CFL, sistema de captura AxioCam MRc). Células transfectadas com as mesmas concentrações dos plasmídeos codificantes para SNAP-A₁R e SNAP-A_{2A}R foram utilizadas como controle de expressão dos receptores na membrana.

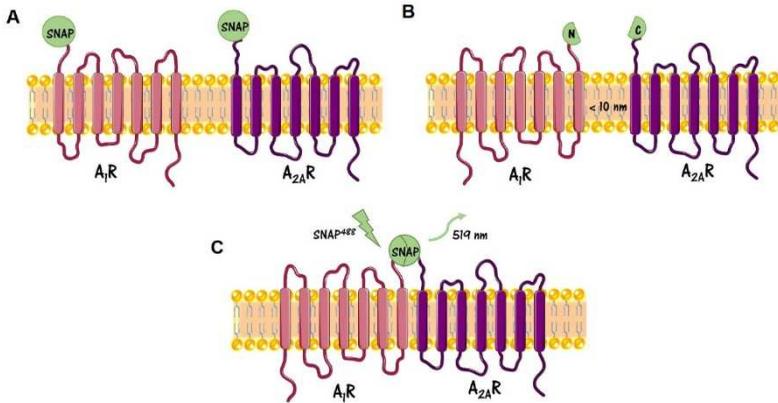


Figura 4. Constructos dos receptores de adenosina fusionados à proteína SNAP e aos *splits*-SNAP. A: proteínas SNAP inteiras fusionadas aos receptores A₁ e A_{2A}; B: *splits* nSNAP-A₁R e cSNAP-A_{2A}R; C: a complementação dos *splits*-SNAP ocorre quando os receptores A₁ e A_{2A} formam um heterômero. Figuras criadas com imagens encontradas em www.servier.com/Powerpoint-image-bank.

4.5 Avaliação do conteúdo intracelular de Ca²⁺ e AMP cíclico através do uso de genes repórteres

A avaliação indireta dos níveis intracelulares de Ca²⁺ e AMP cíclico (AMPc) foi realizada através do uso dos genes repórteres NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*, em inglês) e CRE (*AMPc responsive element*, em inglês), respectivamente (Garcia-Negredo *et al.*, 2014; Gandia *et al.*, 2015). Células HEK293 foram transfectadas com 1,5 µg dos plasmídeos codificadores para os genes repórteres seguidos da enzima luciferase (plasmídeos pGL4-NFAT-luc2p ou pGL4-CRE-luc2p; Promega, Suécia) e 1,5 µg de A₁R^{YFP}, A_{2A}R^{CFP} (do inglês, *cyan fluorescent protein*) e/ou pcDNA₃ (vetor vazio utilizado para equilibrar as quantidades de cDNA entre as condições de transfecção). Aproximadamente 36 h e 48 h após a transfecção (para NFAT e CRE,

respectivamente), as células foram tratadas com ADA (0,5 U/mL) por 2 h e em seguida tratadas com o agonista A₁R 2-cloro-N⁶-ciclo-pentiladenosina (CCPA; 10 nM - 1 μM), com o agonista A_{2A}R CGS 21680 (200 nM), adenosina (100 μM) e/ou guanosina (100 μM). Os ligantes foram incubados por 16h nas células transfectadas com NFAT, ou 3h para as células transfectadas com CRE. Quando presente, a PTx (0,2 μg/mL) foi incubada previamente (1 h) à incubação com ADA. Após a incubação com os ligantes, as células foram ressuspensas no próprio meio, centrifugadas (10 min a 1.000 g) e o sedimento ressuspense em 200 μL de HBSS. As células foram novamente centrifugadas (10 min a 1.000 g) e o sedimento final foi ressuspense em 200 μL de HBSS. Uma alíquota foi utilizada para quantificação de proteínas (método de Peterson, (Peterson, 1977), e as amostras foram normalizadas a uma concentração final de 0,5 mg/mL de proteína. Para mensuração da atividade da luciferase, 25 μL de amostra foram transferidos (em duplicata) a placas brancas de 96 poços, e 25 μL de Bright-Glo® (Promega) foram adicionados às amostras. A luminescência total emitida foi quantificada no leitor de placas Multileitora Infinite 200 (TECAN). A fluorescência emitida pela YFP (excitação: 510 nm; emissão: 530 nm) e pela CFP (excitação: 430 nm; emissão: 475 nm) foi quantificada em placas negras (25 μL de amostra, em duplicatas). Os resultados são apresentados como a razão entre luminescência e fluorescência da YFP (para os dados relativos aos NFAT) ou CFP (dados relativos ao CRE).

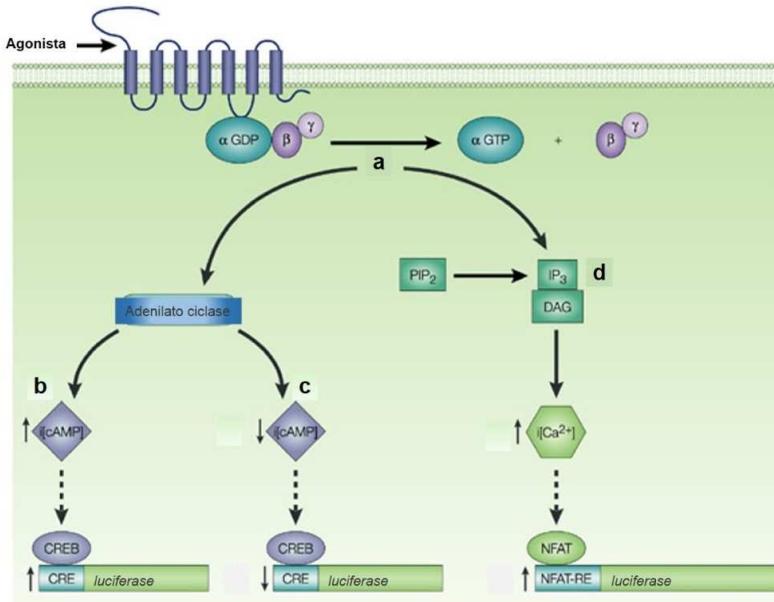


Figura 5. Ativação dos genes repórteres pelos segundos mensageiros induz à transcrição da enzima luciferase. A interação do agonista com o receptor acoplado à proteína G induz à dissociação do trîmero que compõe a proteína G (a). Se a proteína G associada for uma G_s, ocorre a ativação da adenilato ciclase, induzindo um aumento na produção de AMPc que ativa o fator de transcrição CRE, sinaliza ao aumento da transcrição do gene repórter CRE e consequentemente da enzima luciferase (b). No caso de a proteína G associada por uma G_i, ocorre inibição da atividade da adenilato ciclase e consequente diminuição nos níveis de AMPc, que através do fator de transcrição CRE, diminui a expressão do gene repórter CRE e da luciferase (c). A ativação da via IP₃-DAG (d) por uma proteína G_q induz ao aumento dos níveis de Ca²⁺, ativação do fator de transcrição NFAT e da transcrição do gene repórter NFAT-RE, acompanhada da transcrição da enzima luciferase. Imagem adaptada de Williams, 2004.

4.6 Clonagem de receptores A₁ e A_{2A} fusionados à enzima Nanoluciferase – ensaio de NanoBRET.

Os cDNA humanos para os receptores A₁R e A_{2A}R foram amplificados e clonados no vetor pNFL-1secN (Promega; Estocolmo, Suíça) utilizando as enzimas de restrição XbaI e NotI. Os vetores resultantes codificavam a sequência secretória da IL-6 fusionada à porção N terminal da enzima Nanoluciferase seguida dos receptores de adenosina

A₁R ou A_{2A}R. A clonagem foi confirmada através do sequenciamento dos nucleotídeos. A enzima Nanoluciferase (Promega) é uma subunidade da luciferase extraída de *Oplophorus gracilirostris* com 19 kDa, e por ser menor diminui possíveis alterações de conformação ou funcionalidade provocadas pela fusão de proteínas fluorescentes aos GPCR (Stoddart *et al.*, 2015). Além disso, a fusão à sequência secretória da IL-6 garante a expressão do receptor na membrana, otimizando os sinais de BRET obtidos.

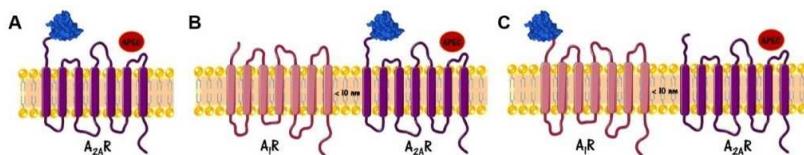


Figura 6. Constructos dos receptores de adenosina fusionados à enzima Nanoluciferase utilizados no presente estudo. As sequências de cDNA codificantes para os receptores A₁R e A_{2A}R foram amplificadas e inseridas no vetor pNFL-1secN, produzindo vetores que, após transfecção, expressavam a enzima Nanoluciferase na porção N-terminal dos receptores. As condições de transfecção avaliadas foram: **A.** receptor A_{2A}R fusionado à Nanoluciferase; **B.** receptor A_{2A}R fusionado à Nanoluciferase cotransfectado com o receptor A₁R; **C.** receptor A₁R fusionado à Nanoluciferase cotransfectado com o receptor A_{2A}R. APEC: agonista fluorescente do A_{2A}R. Figuras criadas com imagens encontradas em www.servier.com/Powerpoint-image-bank.

Para realização de curva de saturação da enzima Nanoluciferase, células HEK293 (5×10^6 células/poço) foram transfectadas com os cDNAs resultantes NanoLuc-A₁R ou NanoLuc-A_{2A}R (0 – 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), e após 4 h transferidas para placas brancas (Nunc, 96 poços previamente tratados com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) na concentração de $1,2 \times 10^5$ células/poço. O meio foi substituído por HBSS e a atividade da Nanoluciferase foi avaliada 60 s, 5, 10 e 15 min após a adição de h-Coelenterazina 5 μM (concentração final) através da quantificação de luminescência (475 nm, 30 nm bandwidth) em leitor de placa POLARstar Optima (BMG Labtechnologies, Alemanha).

Para a realização dos estudos de união, 1×10^6 células HEK293/poço foram transfectadas com 0,25 μg de cada cDNA (NanoLuc-A_{2A}R, NanoLuc-A_{2A}R + SNAP-A₁R, NanoLuc-A₁R + SNAP-A_{2A}R) e transferidas para placas brancas (96 poços) previamente tratadas com poli-L-lisina 4 h após a transfecção (2×10^4 células/poço). Decorridas 48 h, as células foram tratadas com doses crescentes do antagonista de A_{2A}R, ZM 241385 (30 pM – 30 nM) ou guanosina (1 μM

– 1 mM) e, após 15 min, HBSS ou APEC⁶⁴⁷ (30 pM, concentração final; agonista A_{2A}R fusionado a um fluoróforo) foi adicionado ao meio de incubação. Uma hora após o tratamento com APEC⁶⁴⁷, o meio das células foi substituído por 90 µL HBSS e *h*-Coelenterazina (concentração final 5 µM) foi adicionada aos poços. As leituras obtidas (após 60 s) referem-se a A: emissão a 480 nm (10 nm bandwidth) resultante do sinal da Nanoluciferase; B: soma das emissões a 660 nm, 680 nm e 700 nm (10 nm bandwidth cada), considerada como o sinal emitido pelo APEC⁶⁴⁷. Os resultados são apresentados como a razão B/A.

4.7 Privação de glicose e oxigênio (PGO) em fatias hipocampais de camundongos e avaliação da viabilidade celular

Para obtenção das fatias hipocampais, camundongos selvagens e *knock-out* para o receptor A_{2A}R (linhagem CB1, fornecidos pelo biotério central da Universitat de Barcelona, Espanha) foram decapitados e tiveram seus cérebros removidos. Fatias de 300 µm foram obtidas em vibrátomo (Leica) submersas em tampão Krebs-Ringer gelado (KRB; composição em mM: 122 NaCl, 3 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,3 CaCl₂, 0,4 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃ e 10 D-glicose, gaseificado com 95% O₂ – 5% CO₂ até alcançar pH 7,4). Os hipocampos foram dissecados das fatias cerebrais e transferidos para tubos individuais contendo 200 µL KRB a 37 °C para recuperação (30 min).

O tampão PGO (composição em mM: 1,3 CaCl₂, 137 NaCl, 5 KCl, 0,65 MgSO₄, 0,3 Na₂HPO₄, 1,1 KH₂PO₄, 5 HEPES e 10 2-deoxiglicose) foi gaseificado com nitrogênio por 15 min (Dal-Cim *et al.*, 2011). Após o período de recuperação, os hipocampos foram divididos em quatro grupos de tratamentos: controle (incubados apenas com KRB em todos os períodos); guanosina (incubados com de guanosina 100 µM durante 30 min); PGO (incubados apenas tampão PGO durante 15 min); PGO + guanosina (incubados com guanosina 100 µM diluída em KRB por 15 min, seguidos de 15 min em tampão PGO contendo guanosina 100 µM). O período de PGO foi seguido de um período de reoxigenação de 2 horas, onde todas as fatias foram mantidas em 200 µL KRB a 37 °C.

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-il-difeniltetrazolio, Sigma) foi utilizado para avaliação da viabilidade celular nas fatias submetidas à PGO. Após o período de reoxigenação, as fatias foram incubadas em 0,5 mg/mL de MTT (diluído em KRB; 200 µL/fatia), a 37 °C. Após 20 min, a solução de MTT foi substituída por 200 µL de dimetil sulfoxido, para solubilização do sal formado. A absorbância do meio foi lida a 550 nm

em leitor de placa PolarStar (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemanha).

4.8 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls quando necessário. $P < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância.

5. Resultados

5.1 Colocalização de receptores A_1 e A_{2A} após tratamento com guanosina

Células HEK293 transfectadas com ambos receptores A_1R e $A_{2A}R$ foram tratadas com guanosina (100 μ M) por duas horas, fixadas e submetidas ao protocolo de imunocitoquímica de fluorescência. As células tratadas com guanosina apresentaram uma distribuição celular dos receptores similar ao grupo controle (tratado apenas com o meio de cultura utilizado como veículo para a guanosina; Figura 7). Além disso, a análise em microscópio confocal permitiu observar que os dois receptores colocalizam na membrana celular.

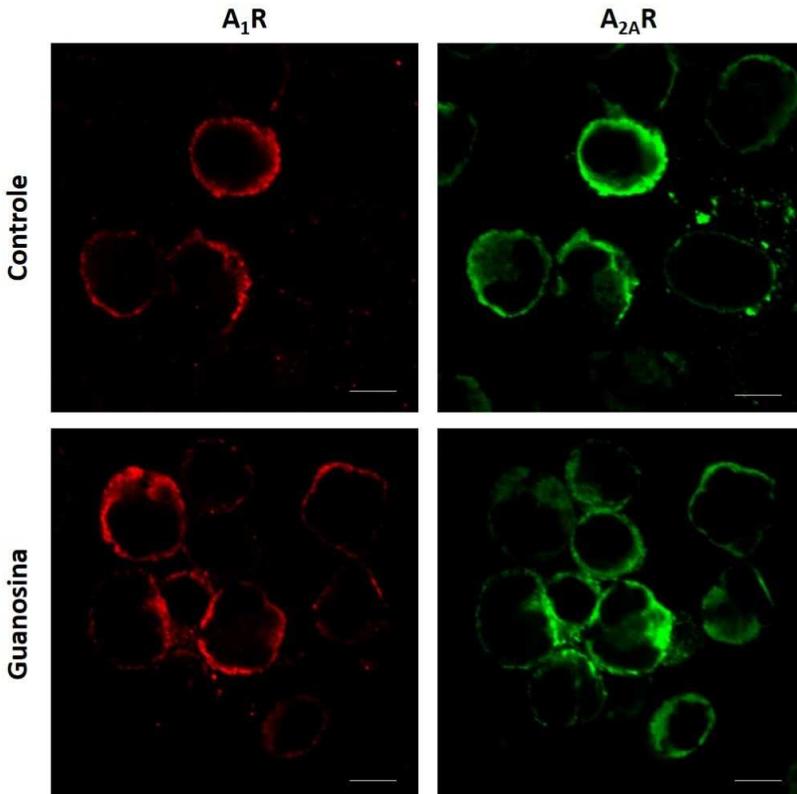


Figura 7. Colocalização na membrana celular dos receptores A_1R e $A_{2A}R$ após o tratamento com guanosina. Guanosina (100 μ M) adicionada ao meio

de cultura por 2 h não alterou a localização dos receptores comparada ao grupo controle. Fotomicrografias representativas de imunocitoquímica de fluorescência realizada em células HEK293 e obtidas em microscópio confocal Olympus Fluoview 500. Aumento de 1000x. $N = 2$.

5.2 Sinal de BRET entre os receptores A_1 e A_{2A} expressos em células HEK293 após tratamento com guanosina

Uma vez que vários estudos já demonstraram a ocorrência de interação entre os receptores A_1 e A_{2A} , a técnica de BRET foi empregada para avaliar o efeito da guanosina sobre a oligomerização desses receptores. O tratamento de células HEK293T transfectadas transitoriamente com os receptores A_1 e A_{2A} com guanosina (100 μM , 2h) não alterou a curva BRET (quantidade de energia transferida normalizada pela expressão da enzima doadora de energia luminescente) nem o BRET máximo (quantidade máxima de energia transferida) em relação ao grupo controle (tratados apenas com meio de cultura) (Figura 8). Visando comparar o efeito da guanosina com o ligante endógeno destes receptores, outro grupo de células foi tratado com adenosina (100 μM) por 2 h. O efeito do tratamento de guanosina e adenosina (100 μM cada) também foi avaliado. Não houve diferença significativa entre as curvas de BRET obtidas com os diferentes tratamentos. Os tratamentos avaliados também não alteraram o sinal de BRET máximo.

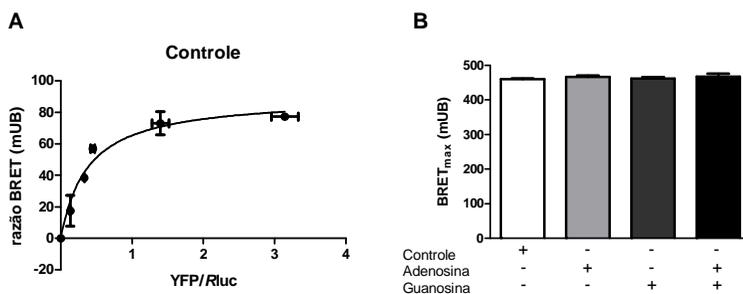


Figura 8. Sinal de BRET entre os receptores A_1R e $A_{2A}R$ após tratamento com guanosina. A: Gráfico representativo da curva de saturação obtida no grupo controle, que corresponde à razão BRET em mUB (mili Unidades de BRET). B: BRET máximo obtido com 0,5 μg de cDNA da proteína doadora ($A_{2A}R^{RLuc}$) e 3,25 μg de receptor (A_1R^{YFP}) em células tratadas com DMEM (controle), adenosina (100 μM), guanosina (100 μM) ou adenosina e guanosina (100 μM cada). $N = 4$.

5.3 Expressão do oligômero A_1R+A_2AR na membrana celular após tratamento com guanosina

Técnicas de complementação de proteínas fluorescentes são bastante empregadas para o estudo de oligomerização de receptores (Fernandez-Duenas *et al.*, 2012). Neste projeto, foi desenvolvido um *split* SNAP- A_1R - fragmentos N-terminal da proteína SNAP (nSNAP- A_1R) e C-terminal (cSNAP- A_1R). Após a obtenção dos fragmentos nSNAP- A_1R e cSNAP- A_1R , células HEK293 foram transfectadas com combinações dos fragmentos (nSNAP- A_1R , cSNAP- A_1R , nSNAP- A_2AR e cSNAP- A_2AR), e observou-se que houve reconstituição da proteína SNAP (fluorescência após marcação com o fluoróforo SNAP⁴⁸⁸ *Cell surface*) na combinação nSNAP- A_1R + cSNAP- A_2AR . O tratamento com guanosina, adenosina ou guanosina e adenosina nas células transfectadas com os *splits* ou com os receptores A_1R e A_2AR fusionados à proteína SNAP não alterou a localização destes receptores na membrana nem a formação de heterômeros em relação ao grupo controle (Figura 9).

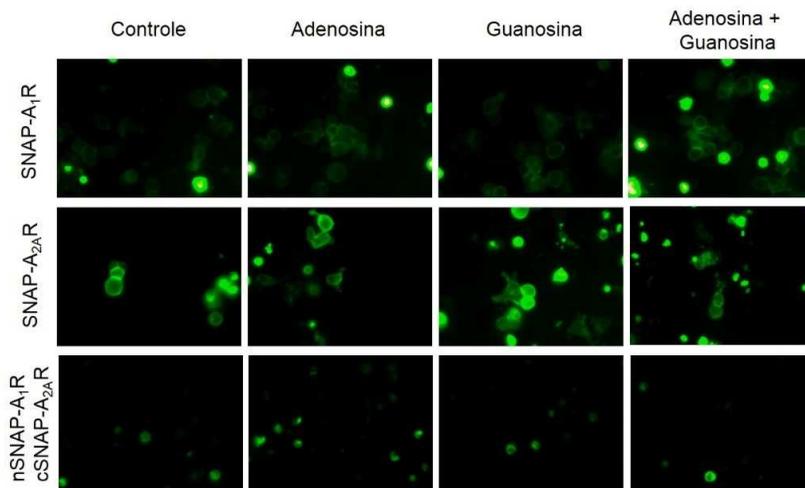


Figura 9. Expressão dos receptores SNAP- A_1R , SNAP- A_2AR e do oligômero nSNAP- A_1R /cSNAP- A_2AR em células HEK293. Imagens representativas obtidas após incubação das células HEK293 com adenosina (100 μ M), guanosina (100 μ M) ou ambos ligantes e marcadas com o fluoróforo SNAP⁴⁸⁸ *Cell surface*. As imagens foram obtidas com aumento de 400x em microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 40 CFL com sistema de captura AxioCam MRc.

5.4 Avaliação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e AMP cíclico através do uso de genes repórteres

A transfecção das células HEK293 com o gene repórter NFAT foi utilizado para quantificação indireta dos níveis de Ca^{2+} intracelular, uma sinalização geralmente associada à ativação de A_1R (Shim *et al.*, 2002; Ciruela *et al.*, 2006). O tratamento com o agonista A_1R , CCPA (1 μM) nas células transfectadas com o receptor A_1R ou com os receptores $A_1R+A_{2A}R$ induziu aumento nos níveis de Ca^{2+} em relação às células controle (Figura 10A e B), enquanto que o tratamento com guanosina não alterou os níveis intracelulares de Ca^{2+} . No entanto, guanosina preveniu o aumento de Ca^{2+} induzido pelo CCPA nas células transfectadas apenas com o A_1R , (Figura 10A), e nas células transfectadas com $A_1R+A_{2A}R$ (Figura 10B). Não foram observadas diferenças entre os níveis de NFAT/YFP nos grupos controle nas duas condições de transfecção (Figura 10D), ou seja, na expressão do receptor A_1R sozinho e quando co-transfectado com o receptor $A_{2A}R$ (Figura 10C).

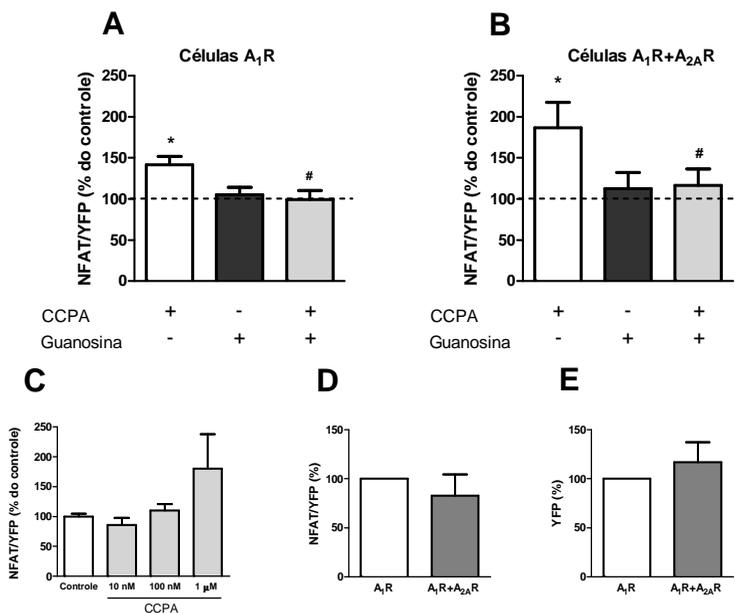


Figura 10. Efeito do tratamento com guanosina sobre os níveis de Cálcio intracelular quantificado através da expressão do gene repórter NFAT em células HEK293 transfectadas com o receptor A_1R (A) ou $A_1R+A_{2A}R$ (B).

Curva dose-resposta induzida por CCPA foi realizada em células HEK293 transfectadas com o receptor A₁R para determinação da dose utilizada neste estudo (C). (D) Expressão de NFAT normalizada pela expressão de YFP dos grupos controle e (E) expressão do receptor A₁R^{YFP} quando co-transfectado com o receptor A_{2A}R. Os resultados são apresentados como porcentagens em relação ao grupo controle (barra pontilhada) ($N = 4-6$). A análise estatística sugere diferença em relação ao grupo controle (* $P < 0,05$) e em relação ao grupo CCPA (# $P < 0,05$, gráficos A e B).

Como citado anteriormente, a formação de oligômeros pode alterar a farmacologia dos receptores (Franco *et al.*, 2008). Por isso, fomos investigar se a sinalização intracelular pode estar alterada na presença do oligômero A₁R-A_{2A}R. Células HEK293-A₁R tratadas com CGS21680 (200 nM), um agonista do receptor A_{2A}R, não apresentaram diferença nos níveis de Ca²⁺ em relação ao grupo controle (Figura 11A). No entanto, em células HEK293-A₁R+A_{2A}R, CGS21680 (200 nM) induziu aumento de Ca²⁺ que foi revertido pela guanosina (100 μM).

O pré-tratamento das células HEK293-A₁R com PTx (0,2 μg/mL), uma toxina que bloqueia a ação da proteína G_i, foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de Ca²⁺ induzido por CCPA (1 μM; Figura 11B). Em células HEK293-A₁R+A_{2A}R, o pré-tratamento com PTx pareceu prevenir não somente o aumento de Ca²⁺ induzido pelo CCPA como também reverteu o aumento induzido por CGS21680 (Figura 11C), sugerindo que na presença do oligômero A₁R+A_{2A}R a ativação do receptor A_{2A} por seu agonista seletivo pode também recrutar a interação com proteínas G_i.

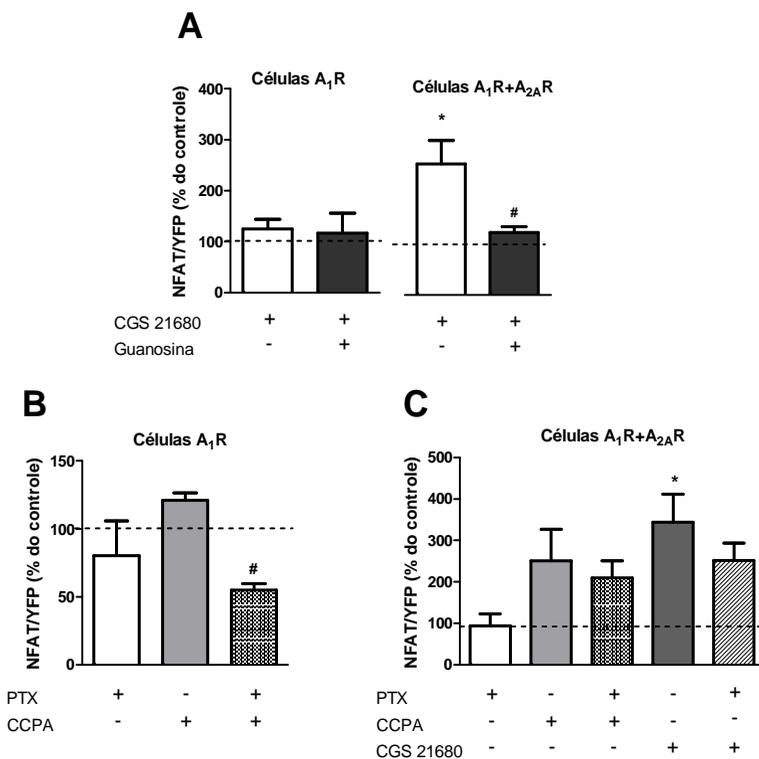


Figura 11. Efeito da guanosina e da toxina Pertussis (PTx) sobre os níveis de Cálcio intracelular quantificado através da expressão do gene repórter NFAT induzido por CCPA e CGS 21680. As células foram tratadas com PTx (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1h antes da adição do CCPA (1 μM) ou do CGS 21680 (200 nM). Os resultados são apresentados como porcentagens em relação ao grupo controle (barra pontilhada) ($N = 3-5$). A análise estatística sugere diferença em relação ao grupo controle (* $P < 0,05$) e em relação ao grupo CGS 21680 (# $P < 0,05$, gráfico A) ou CCPA (# $P < 0,05$, gráfico B).

Os níveis de AMPc também foram avaliados de maneira similar ao incremento de Cálcio intracelular, porém utilizando-se CRE como promotor da transcrição gênica sensível aos níveis de AMPc intracelulares. Em células HEK293-A_{2A}R, o tratamento com adenosina (100 μM) ou CGS21680 (200 nM) induziu aumento de AMPc, conforme esperado (Figura 12A). O tratamento com guanosina (100 μM) também induziu aumento da transcrição de CRE, similar ao observado com

adenosina ou CGS21680. Porém, quando guanosina foi incubada na presença de adenosina ou CGS21680, não foi observado aumento nos níveis da transcrição de CRE.

Em células HEK293- $A_1R+A_{2A}R$ nenhum fármaco testado induziu aumento significativo nos níveis de AMPc (Figura 12B), indicando o possível efeito antagonista do A_1R sobre a sinalização ativada pelo $A_{2A}R$ (a ativação de A_1R reduz os níveis de AMPc, enquanto a ativação de $A_{2A}R$ aumenta, resultando na ausência de efeito observada no gráfico 12B). Não foram observadas diferenças na razão CRE/YFP nos grupos controles das células $A_{2A}R$ ou $A_1R+A_{2A}R$ (Figura 12C), sugerindo que a coexpressão dos receptores não leva à internalização dos mesmos (ou dessensibilização desta via de sinalização).

Em conjunto, estes resultados sugerem que guanosina não apresenta efeito *per se* sobre a sinalização de cálcio, mas desempenha uma ação antagonônica sobre a sinalização de cálcio ativada na presença de A_1R e $A_1R+A_{2A}R$. Em relação à mobilização de AMPc, guanosina teve um efeito similar aos agonistas dos receptores $A_{2A}R$. Porém, na presença do agonista endógeno (adenosina) ou de agonista sintético seletivo (CGS21680), guanosina parece agir como um modulador negativo.

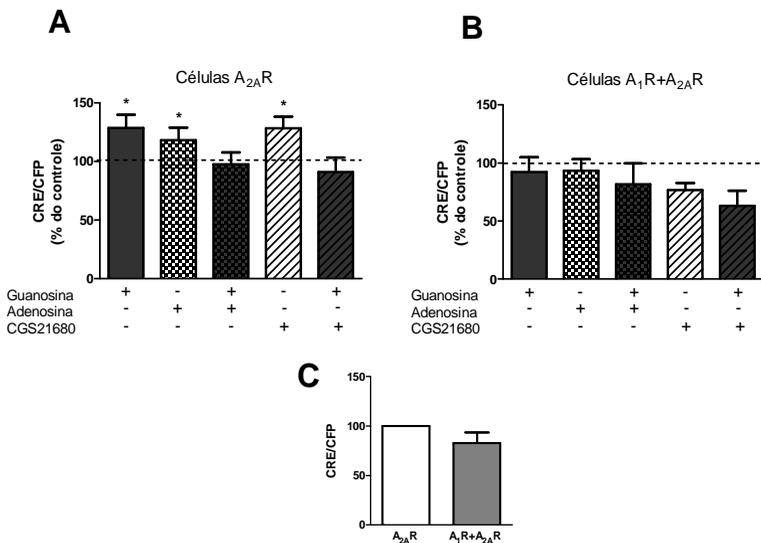


Figura 12. Efeito do tratamento com guanosina sobre os níveis de AMP cíclico intracelular quantificado através da expressão do gene repórter CRE

em células HEK293 transfectadas com o receptor $A_{2A}R$ (A) ou $A_1R+A_{2A}R$ (B). (C) Expressão de CRE normalizada pela expressão de CFP dos grupos controle. A análise estatística sugere diferença em relação ao grupo controle (* $P < 0,05$, barra pontilhada).

5.5 Aplicação de NanoBRET para investigação da interação da guanosina com os receptores A_1 e A_{2A}

Com o objetivo de investigar a possível interação da guanosina com o oligômero $A_1R+A_{2A}R$, a metodologia de nanoBRET foi empregada neste estudo. Esta metodologia tem sido utilizada para identificar possíveis ligantes de receptores de membrana, substituindo assim os ensaios de ligação que utilizam moléculas marcadas com radioisótopos, além da investigação da interação entre dois receptores (Stoddart *et al.*, 2015).

Os constructos Nanoluc- A_1R e Nanoluc- $A_{2A}R$ foram obtidos após clonagem dos receptores no vetor pNFL-1secN, que permite a expressão da enzima Nanoluciferase na porção N-terminal dos receptores A_1R e $A_{2A}R$. Curvas de expressão dos constructos obtidos foram realizadas para determinação da concentração necessária de cDNA a ser utilizada nos experimentos, assim como o melhor tempo de avaliação para captura da luminescência. Os resultados desses experimentos de caracterização da atividade da Nanoluciferase (Nluc) estão demonstrados na Figura 13. Com base nesses resultados, as avaliações de nanoBRET foram realizadas após transfecção de 0,25 μg de cDNA dos constructos Nluc- A_1R e Nluc- $A_{2A}R$, e a luminescência avaliada após 1 min. Esta é a primeira vez que um constructo Nluc- $A_{2A}R$ é utilizado na literatura.

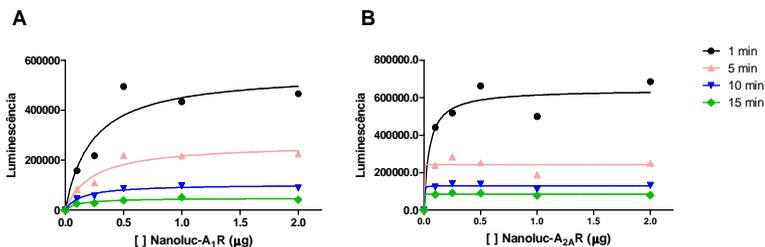


Figura 13. Caracterização da luminescência emitida pelos constructos Nanoluc- A_1R (A) e Nanoluc- $A_{2A}R$ (B). Células HEK293 foram transfectadas com quantidades crescentes de cDNA dos constructos Nanoluc- A_1R ou Nanoluc-

A_{2A}R. Após a adição de Coelenterazina (5 µM), a luminescência total foi quantificada em diferentes tempos ($N = 2$).

Em seguida, foram realizadas curvas de deslocamento do agonista A_{2A}R, APEC⁶⁴⁷ com doses crescentes do antagonista A_{2A}R, ZM241385 (30 pM – 30 nM) e guanosina (1 µM – 1 mM). Os resultados sugerem que tanto guanosina quanto ZM241385 deslocam o APEC⁶⁴⁷ do seu sítio, pois como podemos observar nos gráficos A e B da Figura 14, ocorre diminuição de nanoBRET entre Nluc-A_{2A}R e APEC⁶⁴⁷ conforme aumentam as concentrações de ZM241385 (Figura 14A) e guanosina (Figura 14B). Porém, guanosina é menos eficiente em deslocar o APEC⁶⁴⁷ da interação com o Nluc-A_{2A}R, pois a curva de deslocamento é menor em comparação à curva obtida com ZM241385. Além disso, as concentrações de guanosina necessárias para que ocorra o deslocamento são maiores. Os valores de IC₅₀ obtidas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de IC₅₀ obtidos para ZM241385 e guanosina nas diferentes condições de NanoBRET.

Fármaco	Nluc-A _{2A} R	Nluc-A _{2A} R+A ₁ R	Nluc-A ₁ R+A _{2A} R
ZM241385	3,79pM	0,25nM	1,02nM
Guanosina	12,40 µM	3,72 µM	1,7 µM

Na presença do A₁R (quadrado fechado nos gráficos A e B), a curva de deslocamento obtida é similar à curva obtida somente na presença do A_{2A}R, sugerindo que não há alteração na interação dos ligantes com o A_{2A}R na presença do A₁R.

O deslocamento da união do APEC⁶⁴⁷ pelo ZM241385 e pela guanosina também é demonstrado na condição Nluc-A₁R+A_{2A}R (Figuras 14C e D). O valor menor de nanoBRET em relação aos gráficos A e B da mesma figura podem estar relacionados à maior distância entre a molécula doadora de energia (isto é, a Nanoluciferase no receptor A₁) e a molécula aceptora (APEC ligado ao receptor A_{2A}). Esta é a primeira utilização de ensaio de nanoBRET demonstrando a interação entre dois receptores de membrana. O conjunto de resultados obtidos permite sugerir que a guanosina interage com os receptores A_{2A} quando expresso sozinho ou na presença do oligômero A₁R+A_{2A}R, porém com menor afinidade que o antagonista A_{2A}R, ZM241385.

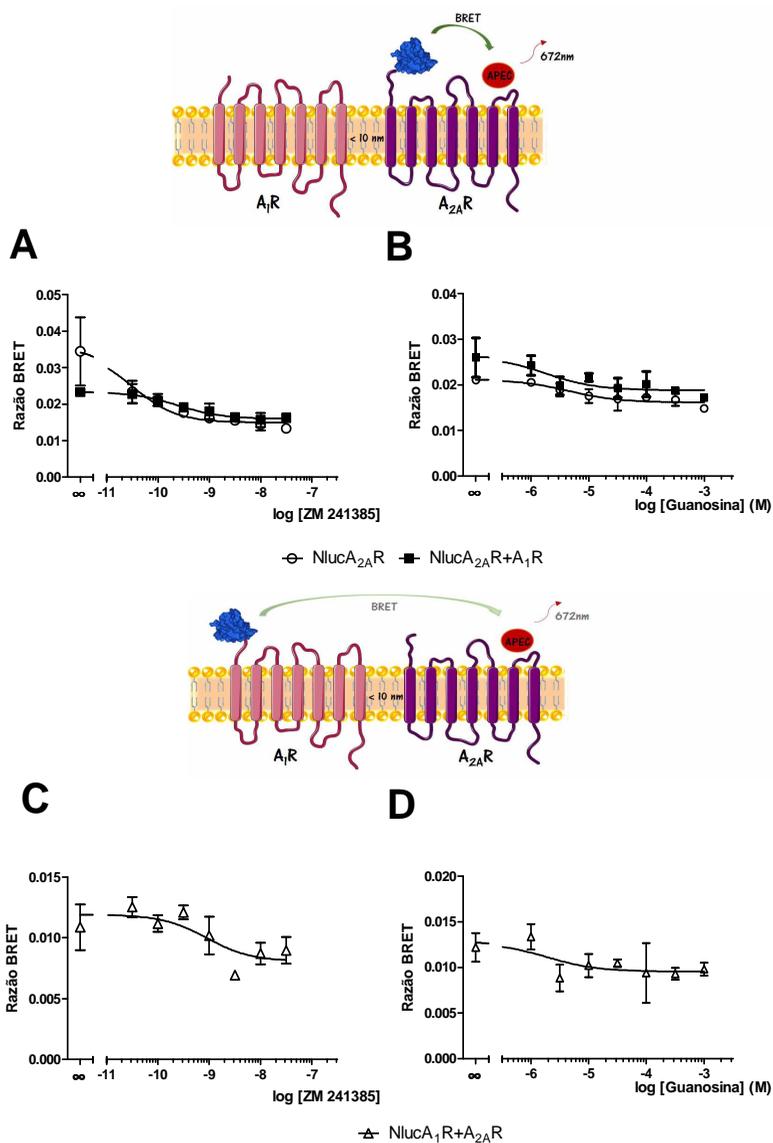


Figura 14. Efeito do ZM 241385 (A, C) e da guanosina (B, D) sobre o nanoBRET entre o agonista APEC⁶⁴⁷ e o receptor A_{2A}R. Células HEK293 expressando Nluc-A_{2A}R (○), Nluc-A_{2A}R+A₁R (■) ou Nluc-A₁R+A_{2A}R (△)

foram tratadas com ZM 241385 (30 pM – 30 nM) e guanosina (1 μ M – 1 mM) e após 15 min, foi adicionado APEC⁶⁴⁷ (30 pM). A transferência de energia entre a enzima Nanoluciferase e o agonista APEC⁶⁴⁷ foi avaliada após a adição de Coelenterazina 5 μ M. Os dados são apresentados como a razão entre o sinal de fluorescência e o sinal de luminescência obtidos (razão BRET; $N = 6$).

5.6 Ausência de neuroproteção por guanosina em fatias hipocâmpais de camundongos que não expressam o receptor A_{2A} (*knock-out* A_{2A}R) submetidas a um modelo de isquemia *in vitro*

O efeito neuroprotetor da guanosina frente a um modelo de isquemia *in vitro*, (PGO), foi avaliado em fatias hipocâmpais de camundongos selvagens e *knock-out* para o receptor A_{2A}R. A PGO reduziu a viabilidade celular das fatias hipocâmpais de animais selvagens (51%; Figura 15A) e animais *knock-out* (64%; Figura 15B). Guanosina *per se* não modificou a viabilidade celular das fatias, enquanto que o tratamento com guanosina protegeu as fatias hipocâmpais de animais selvagens submetidas à PGO (79%; Figura 15B). No entanto, a guanosina não alterou a diminuição da viabilidade celular das fatias hipocâmpais de animais *knock-out* submetidas à PGO (71%; Figura 15B), sugerindo que a expressão dos receptores A_{2A}R é fundamental para a indução do efeito neuroprotetor da guanosina.

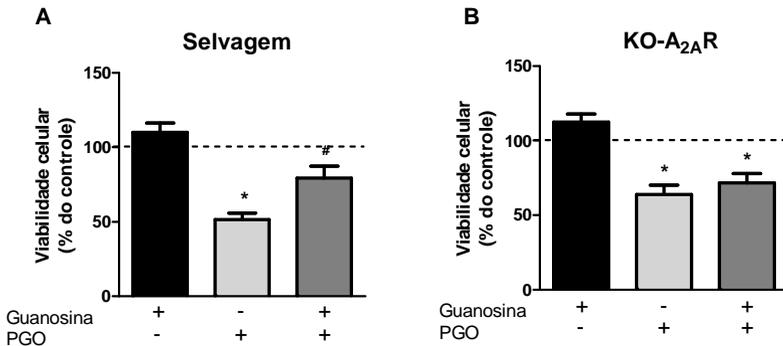


Figura 15. Efeito da guanosina sobre a perda de viabilidade celular induzida por PGO em fatias hipocâmpais de camundongos selvagens (A) e KO-A_{2A}R (B). As fatias (400 μ m) foram incubadas com guanosina (100 μ M) 15 min antes da indução da PGO, e durante a PGO. Fatias do grupo controle foram incubadas apenas com tampão KRB. Após 2 h de reoxigenação em tampão KRB, a

viabilidade celular foi avaliada através do teste de redução do MTT. Os resultados são apresentados como porcentagens em relação ao grupo controle (barra pontilhada), considerado como 100% de viabilidade ($N = 5-8$). A análise estatística sugere diferença em relação ao grupo controle (* $P < 0,05$) e em relação ao grupo PGO (# $P < 0,05$).

6. Discussão

Um sistema de transmissão purinérgica dos derivados da guanina no SNC foi proposto por Schmidt e colaboradores (2007). Neste sistema, postula-se que a guanosina, o nucleosídeo derivado da guanina, seja a molécula com atividade biológica, e muitos estudos já demonstraram seus efeitos neuroprotetores em situações de estresse oxidativo, isquemia, neuroinflamação e doenças neurodegenerativas (para revisão ver Lanznaster *et al.*, 2016). No entanto, o exato sítio de interação da guanosina na membrana celular ainda não foi identificado. Muitos estudos reportam a participação dos receptores de adenosina A₁R e A_{2A}R no efeito neuroprotetor da guanosina. O bloqueio farmacológico do A₁R e a ativação do A_{2A}R inibem o efeito neuroprotetor da guanosina no protocolo de privação de glicose e oxigênio, um modelo de isquemia *in vitro* (Dal-Cim *et al.*, comunicação pessoal). Já foi demonstrado que os receptores A₁ e A_{2A} formam heterômeros (oligômeros com características funcionais) nos terminais pré-sinápticos do estriado, onde controlam a liberação de glutamato (Ciruela *et al.*, 2006). No presente estudo, utilizando técnicas de superexpressão dos receptores A₁ e A_{2A} em células HEK293, investigamos a possível interação da guanosina com o heterômero A₁R+A_{2A}R.

A colocalização dos receptores A₁ e A_{2A} já foi demonstrada em sistemas de expressão heteróloga e também em tecido nativo (Ciruela *et al.*, 2006; Cristovao-Ferreira *et al.*, 2013). No presente estudo, a superexpressão de A₁R e A_{2A}R em células HEK293 confirma sua colocalização na membrana celular. O tratamento destas células com guanosina por duas horas não modificou a localização destes receptores na membrana.

Para investigar se os receptores presentes na membrana estão formando oligômeros e se a guanosina pode alterar esta interação, foram utilizados ensaios de BRET. BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transference*) é o fenômeno de transferência de energia bioluminescente, na presença do substrato coelenterazina, entre a enzima luciferase ligada a um receptor e um fluoróforo ligado a outro receptor. Essa transferência de energia somente ocorre quando os receptores estão em grande proximidade (< 10 nm), sugerindo a ocorrência de uma interação receptor-receptor (formação de oligômeros funcionais). Após duas horas de tratamento com guanosina, podemos observar que não houve diferença entre os sinais de BRET obtidos em comparação ao grupo controle. Um grupo de células foi tratado com adenosina para compararmos os sinais obtidos com o ligante endógeno natural dos receptores A₁ e A_{2A}, e o sinal

de BRET obtido nestas células também foi similar ao grupo controle. O cotratamento das células com guanosina e adenosina também foi avaliado, e gerou sinais de BRET similares aos outros grupos. Esses resultados sugerem que, após duas horas de tratamento com guanosina ou adenosina, a interação entre A₁R e A_{2A}R não sofre alteração.

Para complementar os dados obtidos com a metodologia de BRET, e considerando que os sinais de BRET podem ser captados a partir de proteínas expressas não somente na membrana celular, outra metodologia utilizada para avaliar a interação entre dois receptores é a complementação bimolecular de fluorescência (*BiFC*, em inglês), onde dois fragmentos não fluorescentes de uma proteína readquirem fluorescência após a interação dos fragmentos e consequente reconstituição da proteína. A proteína SNAP é bastante empregada nessa técnica, e após reconstituída, pode ser marcada com um substrato fluorescente e visualizada ao microscópio. Para avaliar a interação entre A₁R e A_{2A}R, os *splits* nSNAP e cSNAP foram fusionados à porção n-terminal do receptor A₁ e super-expressos em células HEK293 em combinação com os constructos nSNAP-A_{2A}R e cSNAP-A_{2A}R. A fluorescência do fluoróforo SNAP⁴⁸⁸ foi observada nas células transfectadas com nSNAP-A₁R e cSNAP-A_{2A}R, sugerindo a formação do heterômero A₁R+A_{2A}R. As células foram tratadas com guanosina, adenosina, ou guanosina e adenosina, e não foram observadas diferenças entre a fluorescência obtida nos diferentes grupos. Os resultados obtidos neste experimento confirmam os resultados obtidos anteriormente com a técnica de BRET, demonstrando que os diferentes tratamentos não alteram a interação entre os receptores A₁ e A_{2A}. Além disso, a análise das imagens obtidas neste experimento permite inferir que os heterômeros continuam sendo expressos na membrana após duas horas de tratamento.

Experimentos utilizando genes repórteres para quantificação indireta dos níveis de Ca²⁺ e AMPc intracelulares foram utilizados para investigar quais vias de sinalização poderiam ser ativadas por guanosina na presença dos receptores A₁ e A_{2A} ou na presença de heterômeros (células transfectadas com A₁R+A_{2A}R). O NFAT consiste em um promotor de transcrição gênica sensível ao Ca²⁺ intracelular, que mede a quantidade de Ca²⁺ acumulado pela célula após algumas horas de incubação com os agonistas. A ativação dos receptores A₁ pode levar à formação de inositol-3-fosfato (IP3), um mensageiro intracelular que induz a liberação de Ca²⁺ estocado no retículo endoplasmático (Shim *et al.*, 2002). Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com guanosina não induz aumento nos níveis intracelulares de Ca²⁺, porém a guanosina reverte o aumento nos níveis de Ca²⁺ induzido pelo CCPA, um

agonista dos A_1R , sugerindo que a guanosina pode bloquear a ativação receptores A_1R . Esse efeito foi observado tanto em células transfectadas apenas com A_1R quanto em células transfectadas com ambos receptores (A_1R+A_2AR).

Considerando que a formação de heterômeros entre os GPCR pode levar a uma modificação da sua farmacologia, inclusive levando à ativação de outras vias de mensageiros intracelulares (Franco *et al.*, 2008), o efeito do CGS21680, um agonista A_2AR , sobre os níveis de Ca^{2+} na presença do heterômero A_1R+A_2AR foi avaliado. Os resultados demonstram um aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular após ativação do A_2AR pelo CGS21680. Este efeito ocorre devido à interação do CGS21680 com o A_2AR , pois o tratamento com CGS21680 em células transfectadas apenas com A_1R não induziu aumento de Ca^{2+} . Além disso, o tratamento com guanosina também inibiu o aumento de Ca^{2+} induzido por CGS21680 em células A_1R+A_2AR . Para investigar se a proteína Gi estava relacionada à sinalização de Ca^{2+} observada nesses experimentos, as células foram pré-incubadas com PTx, uma toxina que bloqueia a ativação da Gi. De fato, o pré-tratamento com PTx bloqueou o aumento de Ca^{2+} induzido pelo CCPA, assim como bloqueou o aumento induzido pelo CGS21680. Esses resultados sugerem que a ativação do A_2AR no heterômero pode recrutar proteínas Gi e induzir liberação do Ca^{2+} intracelular. Além disso, considerando o efeito observado pelo tratamento com guanosina, podemos sugerir que a guanosina age como antagonista do A_1R , bloqueando a sinalização decorrente da ativação da proteína Gi. A participação da proteína Gi no efeito neuroprotetor da guanosina já foi demonstrada, uma vez que o pré-tratamento de fatias hipocâmpais com PTx reverteu o efeito neuroprotetor da guanosina em modelo de isquemia *in vitro* (Dal-Cim *et al.*, 2013).

Estudos anteriores demonstraram que guanosina pode induzir aumento de AMPc em fatias de córtex cerebral de ratos que parece ser independente da sinalização ativada por adenosina (Traversa *et al.*, 2003). Para investigar se esse efeito ocorre através de uma possível interação da guanosina com o heterômero A_1R+A_2AR ou através somente um dos receptores, utilizamos um ensaio utilizando gene repórter CRE. A transcrição de CRE é ativada por AMPc, e a ativação de uma proteína Gs induz a atividade da adenilato ciclase e consequente aumento de AMPc, enquanto a ativação da Gi diminui a atividade da adenilato ciclase. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que em células transfectadas com A_2AR , guanosina induz aumento de AMPc assim como adenosina e CGS21680, corroborando os resultados dos estudos anteriores. No entanto, o cotratamento de guanosina com adenosina ou

CGS21680 reduz os níveis de AMPc a níveis basais, sugerindo um bloqueio da sinalização na presença de guanosina. Quando as células são transfectadas com os receptores A_1 e A_{2A} , nenhum dos tratamentos testados induz aumento de AMPc, sugerindo que a presença do A_1R é capaz de antagonizar a ação do $A_{2A}R$. Assim, podemos sugerir que esse bloqueio não depende de uma ativação da proteína G_i , mas sim de uma interação antagônica direta entre os dois receptores. Esse conjunto de resultados obtidos nos permite sugerir que a guanosina parece atuar como agonista dos receptores $A_{2A}R$, porém na presença de outro agonista (mais seletivo ou de maior afinidade), a guanosina pode exercer um papel modulatório negativo, impedindo a sinalização que decorre da sua ativação. Dados preliminares de nosso laboratório sugerem que a guanosina não interage com o sítio ortostérico do $A_{2A}R$, mas que possivelmente atua como um modulador alostérico negativo (NAM) (Lanznaster et al., dados não publicados).

Para confirmar a interação da guanosina com receptores A_{2A} na presença e ausência do heterômero, ensaios de nanoBRET foram utilizados. Para isso, a enzima Nanoluciferase foi fusionada às porções n-terminais dos receptores A_1 e A_{2A} , e um agonista $A_{2A}R$ fusionado a um fluoróforo (APEC⁶⁴⁷) foi utilizado para realização de ensaios de ligação e deslocamento. O pré-tratamento com guanosina ou ZM241385 nas células transfectadas com Nluc- $A_{2A}R$ reduziu o sinal de nanoBRET de forma dose-dependente (isto é, transferência de energia bioluminescente entre a enzima Nanoluciferase ativada para o fluoróforo APEC⁶⁴⁷). O mesmo resultado foi obtido em células Nluc- $A_{2A}R$ + SNAP- A_1R . Estes resultados corroboram a hipótese de que a guanosina interage com os receptores A_{2A} , e essa interação não é alterada na presença do A_1R . Esses resultados também corroboram a hipótese anterior de que na presença de outro agonista, guanosina pode atuar como modulador negativo de $A_{2A}R$, deslocando APEC⁶⁴⁷ do seu sítio de interação.

Ensaio de nanoBRET realizados em células transfectadas com Nluc- A_1R + SNAP- $A_{2A}R$ (onde a enzima Nanoluciferase encontra-se fusionada ao receptor A_1) também sugerem que guanosina é capaz de deslocar o APEC⁶⁴⁷ do seu sítio de interação. A razão BRET obtida nestes experimentos é menor que as razões obtidas nos experimentos anteriores, onde a enzima Nanoluciferase está fusionada ao mesmo receptor ($A_{2A}R$) onde interage o APEC⁶⁴⁷. Esse efeito pode estar relacionado à distância entre doador (enzima) e aceptor (APEC⁶⁴⁷), gerando menor eficiência na transferência de energia bioluminescente. Apesar disso, a diminuição no sinal de BRET induzido pelo tratamento com ZM241385 confirma a ocorrência de oligomerização entre os receptores A_1 e A_{2A} . De nosso

conhecimento, este é o primeiro ensaio de nanoBRET realizado entre dois receptores distintos.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo acerca da possível interação da guanosina com o $A_{2A}R$, investigamos o efeito neuroprotetor da guanosina em um modelo em que sua efetividade já foi largamente comprovada, a neuroproteção frente a um modelo de isquemia *in vitro* (PGO), em fatias hipocâmpais (Oleskovicz *et al.*, 2008; Dal-Cim *et al.*, 2011; Dal-Cim *et al.*, 2013; Dal-Cim *et al.*, 2016). Utilizamos camundongos que não expressam o $A_{2A}R$ (*knock-out* para o receptor $A_{2A}R$). Conforme esperado, a guanosina previne a perda de viabilidade celular provocada pela PGO em fatias hipocâmpais de animais selvagens. No entanto, esse efeito não foi observado em fatias hipocâmpais obtidas dos animais que não expressam $A_{2A}R$, demonstrando que a presença do $A_{2A}R$ é fundamental para a ocorrência do efeito neuroprotetor da guanosina. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento das fatias hipocâmpais com CGS21680 bloqueia o efeito neuroprotetor induzido por guanosina no modelo da PGO (Dal-Cim *et al.*, 2013). Estes resultados corroboram nossa hipótese de que guanosina interage com os $A_{2A}R$ e que na presença de um agonista seletivo $A_{2A}R$, guanosina pode desempenhar um efeito modulatório negativo. Na ausência de $A_{2A}R$, guanosina perde seu efeito neuroprotetor.

Apesar de alguns estudos demonstrarem que o bloqueio do $A_{2A}R$ contribui para neuroproteção, outros estudos mostram que a sinalização por $A_{2A}R$ é necessária para ocorrência de neuroproteção (Rahman, 2009). Por exemplo, a ativação de $A_{2A}R$ por agonistas exógenos aumenta a transmissão glutamatérgica nas sinapses no hipocampo, e esse efeito é mais proeminente em animais idosos (Sebastiao e Ribeiro, 1992; Rebola *et al.*, 2003). Considerando as observações deste estudo, que indicam que a guanosina pode inibir a sinalização ativada por A_1R , mas parece interagir diretamente com $A_{2A}R$ – um receptor fundamental para a o efeito neuroprotetor da guanosina – torna-se necessária a investigação sobre a ocorrência de oligômeros $A_1R+A_{2A}R$ nas estruturas do SNC, principalmente no hipocampo, região onde o efeito neuroprotetor da guanosina já foi demonstrado em diversos modelos.

7. Conclusões

Os resultados apresentados neste capítulo nos permitem sugerir que:

- Guanosina não altera a colocação dos receptores A_1 e A_{2A} na membrana celular, bem como não altera a formação de heterômeros $A_1R+A_{2A}R$, demonstrado pelas técnicas de BRET e BiFC;
- Utilizando genes repórteres, demonstramos que a guanosina pode bloquear a sinalização celular ativada por A_1R ;
- Em relação ao $A_{2A}R$, a guanosina parece ativar a sinalização intracelular dependente do $A_{2A}R$ na ausência de um ligante seletivo, porém na presença de outro agonista $A_{2A}R$, guanosina parece agir como um modulador negativo;
- Ensaios de nanoBRET permitem sugerir que guanosina age como antagonista do $A_{2A}R$, ao deslocar a ligação de um agonista (APEC⁶⁴⁷), tanto na presença somente de $A_{2A}R$ quanto na presença do oligômero $A_1R+A_{2A}R$;
- Além disso, demonstramos aqui pela primeira vez a ocorrência de oligômeros através de um ensaio de nanoBRET, onde a enzima Nanoluciferase fusionada ao A_1R induziu transferência de energia ao agonista $A_{2A}R$ APEC⁶⁴⁷;
- A presença do $A_{2A}R$ é determinante para a neuroproteção promovida pela guanosina no modelo de isquemia *in vitro*, pois guanosina não demonstrou efeito neuroprotetor em fatias de animais que não expressam $A_{2A}R$.

Apêndice I

Interação entre guanosina e o canal BK – Resultados preliminares

Similarmente ao BRET, a técnica de FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transference*) é a transferência de energia que ocorre entre duas proteínas, nesse caso fluorescentes, e é bastante utilizada para estudo da interação de proteínas de membrana e avaliação da alteração conformacional produzida por ligantes. No presente estudo, a subunidade funcional do canal de potássio BK (*slo*-BK) foi fusionada a uma proteína CFP (*Cyan fluorescent protein*) e a um sítio de reconhecimento para uma pequena sonda não fluorescente denominada FIAsh (*Fluorescein Arsenical Hairpin binder*). Quando ocorre a ligação entre o sítio de reconhecimento e a sonda FIAsh, estes se tornam fluorescentes, e são excitados pela fluorescência emitida pela CFP. Portanto, uma molécula capaz de alterar a conformação da subunidade *slo*-BK (quando o canal é ativado e permeia o efluxo de potássio) diminui a transferência de energia entre a CFP e sonda FIAsh.

Uma técnica que permite maior taxa de expressão dos constructos analisados é o estabelecimento de linhagem celular com expressão estável. Assim, células HEK293 foram transfectadas com o constructo Slo-FIAsh-CFP, e selecionadas por aproximadamente duas semanas com antibiótico Geneticina (0,25 mg/mL). As células resistentes foram ressuspensas em meio PBS/BSA/EDTA e levadas ao citômetro de fluxo para a separação das células positivas, selecionando uma população aproximada de 1,7 milhões de células, as quais foram novamente plaqueadas e mantidas em condições padrão até alcançarem confluência. Uma amostra de células foi fixada e levada ao microscópio confocal para obtenção de imagem, confirmando expressão em cerca de 80% das células (Figura 1).

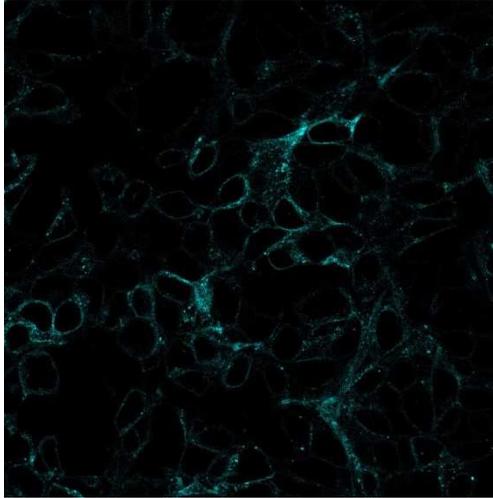


Figura 1. Linhagem estável de células HEK293 com expressão estável do constructo Slo-FlAsH-CFP. Imagem obtida em microscópio confocal após excitação da CFP (excitação: 433 nm, emissão 475 nm). Imagem obtida em microscópio de fluorescência (aumento de 20x).

Apesar da alta taxa de expressão confirmada em microscopia confocal, a visualização da expressão no microscópio acoplado ao sistema de FRET sugeriu baixa expressão do constructo na membrana celular, gerando pouca fluorescência. Apesar disso, testamos a funcionalidade do constructo através da utilização de um ativador farmacológico comercial do canal BK (NS1619, Tocris), para evidenciar a possível ativação do canal e mudança de conformação, que pode ser medida por sinais de FRET. O sinal de FRET obtido sugere que houve mudança conformacional do canal, pois após a adição do ativador (no tempo de 15 s), ocorre um decaimento na curva do sinal YFP (curva amarela), enquanto o sinal da CFP aumenta (Figura 2). Essas alterações são observadas porque ocorre afastamento da proteína CFP e do epítipo FlAsH no constructo expresso, diminuindo a transferência de energia entre a CFP (excitação: 433 nm) e FlAsH, confirmando a alteração na conformação do canal.

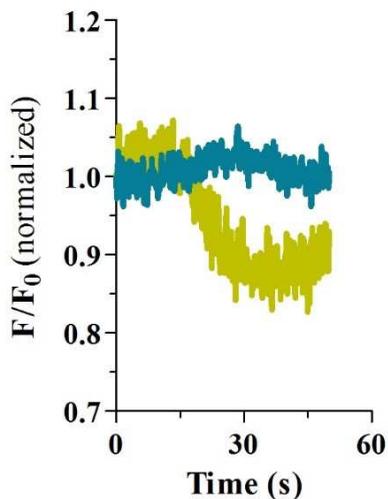


Figura 2. Alteração do sinal de FRET observado após o tratamento das células Slo-FlAsH-CFP com o ativador do canal BK N1619. A curva verde representa o sinal de FlAsH e a azul, o sinal de CFP. F = sinal de fluorescência obtido; F₀ = sinal de fluorescência basal.

A alteração na conformação do constructo também foi avaliada após o tratamento com guanosina. Guanosina (100 μ M) foi capaz de aumentar a fluorescência CFP, sem alterar o sinal obtido a partir de FlAsH (Figura 3). Apesar do perfil obtido não ser ideal, os resultados preliminares sugerem que guanosina pode interagir diretamente com a subunidade funcional do canal maxiK, alterando sua conformação. Estes dados corroboram evidências prévias de interação da guanosina com o canal BK expresso em células HEK293 e cuja atividade foi avaliada por eletrofisiologia (Tasca *et al.*, 2013).

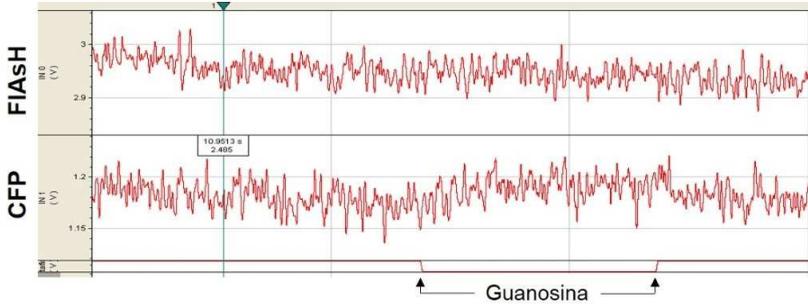


Figura 3. Alteração do sinal CFP após incubação de células Slo-FIAsh-CFP com guanosina (100 μ M). A primeira linha representa o sinal obtido de YFP; a segunda linha representa o sinal da CFP.

Além dos efeitos diretos da guanosina sobre o canal BK, podemos ainda sugerir uma ação da guanosina sobre o oligômero formado entre o $A_{2A}R$ e a subunidade regulatória do canal BK (subunidade β). A formação deste heterômero já foi demonstrada previamente (Ciruela, comunicação pessoal), e pode representar um sítio de interação para a guanosina na membrana celular.

Capítulo II

Estudo do efeito neuroprotetor da guanosina sobre a toxicidade do peptídeo β -amiloide₁₋₄₀

As análises comportamentais descritas neste capítulo foram realizadas em colaboração com o Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas da UFSC, coordenado pelo Professor Dr. Rui D. Prediger. As análises dos níveis de purinas foram realizadas em colaboração com o laboratório do Professor Dr. Diogo O. Souza, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, durante estágio de pesquisa financiado por projeto CAPES/Procad.

Os resultados apresentados neste capítulo foram submetidos para publicação no periódico Behavioral Brain Research sob a forma de artigo científico intitulado “Guanosine prevents the depressive-like behavior and glutamatergic transmission impairment following amyloid- β ₁₋₄₀ administration in mice.”

1. Fundamentação teórica

1.1 Doença de Alzheimer e o peptídeo β -amiloide

A toxicidade relacionada ao peptídeo β -amiloide é um evento central na doença de Alzheimer, doença neurodegenerativa que acomete cerca de 35,6 milhões de pessoas no mundo (Norton Sayeg em <<http://www.alzheimermed.com.br/>>. Acesso em 26 de janeiro de 2016), sendo a maior causa de demência em idosos (Mazurek, 2000). Estima-se que em 2050, 100 milhões de pessoas desenvolverão a doença de Alzheimer, uma vez que o envelhecimento (idade superior a 65 anos) é considerado o principal fator de risco (Karran, Mercken e De Strooper, 2011). A Doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por uma neurodegeneração irreversível e progressiva, levando à perda de memória e prejuízos funcionais. As principais alterações relacionadas a essa doença são perda sináptica e neuronal no córtex cerebral, hipocampo e amígdala, associadas à presença de placas senis (depósitos extracelulares de peptídeo β -amiloide nas sinapses, próximos a neuritos distróficos e astrócitos reativos) e emaranhados neurofibrilares (depósitos intracelulares de proteína tau hiperfosforilada) (Masters *et al.*, 1985; Goedert *et al.*, 1988; D'andrea *et al.*, 2001; Selkoe, 2003; Parameshwaran, Dhanasekaran e Suppiramaniam, 2008). A redução da densidade sináptica pode ser observada nos estágios iniciais da DA, ocorrendo antes mesmo da morte neuronal e da formação de placas. Essa diminuição se correlaciona fortemente com o déficit cognitivo observado em pacientes (Dekosky e Scheff, 1990; Heinonen *et al.*, 1995; Masliah, 1995).

Evidências sugerem que os peptídeos β -amiloide ($A\beta$) têm papel central na patogenicidade da DA, uma vez que mutações genéticas que resultam no aumento da produção dos $A\beta$ estão relacionadas ao início precoce da DA (Butterfield e Boyd-Kimball, 2004). Os $A\beta$ são derivados do mau processamento da *proteína precursora amiloide* (APP, em inglês) (Hardy e Higgins, 1992), quando essa proteína é clivada pelas enzimas β -secretase e γ -secretase, gerando oligômeros tóxicos dos $A\beta$ contendo principalmente 40 ou 42 aminoácidos (Selkoe, 2001; Karran, Mercken e De Strooper, 2011).

Vários estudos demonstram a participação da proteína tau na toxicidade induzida pelos $A\beta$ (Hooper, Killick e Lovestone, 2008; Hernandez *et al.*, 2010; Bloom, 2014). As primeiras evidências experimentais que ligam funcionalmente os $A\beta$ e a proteína tau foram obtidas em animais transgênicos que acumulam emaranhados

neurofibrilares devido à superexpressão da proteína tau com a mutação P301L. Utilizando a injeção intracerebroventricular de A β sintéticos nos animais transgênicos, Götz e colaboradores (Götz *et al.*, 2001) demonstraram que o número de emaranhados neurofibrilares nos corpos celulares de neurônios localizados na amígdala que projetavam para o local da injeção era 5 vezes maior que em animais não transgênicos. Mais tarde, demonstrou-se que os A β ativam a enzima glicogênio-sintase-cinase-3 β (GSK-3 β), culminando com a hiperfosforilação da proteína tau (Takashima, 2006; Terwel *et al.*, 2008), causando sinaptotoxicidade e seu acúmulo nos emaranhados neurofibrilares (Crespo-Biel, Theunis e Van Leuven, 2012).

A astrogliose (ou gliose reativa) é outra alteração importante associada às doenças neurológicas e neurodegenerativas, inclusive à toxicidade induzida pelos A β . Neste evento, os astrócitos sofrem modificações estruturais formando uma barreira física entre as células danificadas e células saudáveis, isolando as placas amiloides na DA (Wyss-Coray *et al.*, 2000). A astrogliose é caracterizada pela hipertrofia dos processos celulares e aumento na expressão de filamentos intermediários, principalmente a proteína glial fibrilar acídica (GFAP), o principal constituinte do sistema de filamentos de astrócitos maduros (Pekny e Pekna, 2004). Além disso, demonstrou-se que os astrócitos interagem fisicamente com as placas amiloides, porém não influenciam a síntese ou o metabolismo dos peptídeos (Eleuteri *et al.*, 2015).

Alterações patológicas nos sistemas de neurotransmissão glutamatérgica e colinérgica são associadas aos sintomas clínicos característicos da DA. Em relação ao sistema colinérgico, sabe-se que os A β diminuem a liberação, síntese e o transporte axonal da acetilcolina (ACh) e a disfunção colinérgica é correlacionada ao declínio cognitivo precoce observado na DA (Auld *et al.*, 2002; Terry e Buccafusco, 2003; Parsons *et al.*, 2013). A análise *post mortem* de amostras de neocórtex obtidas de indivíduos com DA demonstrou redução na captação de colina, na atividade da acetilcolinesterase e na síntese de ACh (Sims *et al.*, 1983). A participação do sistema colinérgico na formação da memória já foi amplamente demonstrada, uma vez que lesões nas aferências colinérgicas que projetam desde o prosencéfalo basal ao hipocampo e córtex induzem perda de memória em animais e humanos (Terry e Buccafusco, 2003).

1.2 A β e a transmissão glutamatérgica

O acúmulo de A β nas sinapses é capaz de exacerbar a transmissão glutamatérgica (Parameshwaran, Dhanasekaran e Suppiramaniam, 2008).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, sendo responsável por cerca de 70% da neurotransmissão excitatória do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, particularmente no córtex e hipocampo (Danysz *et al.*, 2000). O glutamato exerce papel importante em processos fisiológicos e patológicos através de receptores metabotrópicos (acoplados à proteína G) e ionotrópicos (canais iônicos, entre eles cainato, AMPA e NMDA). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos, especialmente o receptor NMDA, desempenham um papel fundamental nos processos de plasticidade sináptica relacionados com a potenciação de longo prazo (LTP), um evento central associado ao aprendizado e à memória (Beas-Zarate *et al.*, 2001; Macdonald, Jackson e Beazely, 2006). Quando o glutamato ativa o receptor NMDA, íons de cálcio fluem para o neurônio pós-sináptico (Dingledine *et al.*, 1999). Em condições fisiológicas normais, esse processo ativa cascatas de sinalização intracelulares que culminam em processos como a LTP (Cacabelos, Takeda e Winblad, 1999). Porém, o glutamato produz um efeito tóxico aos neurônios quando se encontra em excesso na fenda sináptica (efeito denominado de excitotoxicidade glutamatérgica), levando à ativação sustentada dos receptores NMDA e ao fluxo constante de Ca^{2+} para o interior dos neurônios pós-sinápticos, produzindo um efeito neurodegenerativo progressivo (Cacabelos, Takeda e Winblad, 1999; Parsons *et al.*, 2013). Portanto, a retirada do glutamato da fenda sináptica constitui um importante mecanismo para manter os níveis extracelulares de glutamato em concentrações normais, evitando a morte neuronal. No SNC de mamíferos, existem dois mecanismos que controlam os níveis extracelulares de glutamato: a família de transportadores de glutamato dependente de sódio (Na^+) e o trocador cistina-glutamato (Danbolt, 2001; Sheldon e Robinson, 2007).

Os transportadores dependentes de Na^+ co-transportam duas ou três moléculas de Na^+ e um próton para cada molécula de glutamato (ou aspartato). Ao final, um íon de potássio (K^+) é transportado para fora, reorientando o sítio de ligação para o glutamato ao meio extracelular (Zerangue e Kavanaugh, 1996; Levy, Warr e Attwell, 1998). Foram identificados cinco transportadores dependentes de Na^+ diferentes, que compartilham entre 50-60% de similaridade na sequência de aminoácidos. O GLAST (sigla em inglês para transportador de glutamato/aspartato) ou EAAT1, para o clone em humanos (sigla em inglês para transportador de aminoácidos excitatórios 1) e o GLT-1 (transportador de glutamato-1) ou EAAT2 em humanos, são expressos principalmente em astrócitos, e estudos de microscopia eletrônica demonstraram que esses transportadores se localizam nos processos

astrocíticos próximos às sinapses (Chaudhry *et al.*, 1995; Lehre *et al.*, 1995). Outros dois transportadores – o EAAC1 (sigla em inglês para carreador de aminoácidos excitatórios 1), ou EAAT3 (em humanos) e o EAAT4 são considerados transportadores neuronais (Rothstein *et al.*, 1994; Furuta *et al.*, 1997), enquanto o EAAT5 é expresso em fotorreceptores e nas células bipolares da retina (Arriza *et al.*, 1997).

O trocador cistina-glutamato – ou sistema Xc⁻ (sigla para a denominação em inglês, *eXchanger Carrier*) – é um antiporter de cistina e glutamato, que transporta cistina para o meio intracelular e libera glutamato para o meio extracelular. Este trocador provê às células o dipeptídeo precursor do aminoácido cisteína para a síntese de glutatona enquanto libera glutamato (Aoyama, Watabe e Nakaki, 2008). O sistema Xc⁻ é composto por duas subunidades: a subunidade regulatória 4F2, necessária para a localização do dímero na membrana celular, e a subunidade funcional xCT, responsável pelo transporte das moléculas (Conrad e Sato, 2012). Análises imunoistoquímicas revelaram a presença desses transportadores principalmente em astrócitos da região CA1 do hipocampo, e também em alguns subtipos celulares no cerebelo (Pow, 2001; Mcbean, 2002).

A toxicidade glutamatérgica está intimamente envolvida com várias doenças agudas e crônicas do SNC, como isquemia, convulsões, traumas cerebrais e doenças neurodegenerativas, principalmente a DA (Lipton e Rosenberg, 1994; Meldrum, 1994; Allen, Karadottir e Attwell, 2004; Maragakis e Rothstein, 2004). Nas sinapses glutamatérgicas, o A β é capaz de reduzir a expressão dos receptores ionotrópicos de glutamato (Snyder *et al.*, 2005; Priller *et al.*, 2009) e também já foi relatado que ele pode aumentar excessivamente sua permeabilidade a Ca²⁺ (De Felice *et al.*, 2007; Ferreira e Klein, 2011), além de diminuir a captação de glutamato da fenda sináptica (Francis, 2003; Piermartiri *et al.*, 2010), induzir disfunção mitocondrial e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Bicca *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2011), alterações que, em conjunto, culminam no processo de excitotoxicidade.

1.3 A β e guanosina

Um estudo publicado em 2004 demonstrou o efeito protetor da guanosina em cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y contra a toxicidade induzida pelo peptídeo A β ₂₅₋₃₅. Neste estudo, guanosina (300 μ M, 24 h) diminuiu significativamente a morte por apoptose induzida por A β ₂₅₋₃₅ (Pettifer *et al.*, 2004). Em 2010, Tarozzi e colaboradores demonstraram que células SH-SY5Y submetidas à

toxicidade de oligômeros do peptídeo $A\beta_{1-42}$ apresentaram aumento da morte por apoptose e produção de EROs, efeitos revertidos pela guanosina (Tarozzi *et al.*, 2010). Neste mesmo estudo, a guanosina inibiu a liberação intra e extracelular de $A\beta_{1-42}$ induzidas por estresse oxidativo, além de diminuir a atividade da enzima β -secretase, uma das principais enzimas na cascata proteolítica de produção dos $A\beta$ (Tamagno *et al.*, 2008). Apesar deste efeito importante da guanosina ter sido demonstrado *in vitro*, não existem outros estudos que investiguem seu efeito neuroprotetor em modelos *in vitro* e *in vivo* para a DA.

Existem diversos modelos para o estudo dos mecanismos associados aos danos neurais induzidos pelos peptídeos amiloides, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esses modelos são úteis na investigação de novos fármacos que atuem no tratamento dos sintomas da DA, ou mesmo que possam reduzir a progressão da doença. Muitos estudos utilizam uma única infusão do peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos, modelo que parece mimetizar os estágios iniciais da DA (Medeiros *et al.*, 2007; Prediger *et al.*, 2007; Piermartiri *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2015). Apesar de não induzir todas as características da DA (formação de placas amiloide, fosforilação da proteína tau e grande perda neuronal), este modelo é útil para estudar os mecanismos de toxicidade do $A\beta$ e possíveis estratégias terapêuticas que inibam ou ainda revertam os danos associados à sua toxicidade.

2. Justificativa

Uma vez que a expectativa de vida tem aumentado consideravelmente, é provável que o número de pessoas acometidas pela doença de Alzheimer também aumente, gerando diminuição da qualidade de vida e altos custos com cuidados em saúde. Assim, inúmeros esforços vêm sendo empregados na pesquisa sobre os mecanismos que levam ao desenvolvimento da doença de Alzheimer, bem como sobre estratégias de neuroproteção que impeçam o avanço dessa doença, que atualmente é considerada progressiva e sem cura.

O nosso grupo de pesquisa tem intensificado seus estudos sobre o efeito neuroprotetor da guanosina, já demonstrado em vários modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Além disso, a guanosina é capaz de reverter a toxicidade induzida pelo peptídeo β -amiloide (em experimentos *in vitro*) relacionado à indução do processo de excitotoxicidade glutamatérgica e à doença de Alzheimer. Porém, esse efeito da guanosina ainda não foi demonstrado *in vivo*.

3. Objetivos

O objetivo principal deste capítulo foi demonstrar o possível efeito neuroprotetor da guanosina em modelo de toxicidade induzida pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$, um modelo animal da DA.

3.1 *Objetivos específicos*

1. Avaliar o efeito da guanosina sobre o déficit cognitivo induzido pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos;
2. Avaliar o efeito da guanosina sobre o comportamento tipo-depressivo induzido pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos;
3. Investigar as alterações na transmissão glutamatérgica induzida pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$ e o efeito da guanosina sobre essas alterações;
4. Avaliar os níveis de astrogliose e perda de densidade sináptica induzidos pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$ e o efeito da guanosina sobre esses parâmetros;
5. Analisar os níveis de purinas derivadas da guanina e da adenina no hipocampo dos animais tratados com $A\beta_{1-40}$ e guanosina.

4. Materiais e métodos

4.1 Preparação do peptídeo β -amilóide₁₋₄₀

O peptídeo A β ₁₋₄₀ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) foi dissolvido em tampão fosfato estéril (PBS, pH 7,4; concentração 1mg/mL) e incubado a 37°C por 4 dias, conforme descrito anteriormente (Prediger *et al.*, 2007; Piermartiri *et al.*, 2010). Alíquotas do peptídeo (100 μ L) foram armazenadas a – 20°C até o momento da administração. Para identificação do perfil de agregação através de visualização ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM-1011) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC, 2 μ L da solução foram adicionados à superfície de telas Formvar de cobre revestidas com parlódio e contrastados com ácido fosfotúngstico 2%.

4.2 Infusão intracerebroventricular do peptídeo β amilóide₁₋₄₀

Foram utilizados camundongos Swiss machos com idade aproximada de 90 dias, mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica em condições padrão de aclimação. As metodologias envolvendo uso de animais utilizadas neste estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UFSC sob protocolo PP838 – Ofício nº 108/CEUA/PROPESQ/2013.

A indução de toxicidade pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ foi realizada conforme descrito anteriormente (Prediger *et al.*, 2007), com pequenas modificações. Resumidamente, a aplicação intracerebroventricular (i.c.v) da solução de A β ₁₋₄₀ (A β ; 400 pmol/animal, 3 μ L) foi realizada à mão livre com auxílio de bomba de infusão (velocidade 3 μ L/minuto). Animais controle receberam PBS estéril nas mesmas condições. A infusão foi realizada a partir do ponto de Bregma (1 mm posterior, 1 mm direita e 3 mm abaixo) visando o ventrículo direito.

4.3 Protocolo de tratamento

O tratamento com guanosina seguiu um cronograma de tratamento baseado em estudos prévios que evidenciaram o efeito neuroprotetor da guanosina ao reverter danos funcionais e celulares induzidos em modelo de isquemia cerebral em camundongos e ratos (Chang *et al.*, 2008; Rathbone *et al.*, 2011; Connell *et al.*, 2013). Logo após a injeção i.c.v, os animais foram tratados com salina (10 mL/kg, grupo controle) ou guanosina (8 mg/kg) pela via i.p., e após 3h, os animais

foram novamente tratados com salina ou guanosina. Nos 14 dias seguintes os animais foram tratados uma vez ao dia com salina ou guanosina. Assim, o presente estudo apresentou quatro grupos de tratamento: PBS + salina, PBS + guanosina; $A\beta$ + salina, $A\beta$ + guanosina. O protocolo seguido neste estudo está demonstrado na Figura 16.

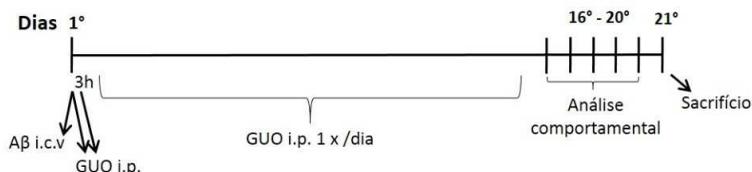


Figura 16. Esquema de tratamentos utilizados no presente trabalho. No primeiro dia, os camundongos receberam uma injeção intracerebroventricular (i.c.v.; 3 μ L) de PBS (controle) ou $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/sítio), e imediatamente foram tratados com salina (10 mL/kg) ou guanosina (8 mg/kg), pela via intraperitoneal (i.p.). Após 3h, os camundongos foram novamente tratados com salina ou guanosina. Durante os 14 dias seguintes, os camundongos receberam uma injeção i.p. com salina ou guanosina, uma vez ao dia. Os animais foram submetidos a testes comportamentais entre os dias 16 e 20 após a infusão i.c.v., e sacrificados no dia 21 para realização dos ensaios bioquímicos.

4.4 Análises comportamentais

Quinze dias após a infusão i.c.v. com o peptídeo $A\beta_{1-40}$, os animais foram submetidos aos testes comportamentais descritos a seguir, na ordem em que estão apresentados. Os animais foram submetidos a apenas um dos testes descritos por dia. Os animais foram ambientados à sala de experimentação por 1h antes da realização dos testes comportamentais, e todos os testes foram realizados em salas com baixa luminosidade, isolada dos experimentadores. Nos testes de habituação ao campo aberto, realocação de objetos e labirinto em Y, pistas visuais foram fixadas nas paredes da sala de experimentação. Os aparatos foram limpos com álcool 5% entre as sessões. Os comportamentos foram filmados e gravados para análise posterior por um experimentador cego aos grupos experimentais.

4.4.1 Campo aberto

O campo aberto consiste em uma arena quadrangular (40 cm x 40 cm, 40 cm de altura) e a habituação dos animais a este ambiente foi analisada. Os animais foram expostos ao campo aberto durante 30 min, e

foram avaliados (1) distância total percorrida; (2) velocidade média; (3) tempo de permanência na área central do campo aberto; e (4) número de entradas na área central do campo aberto (Vinadé *et al.*, 2005; Rial *et al.*, 2014). Os resultados são apresentados como a distância percorrida em intervalos de tempo e correspondem aos 15 min iniciais da exposição ao campo aberto, enquanto os demais parâmetros correspondem ao comportamento avaliado nos primeiros 5 min.

Esta exposição ao campo aberto também foi utilizada como ambientação à arena onde o teste de realocação de objetos foi realizado.

4.4.2 Realocação de objetos

O teste de realocação de objetos foi realizado 24h após a exposição dos animais ao campo aberto, e consistiu em duas exposições de 5 min à arena. Na primeira exposição, dois objetos idênticos (peças Lego® medindo 3 cm x 5 cm x 4 cm) foram colocados em esquinas adjacentes da arena (esquinas esquerda e direita superiores), afastados 8 cm das paredes da arena. Após 90 min, os animais foram novamente expostos à arena, porém o objeto da direita foi deslocado para a esquina oposta (esquina direita inferior, também afastado 8 cm das paredes da arena). Foram analisados o tempo total de exploração dos objetos na primeira e segunda exposição, além do tempo individual de exploração em cada objeto. Por exploração do objeto contabilizou-se o tempo em que o animal olhou, cheirou ou moveu suas vibrissas a 1 cm dos objetos. O índice de discriminação foi obtido analisando-se os dados da segunda exposição dividindo-se o tempo de exploração do objeto realocado dividido pelo tempo total de exploração, vezes 100 (para valores em porcentagem) (Assini, Duzzioni e Takahashi, 2009).

4.4.3 Labirinto em Y

O labirinto em Y permite avaliação da função locomotora geral e de memória de curto prazo, onde a memória espacial é medida pela quantidade de alternâncias espontâneas entre os braços do labirinto. O labirinto consiste em três braços espaçados igualmente em 120°, cada braço medindo 45 cm de comprimento, 15 cm de altura e 5 cm de largura, e identificados como A, B ou C. Os camundongos foram colocados no braço A, e a quantidade de alternâncias entre os braços foi avaliada durante 5 min. Uma entrada foi contabilizada quando o animal entrou com as quatro patas no braço visitado. Considerou-se uma alternância quando três braços diferentes foram visitados em sequência, e a quantidade

máxima de alternâncias espontâneas é quantificada como o número total de entradas nos braços do labirinto menos dois. Assim, a porcentagem de alternâncias corretas foi calculada pela fórmula [(alternâncias realizadas/número máximo de alternâncias) x 100] (Kokkinidis, 1986; Onalapo *et al.*, 2012).

4.4.4 Teste de borrfio de sacarose

O teste do borrfio de sacarose (*Splash test*) consistiu em borrfiar uma solução contendo sacarose 10% no dorso do animal, onde são contabilizados o tempo total de autolimpeza (seja da face, focinho, cabeça ou corpo inteiro) e a latência do animal em iniciar esse comportamento durante 5 min (Moretti *et al.*, 2012). Os animais foram colocados em funis de vidro para a observação do comportamento e ambientados nos funis durante 10 min antes do início do teste. Os comportamentos avaliados nesse teste são considerados como autocuidado e a frequência de *grooming* é considerada um comportamento motivacional, relacionado à apatia observada em pacientes depressivos (Taksande *et al.*, 2013).

4.4.5 Teste de suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda foi utilizado para avaliação do comportamento tipo depressivo adotado pelos animais diante de uma situação inescapável, onde após um período inicial de agitação, os animais permanecem imóveis. Neste teste, os animais foram suspensos 50 cm acima do chão e presos pela extremidade da cauda por fita adesiva (aproximadamente 2 cm da ponta da cauda), e o tempo de imobilidade foi contabilizado durante 6 min. O teste de suspensão pela cauda possui validade preditiva, uma vez que antidepressivos clássicos diminuem o tempo de imobilidade (Steru *et al.*, 1985).

4.5 Captação de aminoácidos excitatórios

A captação de L-[³H]glutamato em fatias de hipocampo foi avaliada como previamente descrito (Molz *et al.*, 2005). Após o sacrifício dos animais, 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. As fatias hipocampais foram incubadas 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 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, o meio de incubação foi descartado e as fatias 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. 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. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (Lowry *et al.*, 1951), utilizando BSA (Sigma) como padrão.

4.6 Liberação de aminoácidos excitatórios

Para o ensaio de liberação de aminoácidos excitatórios, D-[³H]aspartato foi utilizado ao invés de L-[³H]glutamato, evitando a metabolização de glutamato nos compartimentos intracelulares (Molz *et al.*, 2008). A liberação de D-[³H]aspartato foi realizada em fatias hipocampais após pequenas adaptações do protocolo sugerido por (Tavares *et al.*, 2005). As fatias foram incubadas com 0,33 µCi/mL D-[³H]aspartato com 100 µM de aspartato (concentração final) durante 15 min para a captação prévia de D-[³H]aspartato. As fatias foram lavadas com 1 mL HBSS gelado. Para induzir a liberação de glutamato, as fatias foram incubadas em HBSS contendo 40 mM KCl (substituindo NaCl nas proporções adequadas) para induzir despolarização. Os resultados foram apresentados como nmol de D-[³H]aspartato liberado por miligrama de proteína por minuto. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando BSA (Sigma) como padrão.

4.7 Obtenção de amostras para realização de ensaios de imunistoquímica

Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de hidrato de cloral 0,06% e após perda dos reflexos, foram perfundidos com solução

PBS e em seguida paraformaldeído 4% (diluído tampão PBS 0,1 M). Os cérebros foram dissecados e mantidos em paraformaldeído 4% durante aproximadamente 16h. Após, os cérebros foram transferidos para solução de sacarose 30% (em tampão PBS 0,1 M) por aproximadamente 48h, e submetidos a rápido congelamento utilizando isopentano e nitrogênio líquido. As amostras foram identificadas e mantidas a -80°C .

Cortes coronais da região hipocampal com $40\ \mu\text{m}$ foram obtidos em criostato (LEICA, localizado no Laboratório Multiusuário do Ensino de Biologia, UFSC), e mantidos em solução anti-congelamento (PBS/etileno glicol 30%/glicerol 30%) a -20°C até o momento do processamento.

4.7.1 Imunoistoquímica de fluorescência

Fatias cerebrais foram lavadas em TBS-T, bloqueadas com 5% BSA/TBS-T por 3 h, e incubadas com anticorpos primários anti-GFAP (diluição 1:500, anticorpo obtido de camundongo; Sigma-Aldrich) anti-sinaptofisina (diluição 1:500, anticorpo obtido de coelho; Sigma-Aldrich) ou anti-NeuN (diluição 1:500, anticorpo obtido de camundongo; Millipore) durante 30 h a 4°C , sob agitação constante (aproximadamente 55 rpm). Em seguida, as fatias foram lavadas com TBS-T (quatro lavagens de 10 min cada), e incubadas com anticorpos secundários anti-camundongo (conjugado ao fluoróforo Alexa 488 para o GFAP e Alexa 594 para sinaptofisina; diluição 1:500; Invitrogen) e anti-coelho (conjugado ao fluoróforo Alexa 594; diluição 1:500; Invitrogen) durante 2 h a temperatura ambiente, sob agitação constante. Após uma lavagem com TBS-T (10 min), as fatias foram incubadas com Hoechst ($0,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$) durante 10 min, e em seguida lavadas duas vezes com TBS. As fatias foram transferidas para lâminas e as lamínulas foram colocadas utilizando Vectashield® (Vector Laboratories, Inc.) como meio de montagem. As fatias foram visualizadas em um microscópio de fluorescência (Olympus - Modelo IX 71) 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 das regiões CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo foram obtidas por meio de uma câmera (Olympus C5060) acoplada ao microscópio com sistema de captura (Ludka *et al.*). A fluorescência foi analisada pela densitometria pelo programa computacional Image J® 1.36 (National Institute of Health, USA).

4.8 Imunodetecção de proteínas

Após dissecação em tampão KRB gelado, os hipocampos foram homogeneizados mecanicamente em 300 µL de tampão de amostra [Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich)] e os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g a 4°C durante 10 min. Os sobrenadantes foram diluídos 1/1 (v/v) em solução Tris 100 mM pH 6,8/ EDTA 4 mM/ SDS 8%, fervidos durante 5 min, e após dosagem de proteínas (Peterson, 1977) foram adicionados glicerol 40% glicerol (glicerol, Tris 100 mM, azul de bromofenol; pH 6,8) na proporção de 25:100 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final de 8%).

As proteínas (50 [Símbolo]g/poço) foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE (gel de poliácridamida contendo SDS), utilizando géis de entrada 4% e separação 10%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 70 mV por gel durante aproximadamente 2 h. Após a corrida, as proteínas foram transferidas do gel de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45 µm) (90 min 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 o anticorpo específico anti-sinaptofisina (fonte: coelho, diluição 1:1000, Sigma-Aldrich). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário (ligado à peroxidase) anti-coelho (diluição 1:5000, Santa Cruz) e após lavagens, foram reveladas em fotodocumentador Chemidoc ® (BioRad) após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose (Kit ECL), de acordo com as recomendações do fabricante. As imagens foram quantificadas por densitometria das bandas proteicas dos complexos imunes (software Image Lab, Bio-Rad).

4.9 Quantificação de purinas e metabólitos

Os hipocampos foram homogeneizados em 300µL de tampão fosfato (PBS) e TFA 10%. Logo após, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g a 4°C por 10 min, e o sobrenadante foi coletado. Para a análise de purinas pelo método de HPLC, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi neutralizada com 75 µL de bicarbonato de

potássio 1,5M (K_2CO_3), e filtrada em filtro de 0,22 μ m. As amostras foram armazenadas a $-70^\circ C$ até o momento da análise por HPLC.

A determinação das concentrações de purinas presentes nos homogenatos foi realizada através da metodologia de HPLC (*high-performance liquid chromatography*) conforme (Schmidt *et al.*, 2008; Schmidt, Tort, *et al.*, 2009). O sistema de cromatografia utilizado foi Shimadzu LC-20AT [sistema de bomba quaternária, degaseificadora à vácuo, válvula de injeção automática (loop de 1mL), detector de ultravioleta, coluna Supelco C18 (250 mm x 4.6 mm)]. O fluxo da fase móvel foi de 1,2 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida em $24^\circ C$. A composição dos tampões utilizados manteve-se inalterada (tampão A: 150 mM de cloreto de potássio em 150 mM de tampão fosfato pH 6.0; tampão B: 15% de acetonitrila em tampão A). O perfil do gradiente foi modificado para o seguinte teor de tampão B, na fase móvel: 0% a 0min, 2% em 0,05min, 7% em 2,45min, 50% em 10min, 100% em 11min, 100% em 12,30min e 0% em 12,40min. O volume de amostra injetada foi de 20 μ L a cada 17min. A absorbância foi lida em 254 nm. Os compostos foram identificados pelo tempo de migração e espectro UV, comparando com padrões relativos.

Foram analisados os seguintes compostos: adenosina-5'-trifosfato (ATP), adenosina-5'-difosfato (ADP), adenosina (ADO), inosina-5'-monofosfato (Cobb *et al.*), inosina (INO), hipoxantina (HIPO), guanosina-5'-trifosfato (GTP), guanosina-5'-difosfato (GDP), guanosina-5'-monofosfato (GMP), guanosina (GUO), xantina (XAN) e ácido úrico (AU).

4.10 Análise estatística

Os dados são apresentados como as médias + erro padrão das médias (E.P.M.). No teste de realocação de objetos, o teste *t one-sample* foi usado para determinar se a discriminação dos objetos foi diferente de 50%. Para avaliar diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, a análise estatística realizada foi ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls, quando necessário. $P < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância.

5. Resultados

Uma alíquota do $A\beta_{1-40}$ utilizado neste estudo foi preparada para análise em microscópio de transmissão eletrônico e observação do perfil de agregação. Através de comparação com as imagens publicadas nos estudos de (Poduslo *et al.*, 2012; Pujadas *et al.*, 2014), podemos sugerir que nossa alíquota (figura 17) apresenta em sua maioria formas agregadas, mas não apresenta formas fibrilares.

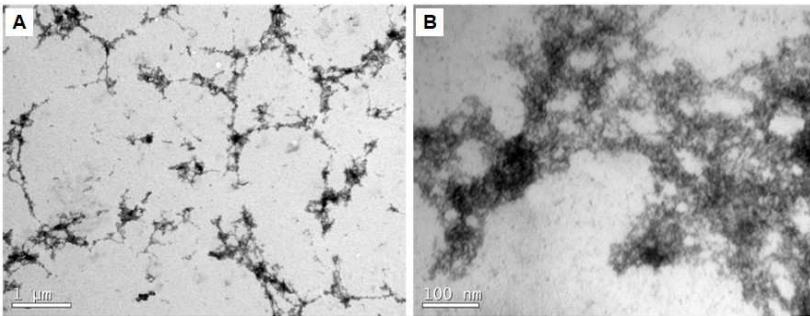


Figura 17. Imagens do peptídeo $A\beta_{1-40}$ obtidas em Microscopia Eletrônica de Transmissão. No presente estudo, o $A\beta_{1-40}$ foi diluído em tampão PBS (pH 7,4; 1 mg/mL) e incubado a 37°C por 4 dias. 2 μ L da solução foram adicionados à superfície de telas Formvar de cobre revestidas com parlódio, contrastados com ácido fosfotúngstico 2% e levados para observação ao microscópio eletrônico de transmissão. **A:** Imagem obtida com ampliação de 15000x (escala: 1 μ m); **B:** Imagem obtida com ampliação de 100000x (escala: 100 nm).

5.1 Alterações comportamentais induzidas pela infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ em camundongos

Imediatamente e 3 h após a infusão i.c.v. do $A\beta_{1-40}$, os animais foram tratados com salina (10 μ L/mg) ou guanosina (8 mg/mL). Nos 14 dias consecutivos, os animais foram tratados uma vez ao dia com salina ou guanosina. Vinte e quatro horas após a última administração, os animais foram expostos ao campo aberto.

O gráfico 18A representa a distância percorrida pelo animal no campo aberto em função do tempo, apresentado em intervalos de tempo. Podemos observar que a distância percorrida diminui em relação ao tempo, demonstrando habituação dos animais ao ambiente. Não foram

encontradas neste parâmetro diferenças entre os grupos tratados. A velocidade média dos animais neste teste também não sofreu alterações de acordo com os tratamentos recebidos (Figura 18B). Os gráficos 18C e 18D apresentam as análises realizadas em relação ao comportamento dos animais referente à área central do campo aberto. Os resultados demonstram que não há diferenças entre os grupos quanto ao tempo de permanência na área central (Figura 18C) nem quanto ao número de entradas na área central (Figura 18D).

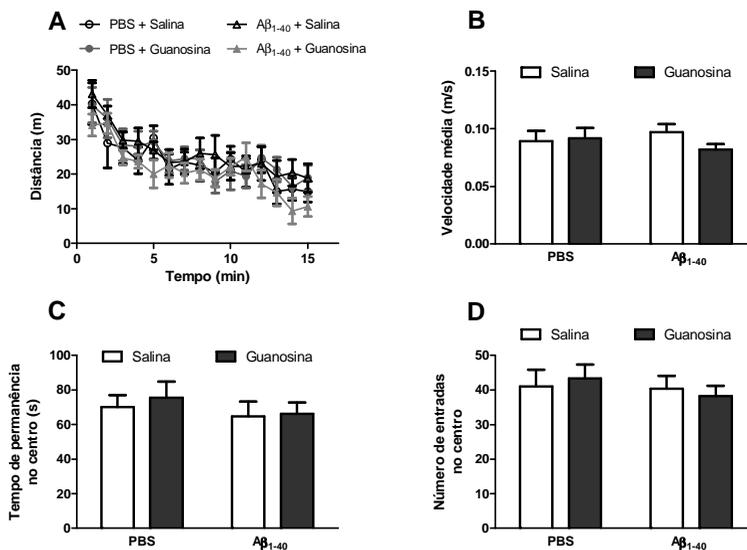


Figura 18. Avaliação da atividade motora de camundongos submetidos à toxicidade induzida pelo peptídeo Aβ₁₋₄₀ no teste do campo aberto. Após 16 dias da infusão i.c.v com o Aβ₁₋₄₀ (400 p/mol sítio) ou PBS (grupo controle) os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto para avaliação da distância percorrida (A), velocidade média (B), tempo de permanência (C) e número de entradas (D) na área central do campo aberto. Os camundongos foram tratados com guanosina (8 mg/kg, i.p.) ou salina (10 μL/mg, i.p) durante 14 dias após a infusão i.c.v. Os valores representam as médias + erro padrão das médias (N = 9-10). A análise estatística sugere que não houve diferença estatística entre os tratamentos (ANOVA de duas vias).

A memória espacial dos animais foi avaliada através do teste de realocação de objeto e do labirinto em Y, realizados respectivamente nos dias 16 e 17 após a infusão i.c.v. do Aβ₁₋₄₀. No teste de realocação de objeto, os animais foram apresentados a dois objetos idênticos,

posicionados paralelamente em uma das laterais do campo aberto, e reapresentados a esses objetos após 90 min. Na nova exposição, um dos objetos foi movido para a esquina oposta ao primeiro objeto. Em ambas exposições, os animais tiveram 5 min para explorar os objetos. A figura 19 mostra o índice de discriminação do objeto realocado, apresentado como a porcentagem do tempo em que o animal permaneceu explorando o objeto realocado em relação ao tempo total de exploração dos dois objetos (medidas obtidas após a segunda exposição). O teste *t* foi utilizado para avaliar se os resultados são diferentes de 50% (pois animais que não reconhecem os objetos passam 50% do tempo explorando cada objeto). A análise sugere que todos os grupos são diferentes de 50%, menos o grupo $A\beta_{1-40}$ + salina. A ANOVA de duas vias sugere diferença significativa entre os animais do grupo $A\beta_{1-40}$ + salina em comparação ao grupo controle (PBS + salina; $F_{(1,29)}: 4,9329$; $P < 0,05$). O tratamento com guanosina reverteu parcialmente a alteração induzida pelo $A\beta_{1-40}$ (grupo $A\beta_{1-40}$ + guanosina), pois a análise estatística não apresentou diferenças deste grupo em relação ao grupo PBS + salina ($P = 0,4$) e ao grupo $A\beta_{1-40}$ + salina ($P = 0,5$). Não houve diferença estatística entre o tempo que os animais permaneceram explorando os dois objetos na primeira exposição (dados não mostrados).

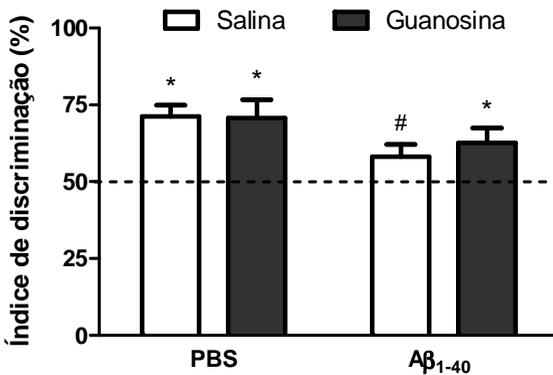


Figura 19. Efeito da infusão i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ sobre a memória espacial de curto prazo avaliada no teste de realocação de objetos. Após 17 dias da infusão i.c.v. com o $A\beta_{1-40}$ (400 p/mol sítio) ou PBS (grupo controle) os camundongos foram submetidos ao teste de realocação de objetos. Os camundongos foram tratados com guanosina (8 mg/kg, i.p.) ou salina (10 μ L/mg, i.p.) durante 14 dias após a infusão i.c.v. Os valores representam as médias + erro padrão das médias ($N = 9-10$). O teste *t* sugere que $P < 0,05$ (*) comparados a 50% do índice de

discriminação dos objetos. Além disso, a análise estatística sugere diferença significativa em relação ao grupo PBS + salina ($^{\#} P < 0,05$; ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls).

No 18º dia, a memória dos animais foi avaliada no labirinto em Y, onde o número de alternâncias consecutivas entre os três braços do labirinto é considerado como memória espacial. Os resultados sugerem que não houve déficit cognitivo neste teste, pois não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados em comparação ao grupo controle (Figura 20).

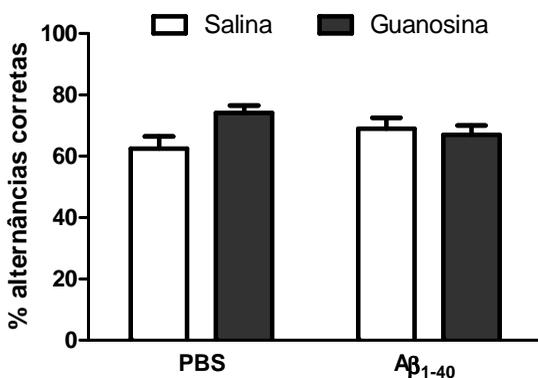


Figura 20. Efeito da infusão i.c.v. do Aβ₁₋₄₀ sobre a memória espacial de curto prazo avaliada no labirinto em Y. Após 18 dias da infusão i.c.v. com o Aβ₁₋₄₀ (400 p/mol sítio) ou PBS (grupo controle) os camundongos foram submetidos ao labirinto em Y. Os camundongos foram tratados com guanosina (8 mg/kg, i.p.) ou salina (10 μL/mg, i.p) durante 14 dias após a infusão i.c.v. Os valores representam as médias + erro padrão das médias ($N = 9-10$). A análise estatística sugere que não houve diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA de duas vias).

O teste de borrfio da sacarose permite avaliar o comportamento de autolimpeza dos animais, e é considerado um teste preditivo de depressão. Neste teste, podemos analisar dois componentes: a latência para o início da autolimpeza e o tempo total gasto pelo animal realizando esse comportamento. Os animais receberam um borrfio de solução sacarose 10% e imediatamente foram colocados em funis de vidro para observação do comportamento de autolimpeza durante 5 min. Os resultados apresentados na figura 21A sugerem que a infusão i.c.v. do

peptídeo $A\beta_{1-40}$ aumentou significativamente a latência para o início do comportamento de autolimpeza ($F_{(1,30)} = 7,3079$, $P < 0,05$), e o tratamento com guanosina preveniu esse efeito ($P = 0,05$). O tempo total de autolimpeza não foi diferente entre os grupos avaliados (Figura 21B).

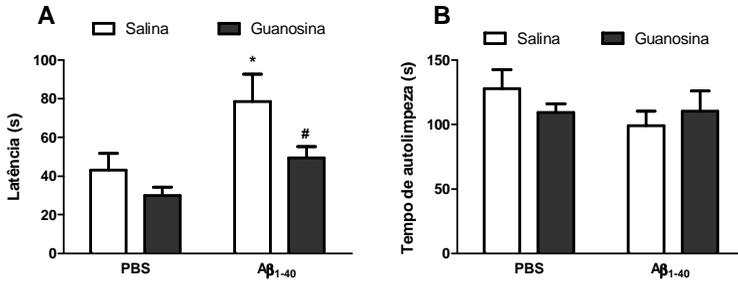


Figura 21. Efeito da infusão i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ sobre o comportamento de autolimpeza. Após 19 dias da infusão i.c.v com o $A\beta_{1-40}$ (400 p/mol sítio) ou PBS (grupo controle) os camundongos foram submetidos ao teste de borrifo de sacarose 10%. A latência para início do comportamento de autolimpeza (A) e o tempo total de autolimpeza (B) foram contabilizados durante 5 min. Os camundongos foram tratados com guanosina (8 mg/kg, i.p.) ou salina (10 μ L/mg, i.p) durante 14 dias após a infusão i.c.v. Os valores representam as médias + erro padrão das médias ($N = 9-10$). A análise estatística sugere diferença significativa em relação ao grupo PBS + salina (* $P < 0,05$) e em relação ao grupo $A\beta_{1-40}$ + salina (# $P < 0,05$; ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls).

Outro teste utilizado para investigação de comportamento tipo-depressivo é o teste de suspensão pela cauda. Neste teste, os animais são suspensos pela cauda com auxílio de fita crepe, a 50 cm do chão, e o tempo de imobilidade dos animais é contabilizado durante 6 min. Os resultados apresentados na figura 22 sugerem que não houve diferença estatística entre os grupos, apesar de haver uma tendência de efeito tipo-antidepressivo da guanosina ($P = 0,07$, ANOVA de duas vias).

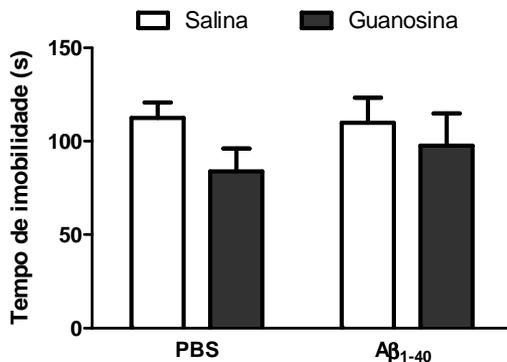


Figura 22. Efeito da infusão i.c.v. do A β ₁₋₄₀ sobre o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda. Após 20 dias da infusão i.c.v. com A β ₁₋₄₀ (400 p/mol sítio) ou PBS (grupo controle) os camundongos foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda, onde os animais foram suspensos pela cauda por 6 min e o tempo de imobilidade foi analisado. Os camundongos foram tratados com guanosina (8 mg/kg, i.p.) ou salina (10 μ L/mg, i.p.) durante 14 dias após a infusão i.c.v. Os valores representam as médias + erro padrão das médias ($N = 9-10$). A análise estatística sugere que não houve diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA de duas vias).

5.2 Efeito do tratamento com Guanosina sobre alterações na captação e liberação de aminoácidos excitatórios induzidas pelo A β ₁₋₄₀

No 21º dia após a infusão do A β , os animais foram sacrificados por decapitação e seus hipocampos dissecados (em tampão Krebs-Ringer gelado) para realização de ensaios bioquímicos. Os experimentos de captação de L-[³H]glutamato e liberação de D-[³H]aspartato foram realizados em fatias hipocampais de 400 μ m.

Os resultados apresentados na Figura 23 demonstram que existe uma tendência à diminuição na captação e aumento da liberação de glutamato (respectivamente, figuras A e C) no grupo de animais que recebeu o peptídeo A β ₁₋₄₀ e tratado com salina (colunas negras), apesar de não haver diferença estatisticamente significativa (ANOVA de duas vias). O grupo de animais que recebeu A β ₁₋₄₀ e foi tratado com guanosina teve um perfil de captação e liberação de glutamato similar ao do grupo controle (PBS + salina), da mesma maneira que o grupo tratado apenas com guanosina (PBS + guanosina). Considerando os dados da captação total e independente de Na⁺ (figura 23B) observamos um aumento da captação independente de Na⁺ causado pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ em relação

ao grupo PBS ($F_{(1,42)} = 0,6692$, $P < 0,05$). O tratamento dos animais com guanosina reverteu este aumento na captação independente de Na^+ ($F_{(1,42)} = 4,10$, $P < 0,05$).

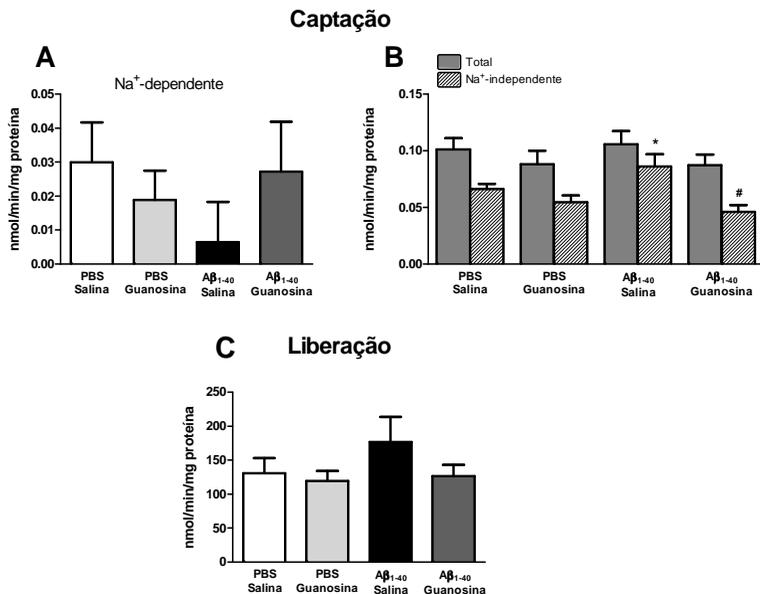


Figura 23. Efeito do tratamento com guanosina sobre a captação e liberação de aminoácidos excitatórios no hipocampo de camundongos submetidos à infusão i.c.v. do A β_{1-40} . Após 21 dias da infusão i.c.v. do A β_{1-40} ou PBS e tratamento com guanosina (8 mg/kg, i.p.) ou salina (10 $\mu\text{L}/\text{mg}$, i.p.), os camundongos foram sacrificados por decapitação e seus hipocampos dissecados em tampão KRB. Fatias de 400 μm foram obtidas para realização dos ensaios de captação de glutamato (**A**, **B**) e liberação de aspartato (**C**). Os resultados apresentados no **painel A** representam os valores calculados para a captação dependente de Na^+ e no **painel B** representam os valores obtidos de captação total e independente de Na^+ . Os valores representam as médias + erro padrão das médias ($N = 6-8$). A análise estatística sugere diferença significativa em relação ao grupo PBS + salina (* $P < 0,05$) e em relação ao grupo A β_{1-40} + salina (# $P < 0,05$; ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls).

5.3 Avaliação do efeito da guanosina sobre a neurodegeneração induzida pela infusão do A β_{1-40}

A possível perda neuronal induzida pelo $A\beta_{1-40}$ foi avaliada através da marcação de núcleos neuronais, utilizando imunistoquímica para a proteína NeuN. A análise dos resultados obtidos sugere que a infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ apresentou uma tendência à diminuição na expressão de NeuN nas regiões CA3 e CA1 (figura 24), porém a análise estatística dos resultados não revelou significância.

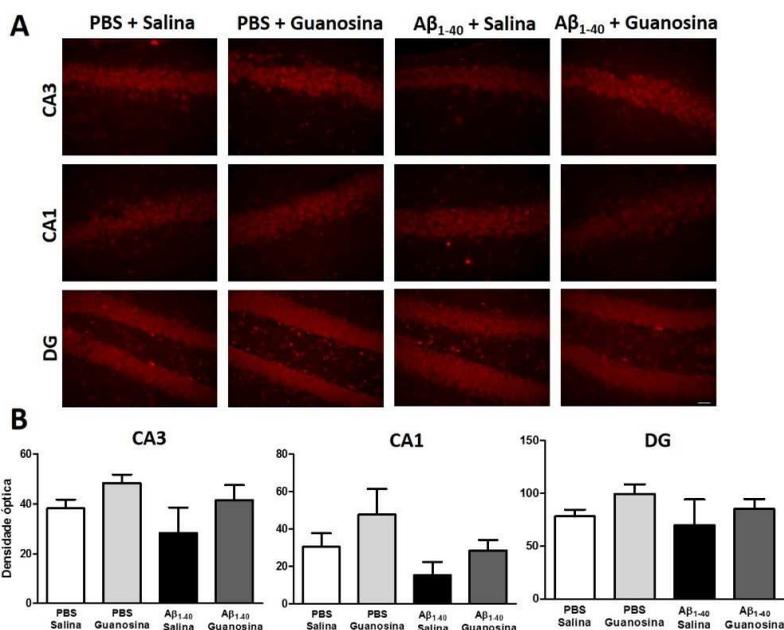


Figura 24. Avaliação da expressão de NeuN nas regiões CA3, CA1 e giro denteado (DG) dos hipocampus de camundongos submetidos à infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$. Os camundongos foram tratados com guanosina (8 mg/kg, i.p.) ou salina (10 μ L/mg, i.p) durante 14 dias consecutivos após a infusão i.c.v do $A\beta_{1-40}$ (400 p/mol sítio) ou PBS (grupo controle). **(A)** Fotomicrografias representativas da imunistoquímica para NeuN em fatias de hipocampo 21 dias após a infusão $A\beta_{1-40}$ obtidas com objetiva de 20x. **(B)** Os gráficos representam médias + erro padrão das médias da quantificação de fluorescência obtida com o programa Image J ($N = 3-4$). A análise estatística sugere que não houve diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA de duas vias).

5.4 Avaliação da expressão da proteína glial fibrilar acídica (GFAP) após infusão do peptídeo $A\beta_{1-40}$

A avaliação por imunistoquímica da proteína GFAP demonstrou uma diminuição na expressão de GFAP na região CA1 do hipocampo de camundongos que receberam infusão do $A\beta_{1-40}$ comparados ao grupo PBS + salina (Figura 25; $F_{(1,7)}: 22,715, P < 0,05$), e o tratamento com guanosina não reverteu esta alteração. Não foram observadas diferenças nas expressões GFAP nas regiões CA3 e giro denteado.

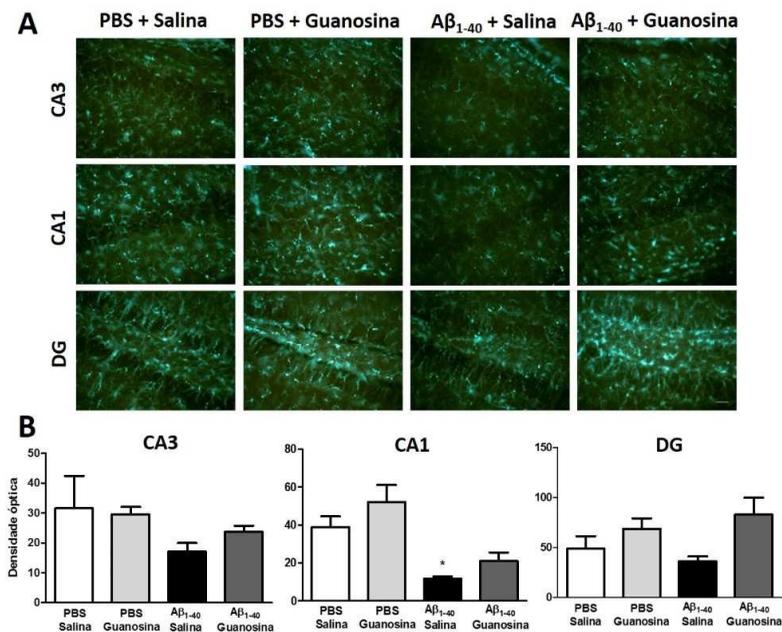


Figura 25. Avaliação da expressão de GFAP nas regiões CA3, CA1 e giro denteado (DG) dos hipocampus de camundongos submetidos à infusão i.c.v de $A\beta_{1-40}$. Os camundongos foram tratados com guanosina (8 mg/kg, i.p.) ou salina (10 μ L/mg, i.p) durante 14 dias consecutivos após a infusão i.c.v do $A\beta_{1-40}$ (400 p/mol sítio) ou PBS (grupo controle). (A) Fotomicrografias representativas da imunistoquímica para GFAP em fatias de hipocampo 21 dias após a infusão $A\beta_{1-40}$ obtidas com objetiva de 20x. (B) Os gráficos representam médias + erro padrão das médias da quantificação de fluorescência obtida com o programa Image J ($N = 3-4$). A análise estatística sugere que * $P < 0,05$ em relação ao grupo PBS (ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls).

5.5 Avaliação da expressão da proteína sináptica sinaptofisina após infusão do A β ₁₋₄₀

A toxicidade do A β ₁₋₄₀ sobre as sinapses foi avaliada através da expressão da proteína sinaptofisina aplicando-se técnicas de imunistoquímica por fluorescência e imunodeteção por Western blot. Os resultados expostos na Figura 26 demonstram que a infusão do A β ₁₋₄₀ não causou diminuição na expressão da sinaptofisina comparada ao grupo controle (PBS + salina). Também não foi observado efeito do tratamento com guanosina sobre a expressão de sinaptofisina em nenhuma das regiões hipocâmpais avaliadas (CA1, CA3 e giro denteado).

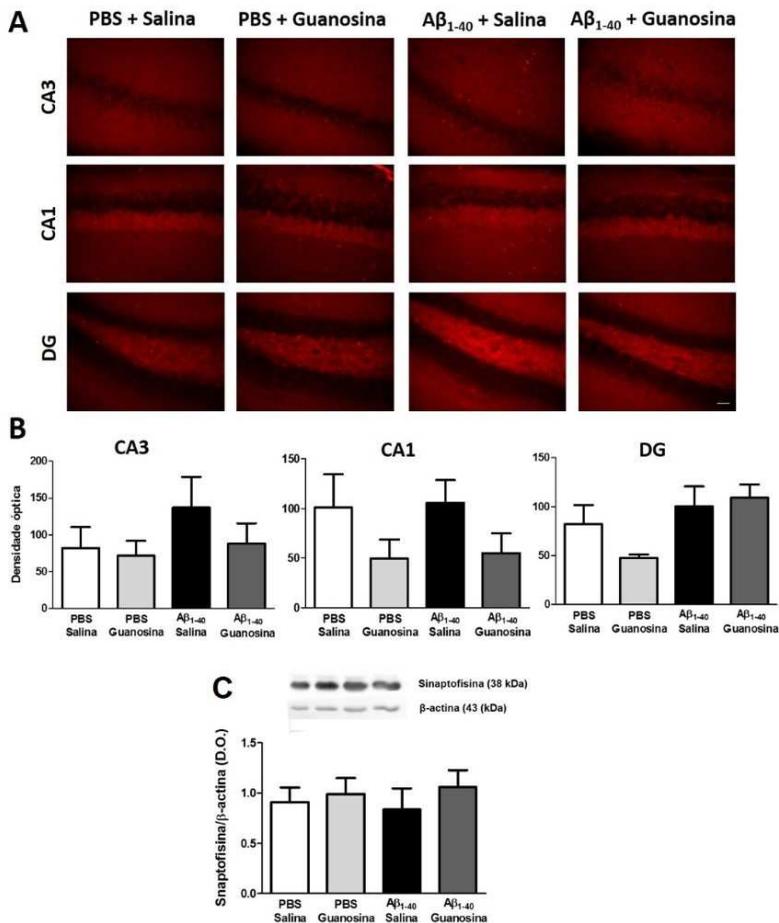


Figura 26. Avaliação da expressão de sinaptofisina nas regiões CA3, CA1 e giro denteado (DG) dos hipocampus de camundongos submetidos à infusão i.c.v. de A β_{1-40} . Os camundongos foram tratados com guanosina (8 mg/kg, i.p.) ou salina (10 μ L/mg, i.p) durante 14 dias consecutivos após a infusão i.c.v do A β_{1-40} (400 p/mol sítio) ou PBS (grupo controle). **(A)** Fotomicrografias representativas da imunistoquímica para sinaptofisina em fatias de hipocampo 21 dias após a infusão A β_{1-40} obtidas com objetiva de 20x. **(B)** Os gráficos representam médias + erro padrão das médias da quantificação de fluorescência obtida com o programa Image J ($N = 3-4$). **(C)** O imunocnteúdo total de sinaptofisina foi avaliado através da técnica Western blot, representado pela expressão total de sinaptofisina (38 kDa) normalizada em relação à expressão total de β -actina (45 kDa). A figura na parte superior do gráfico representa imagens obtidas com o Fotodocumentador ChemiDoc MP (BioRad). Os valores

representam as médias + erro padrão das médias ($N = 5$). A análise estatística sugere que não houve diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA de duas vias).

5.6 Avaliação dos níveis de purinas e metabólitos em hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com guanosina e infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$

Considerando que há poucos estudos sobre o metabolismo das purinas após a administração sistêmica de guanosina e sobretudo, nenhum dado sobre a influência do peptídeo $A\beta$ sobre esse metabolismo, analisamos a concentração dos diversos derivados da guanina e adenina no hipocampo dos animais submetidos ao protocolo de tratamentos realizado neste estudo. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Os animais que receberam guanosina (PBS + guanosina) tiveram um aumento das concentrações de GDP em relação ao grupo PBS + salina ($F(1,17) = 11,06, P < 0,05$), efeito não observado no grupo $A\beta_{1-40}$ + guanosina. A administração de $A\beta_{1-40}$ induziu aumento significativo nos níveis de ADP quando comparados com o grupo que recebeu PBS ($F(1,17) = 8,28, P = 0,01$), e o tratamento com guanosina não alterou esse parâmetro. Além disso, ANOVA de duas vias sugere uma tendência ao aumento nos níveis de ATP nos camundongos que receberam $A\beta_{1-40}$ em comparação ao grupo que recebeu PBS, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa ($F(1,17) = 3,50, P = 0,08$).

Tabela 2. Quantificação por HPLC dos nucleotídeos derivados da Guanina e Adenina e seus metabólitos no hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com guanosina e à infusão i.c.v. de A β ₁₋₄₀.

Purinas	PBS + Salina (n=6)	PBS + Guanosina (n=5)	A β ₁₋₄₀ + Salina (n=5)	A β ₁₋₄₀ + Guanosina (n=6)
<i>Guanosina-5'-trifosfato (GTP)</i>	16,56±1,16	16,47±3,19	22,56 ± 2,08	23,09 ± 2,91
<i>Guanosina-5'-difosfato (GDP)</i>	11,99±0,53	18,35 ± 1,88*	13,99±0,78	13,29±0,64
<i>Guanosina-5'-monofosfato (GMP)</i>	13,69±1,01	11,17±2,04	14,19±0,97	14,69±0,86
<i>Guanosina</i>	0,74±0,04	0,71±0,19	0,50 ± 0,10	0,57±0,07
<i>Xantina</i>	202,0±14,09	250,40±27,08	316,70±49,4 5	274,20±34,2 2
<i>Adenosina-5'-trifosfato (ATP)</i>	22,54±2,91	24,44±4,49	30,19 ± 4,68	30,47 ± 2,16
<i>Adenosina-5'-difosfato (ADP)</i>	21,57±2,20	23,28±4,23	32,76 ± 2,33*	33,13 ± 1,91*
<i>Adenosina</i>	18,21±2,26	13,75±2,72	16,83±1,44	17,19±0,88
<i>Inosina-5'-monofosfato</i>	15,61±1,34	16,24±4,02	18,36±1,55	18,55±1,66
<i>Inosina</i>	7,56±0,93	4,63±1,22	8,16±0,71	9,32±1,06
<i>Hipoxantina</i>	9,30±2,12	6,42±1,27	6,00±0,52	6,54±0,24
<i>Ácido úrico</i>	15,71±0,80	15,13±1,43	13,94±0,35	14,81±0,64

Valores expressos em μ M, como média \pm erro padrão da média de 5-6 hipocampos. * $P < 0,05$ em relação ao grupo PBS (ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls).

6. Discussão

Os peptídeos amiloides podem apresentar-se em diversos estados morfológicos, cada um com diferentes graus de toxicidade (Liu *et al.*, 2004). A sequência de aminoácidos presentes nos peptídeos β -amiloides contém parte da porção transmembrana da APP, aumentando sua propensão à agregação (Paula-Lima, Brito-Moreira e Ferreira, 2013). A fase inicial da agregação é caracterizada pela polimerização de monômeros, formando oligômeros de baixo peso molecular. A associação destes oligômeros leva à formação de agregados pré-fibrilares que, após adição de mais monômeros, são convertidos em fibrilas maduras (Podlisy *et al.*, 1998). Tanto formas sintéticas como recombinantes dos peptídeos β -amilóide₁₋₄₀ ($A\beta_{1-40}$) são capazes de formar agregados e fibrilas *in vitro*, iguais aos isolados do cérebro de humanos portadores da DA (Narang, 1980) (Merz *et al.*, 1983). O nosso estudo baseou-se em modelos bastante utilizados da DA em animais, que consistem na injeção i.c.v. do $A\beta_{1-40}$ na sua forma agregada (ou pré-fibrilar). De acordo com as observações realizadas em microscópio eletrônico de transmissão, a alíquota utilizada no presente estudo caracteriza-se pela presença predominante de pré-fibrilas (figura 17).

O presente estudo avaliou o efeito neuroprotetor da guanosina frente à toxicidade induzida pelo $A\beta_{1-40}$ em camundongos. Após a infusão i.c.v. de $A\beta_{1-40}$, os animais foram tratados imediatamente e após 3h com guanosina ou salina. Nos 14 dias seguintes, os animais receberam guanosina ou salina uma vez ao dia.

No presente estudo, os animais foram habituados ao campo aberto e avaliados a distância percorrida em intervalos de tempo (durante 15 min), a velocidade média, o tempo total permanecido no centro do campo aberto e a latência para entrada na área central. As análises realizadas não revelaram diferenças entre os grupos avaliados. A avaliação da atividade locomotora em intervalos de tempo também pode ser considerada como habituação do animal ao campo aberto, onde a exploração locomotora diminui devido ao reconhecimento do ambiente pelo animal (Rial *et al.*, 2014). A diminuição do comportamento exploratório dos animais depende do correto funcionamento da função hipocampal, pois reconhecer o ambiente implica em explorá-lo menos (Leussis e Bolivar, 2006). A velocidade média, tempo de permanência na área central e número de entradas na área central do campo aberto, foram apresentados como resultados obtidos nos primeiros 5 min, e sugerem que não houve efeito dos tratamentos utilizados nesse estudo sobre a atividade

locomotora dos animais. A análise em relação ao comportamento dos animais na área central demonstra que os grupos tratados não apresentaram comportamento tipo-ansioso (por exemplo, menor número de entradas na área central) em relação ao grupo controle.

Adicionalmente, a memória espacial dos animais foi avaliada no teste de realocação de objetos, uma tarefa que depende da área CA1 do hipocampo (Assini, Duzzioni e Takahashi, 2009). Camundongos que receberam o peptídeo A β ₁₋₄₀ apresentaram um déficit na memória espacial de curto prazo, pois o índice de reconhecimento do objeto movido foi em torno de 50%. O tratamento desses animais com guanosina reverteu parcialmente o déficit observado neste teste, demonstrando um possível efeito neuroprotetor da guanosina frente a este parâmetro.

A memória espacial dos animais também foi avaliada no labirinto em Y, onde o número de alternância corretas (isto é, a entrada consecutiva em 3 braços distintos do labirinto) é considerado como parâmetro de memória espacial (Onaolapo *et al.*, 2012). Neste teste, os animais que receberam o peptídeo A β ₁₋₄₀ não apresentaram déficit cognitivo, apresentando a mesma quantidade de alternâncias corretas que os animais do grupo controle. Uma possível explicação para inobservância de déficit cognitivo neste teste é que o modelo de toxicidade utilizado representa as fases iniciais da DA, onde o dano cognitivo não é tão expressivo. Além disso, o labirinto em Y possui uma desvantagem, já que o animal possui apenas duas alternativas, e assim a possibilidade de escolher o braço correto é de 50% (Sharma, Rakoczy e Brown-Borg, 2010).

É interessante observar que os nossos resultados são contraditórios a estudos anteriores que demonstraram um efeito amnésico da guanosina. Camundongos tratados com uma única dose de guanosina (2 ou 7,5 mg/kg, via oral) ou tratados durante duas semanas (0,5 mg/mL de guanosina adicionada na água de beber dos animais), apresentaram uma diminuição na latência no teste da esQUIVA inibitória (Roesler *et al.*, 2000; Vinadé *et al.*, 2003; Vinade *et al.*, 2004). Em nosso estudo, mesmo após 15 dias de tratamento com guanosina pela via i.p. na dose de 8 mg/kg, não observamos déficit cognitivo causado pela guanosina – avaliados na habituação do campo aberto, no teste de realocação de objetos e no labirinto em Y. O teste da esQUIVA inibitória envolve a sensibilidade a um estímulo nocivo e por isso compostos que possuem efeito antinociceptivo diminuem a latência dos animais na esQUIVA inibitória. Saute e colaboradores (Saute *et al.*, 2006) demonstraram o efeito amnésico da guanosina e o dissociaram de um possível efeito antinociceptivo utilizando o teste de deflexão da cauda. Porém, posteriormente o efeito antinociceptivo da guanosina foi demonstrado em

diversos testes de nocicepção – inclusive modelos térmicos (Schmidt *et al.*, 2008; Schmidt, Tort, *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2010). Desta forma, é possível que o efeito anteriormente relatado esteja relacionado ao efeito antinociceptivo da guanosina e não a um possível efeito amnésico.

Uma vez que pacientes com DA apresentam sintomas depressivos (Modrego e Ferrandez, 2004; Geerlings *et al.*, 2008) e uma única infusão i.c.v. de peptídeos A β já demonstrou induzir comportamento tipo-depressivo em camundongos (Pamplona *et al.*, 2010; Ledo *et al.*, 2013), nós avaliamos no presente estudo o comportamento tipo-depressivo dos animais após infusão do A β ₁₋₄₀. No teste de suspensão pela cauda, não observamos diferenças no tempo de imobilidade apresentado pelos animais nos diferentes grupos de tratamento. Já no teste de borrifo de sacarose, os animais tratados com A β ₁₋₄₀ apresentaram um aumento na latência para iniciar o comportamento de autolimpeza, enquanto que o tratamento dos animais com guanosina reverteu essa alteração no comportamento. Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose induz um comportamento de autolimpeza nos animais que pode ser considerado como um comportamento motivacional. O atraso em iniciar esse comportamento pode ser relacionado a alguns sintomas exibidos por pacientes depressivos, como anedonia (Willner *et al.*, 1987). O efeito tipo-antidepressivo da guanosina já foi demonstrado anteriormente (Bettio *et al.*, 2012; Bettio *et al.*, 2014) e a guanosina tem sido indicada como um possível agente antidepressivo por seu papel modulador sobre o sistema glutamatérgico (Deutschenbaur *et al.*, 2016). De fato, o efeito antidepressivo da guanosina ocorre através de interação com o sistema glutamatérgico, já que o pré-tratamento com NMDA (agonista do receptor NMDA) inibe o efeito da guanosina no teste de suspensão pela cauda (Bettio *et al.*, 2012).

No presente estudo demonstramos uma tendência na diminuição da captação de glutamato e aumento da liberação no grupo que recebeu o peptídeo A β ₁₋₄₀. A capacidade do A β ₁₋₄₀ diminuir a captação e aumentar a liberação de glutamato já foi demonstrado anteriormente (Keller *et al.*, 1997; Piermartiri *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2015). No presente estudo, demonstramos que o grupo de animais que recebeu A β ₁₋₄₀ e guanosina apresentou perfil de captação e liberação similar ao grupo controle. A reversão do aumento da liberação de glutamato por guanosina já foi demonstrado no modelo de convulsões induzidas por ácido quinolínico (Tavares *et al.*, 2005), e o nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a habilidade da guanosina em aumentar a recaptação de glutamato em fatias hipocámpais submetidas à PGO (Dal-Cim *et al.*, 2011; Dal-Cim *et al.*, 2013; Dal-Cim *et al.*, 2016). Uma vez que a recaptação do glutamato por

astrócitos é um mecanismo importante para o término da ação do neurotransmissor nas sinapses, a modulação deste processo pela guanosina pode contribuir para a regulação da transmissão glutamatérgica, protegendo células neuronais contra a excitotoxicidade induzida pelo glutamato (Duan *et al.*, 1999; Chen e Swanson, 2003; Schousboe e Waagepetersen, 2005; Matute, Domercq e Sanchez-Gomez, 2006).

No presente estudo, também demonstramos que $A\beta_{1-40}$ aumentou a captação de glutamato independente de sódio, e o tratamento com guanosina reverteu essa alteração. Este resultado também foi observado em outro estudo do nosso grupo de pesquisa (Martins *et al.*, 2015). Entre os transportadores de glutamato descritos no SNC, estão os sistemas dependentes de sódio (entre eles, os transportadores glias GLT-1 e GLAST, e os neuronais EAAC1 e EAAT4) e o independente de sódio, o X_C^- (Palacin *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2010). Em condições fisiológicas, o sistema X_C^- transporta cistina para o meio intracelular e glutamato intracelular para fora da célula (Bender, Reichelt e Norenberg, 2000). Porém, em situações excitotóxicas, este transporte é revertido, diminuindo a quantidade de glutamato na fenda sináptica e também diminuindo a quantidade de cistina intracelular (Bringmann *et al.*, 2009). No interior das células, a cistina é hidrolisada em cisteína, o aminoácido precursor e limitante para a síntese da glutatona, um importante agente na defesa antioxidante neural (Wang e Cynader, 2000). Estudos demonstram que a infusão i.c.v do peptídeo $A\beta_{1-40}$ diminui a quantidade de GSH no hipocampo (Prediger *et al.*, 2007; Piermartiri *et al.*, 2010), e essa diminuição pode estar relacionada à reversão do sistema X_C^- . Além disso, Albrecht e colaboradores (Albrecht *et al.*, 2013) demonstraram que guanosina é capaz de aumentar a expressão da subunidade funcional do sistema X_C^- , a xCT, aumentando a atividade do sistema X_C^- e os níveis de GSH em condições excitotóxicas. Este achado corrobora os resultados obtidos no presente estudo, onde mostramos que o tratamento dos animais com guanosina é capaz de reverter o aumento na captação independente de sódio induzido pelo $A\beta_{1-40}$. Contudo, são necessários experimentos adicionais que comprovem a hipótese de alteração na expressão e/ou funcionalidade do sistema X_C^- , sugerida neste estudo.

Nossos resultados também demonstram uma diminuição na expressão de GFAP na região CA1 do hipocampo de camundongos expostos à toxicidade do peptídeo $A\beta_{1-40}$ e o tratamento com guanosina não foi capaz de aumentar a expressão de GFAP. Considerando que os principais transportadores de glutamato são expressos em astrócitos,

podemos sugerir que as alterações no transporte de glutamato possam estar associadas às alterações astrocitárias. Porém, os resultados observados aqui são contrários a outros publicados anteriormente, que demonstram aumento da astrogliose (expressão de GFAP) 15-16 dias após a infusão do A β ₁₋₄₀ (Piermartiri *et al.*, 2010; Bicca *et al.*, 2011). Hu e colaboradores (Hu *et al.*, 1998) mostraram que o pico de astrogliose ocorre após 12h da exposição ao peptídeo A β ₁₋₄₂ em cultura de astrócitos corticais. Contudo, nenhum estudo anterior demonstrou astrogliose após 21 dias da exposição ao A β .

É importante mencionar que existem dados conflitantes na literatura. Estudos demonstram aumento na condensação de GFAP, mas não na sua expressão (mRNA e proteína; Hu *et al.*, 1998). Em um modelo transgênico da DA, astrócitos reativos são encontrados ao redor de placas neuríticas, enquanto astrócitos distantes atrofiam (Rodriguez *et al.*, 2009), e Bardehle e colaboradores (Bardehle *et al.*, 2013) demonstraram que apenas astrócitos próximos à lesão (até 100 μ m) sofrem astrogliose com aumento na expressão de GFAP. Estudos em animais transgênicos para a DA (3xTG-AD) demonstraram uma diminuição na expressão de GFAP que progrediu com a idade. Animais com 3 meses de idade já demonstravam alterações – diminuição na complexidade, número de processos e área x volume de estruturas positivas para GFAP – tornando-se significativa a partir dos 12 meses (Olabarria *et al.*, 2010; Pekny, Wilhelmsson e Pekna, 2014).

Uma diminuição na marcação para GFAP foi encontrada no cérebro de pacientes depressivos e em modelos animais de depressão (Rajkowska e Stockmeier, 2013; Cobb *et al.*, 2015) e esta observação poderia estar relacionada ao comportamento tipo-anedônico induzido pelo A β ₁₋₄₀ observado no presente estudo. Apesar de guanosina não alterar a expressão de GFAP induzida por A β ₁₋₄₀, o efeito antidepressivo induzido pela guanosina pode estar relacionado ao seu papel modulador do sistema glutamatérgico.

Astrócitos distróficos são incapazes de dar o suporte metabólico necessário ao funcionamento correto das sinapses, levando ao seu remodelamento e mesmo perda de alguns contatos sinápticos (Scheff *et al.*, 2007). A perda sináptica é observada em modelos de animais transgênicos para a DA (Mcgowan, Eriksen e Hutton, 2006; Haass e Selkoe, 2007), e inclusive em estudos que utilizam a infusão i.c.v do A β ₁₋₄₀ (Bicca *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012). Porém, em nosso estudo não encontramos perda sináptica, avaliada através da expressão de sinaptofisina (tanto por análise imunoistoquímica nas regiões CA1, CA3 e giro denteado no hipocampo quanto no extrato total

de hipocampo através de Western blotting). Esta é a primeira avaliação sobre a perda de contatos sinápticos através da expressão da sinaptofisina realizada após 21 dias da infusão de $A\beta_{1-40}$. Considerando que as sinapses são estruturas plásticas, podemos sugerir que o dano significativo observado após a infusão do $A\beta_{1-40}$ ocorre em torno do 16º dia após a infusão i.c.v., e após 21 dias houve recuperação das estruturas sinápticas. Experimentos adicionais que comprovem esta hipótese deverão ser realizados.

Camundongos transgênicos para APP apresentam diminuição da marcação para NeuN no córtex pré-frontal e hipocampo (Beauquis *et al.*, 2014); (Eleuteri *et al.*, 2015), e estudos que utilizam a infusão i.c.v do peptídeo $A\beta_{1-40}$ demonstram degeneração neuronal (Piermartiri *et al.*, 2010). Porém, em nosso estudo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação à expressão da proteína NeuN, um marcador de núcleos neuronais.

No presente estudo demonstramos, pela primeira vez, o efeito da infusão do peptídeo $A\beta_{1-40}$ sobre os níveis de purinas derivadas da adenina e da guanina no hipocampo. As avaliações em HPLC mostram que o tratamento com $A\beta$ aumenta os níveis de ADP, enquanto exibe uma tendência em aumentar os níveis de ATP (Tabela 2). A deficiência energética relacionada à disfunção mitocondrial é uma característica do cérebro de pacientes DA (Beal, 2005), e essa disfunção pode ser resultado do acúmulo de $A\beta$ na mitocôndria. Em camundongos transgênicos para APP, déficits funcionais nas mitocôndrias localizadas nas sinapses ocorrem antes mesmo de depósitos extracelulares de $A\beta$ serem detectados (Du *et al.*, 2010). Um estudo recente demonstrou um aumento na atividade dos complexos I, II e IV da mitocôndria causados pelo peptídeo $A\beta$, apesar de ocorrer diminuição do metabolismo energético mitocondrial (Figueiredo *et al.*, 2011), sugerindo um mecanismo compensatório para manutenção do metabolismo energético. Assim, o aumento observado nesse estudo pode estar relacionado a este mecanismo compensatório.

Observamos também que o tratamento dos animais com guanosina induziu aumento significativo nos níveis de GDP somente no hipocampo dos camundongos que receberam PBS (Tabela 2). Dados sobre o metabolismo da guanosina demonstram que 15 min após sua administração via i.p. (8 mg/kg) ocorre um aumento nos níveis de guanosina e guanina no cérebro de ratos, e uma enzima importante da via de salvação purinérgica, responsável por esta atividade de degradação da guanosina (a fosforilase de nucleosídeos de purinas) está bastante ativa no plasma dos animais (Giuliani, Ballerini, *et al.*, 2012). Diante do

exposto e considerando que não há alteração nos níveis dos metabólitos da guanosina (xantina e ácido úrico; Tabela 2), podemos sugerir que a guanosina está sendo utilizada para síntese dos nucleotídeos na “via de salvação purinérgica”, gerando mais GDP sem ainda alterar significativamente os níveis de GTP. Interessantemente, este efeito não é observado no grupo que recebeu a infusão do A β . Considerando que este é o primeiro conjunto de resultados relacionado à quantificação dos níveis das purinas em animais tratados com o A β ₁₋₄₀ e guanosina, é importante que em estudos futuros a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo purinérgico seja analisada, permitindo uma melhor compreensão do efeito do A β ₁₋₄₀ sobre o metabolismo das purinas.

Com respeito à incidência de efeitos colaterais após protocolos longos de tratamento com guanosina, não observamos nenhum efeito adverso da guanosina sobre o comportamento dos animais tratados, e estudos anteriores já haviam demonstrado que a guanosina não altera a coordenação motora de animais submetidos ao teste da barra giratória ou ao campo aberto (Roesler *et al.*, 2000; Lara *et al.*, 2001). Mesmo em doses bastante altas (120 mg/kg), guanosina não induziu mortes, mudança no peso corporal nem alterações renais e hepáticas após o tratamento crônico (Schmidt *et al.*, 2010). Assim, por ser um composto endógeno e não tóxico, a guanosina pode ser considerada uma molécula de interesse para uso terapêutico no tratamento de doenças neurodegenerativas, particularmente na doença de Alzheimer.

7. Conclusões

No presente estudo, avaliamos o efeito neuroprotetor da guanosina contra a toxicidade induzida pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos. Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- Guanosina reverteu parcialmente o déficit cognitivo induzido pelo $A\beta_{1-40}$ no teste de avaliação de memória espacial, a realocação de objetos;
- A infusão do $A\beta_{1-40}$ induziu comportamento tipo-anedônico, e o tratamento com guanosina reverteu esse comportamento;
- Guanosina reverteu a alteração no transporte de glutamato (aumento na captação de glutamato independente de Na^+) induzida pelo $A\beta_{1-40}$;
- Não houve diminuição na expressão de NeuN nas subregiões hipocâmpais analisadas;
- Houve redução na expressão de GFAP na região CA1 do hipocampo induzida pelo $A\beta_{1-40}$, e o tratamento com guanosina não reverteu este efeito;
- Não houve alterações na expressão de sinaptofisina, um marcador sináptico, sugerindo que não houve perda sináptica nos animais que receberam $A\beta_{1-40}$;
- O tratamento dos animais com guanosina aumentou os níveis de GDP no hipocampo dos camundongos que receberam PBS, mas não alterou esse parâmetro no hipocampo de camundongos que receberam $A\beta_{1-40}$;
- O grupo de animais que recebeu o $A\beta_{1-40}$ apresentou aumento nos níveis de ADP e ATP no hipocampo.

Perspectivas

Os resultados apresentados nesta Tese nos permitem avançar no conhecimento que se refere ao sítio de interação da guanosina na membrana celular, além de demonstrar um efeito neuroprotetor da guanosina em modelo animal da Doença de Alzheimer. Porém, estudos adicionais podem ser propostos para contribuir com o entendimento dos processos de sinalização e neuroproteção induzidos pela guanosina, como:

- Avaliar se a formação de heterômeros $A_1R+A_{2A}R$ recruta a ativação da proteína G_i , como proposto neste estudo;
- Investigar a ocorrência de heterômeros $A_1R+A_{2A}R$ em tecido nativo, principalmente no hipocampo;
- Investigar a expressão do A_1R no hipocampo dos animais KO- $A_{2A}R$;
- Avaliar a interação entre $A_{2A}R$ e canal BK;
- Investigar se o efeito neuroprotetor da guanosina frente à toxicidade do $A\beta_{1-40}$ depende da sua interação com os receptores A_1 e A_{2A} ;
- Avaliar a expressão e funcionalidade do sistema Xc^- após infusão do $A\beta_{1-40}$ e o efeito da guanosina sobre esse sistema;
- Investigar as possíveis alterações causadas pelo $A\beta_{1-40}$ nas enzimas da via de salvação das purinas.

Publicações realizadas em colaboração no período de desenvolvimento da Tese

- “Neuroprotection promoted by guanosine depends on glutamine synthetase and glutamate transporters activity in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation” (Dal-Cim T., Martins W.C., Thomaz D.T., Coelho V., Poluceno G.G., Lanznaster D., Vandressen-Filho S., Tasca C.I.) publicado na revista Neurotoxicology Research (2016, DOI 10.1007/s12640-015-9595-z).

- “Adenosine receptors, oligomerization and Parkinson’s Disease pharmacotherapy” (Ciruela F., Constantino LC., Lanznaster D., Dal-Cim T., Tasca CI., Fernández-Dueñas V.) Capítulo publicado no livro “Adenosine signaling mechanisms: pharmacology, functions and therapeutic agents”. Editores: Roberto Paes de Carvalho e Vickram Ramkumar (NOVA Science Publishers)

Referências

<http://www.alzheimermed.com.br/>, Dr. Norton Sayeg - acessado em 26 de janeiro de 2016.

AGNATI, L. F. et al. Existence and theoretical aspects of homomeric and heteromeric dopamine receptor complexes and their relevance for neurological diseases. **Neuromolecular Med**, v. 7, n. 1-2, p. 61-78, 2005. ISSN 1535-1084 (Print)

1535-1084 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16052039> >.



_____. Aspects on receptor regulation and isoreceptor identification. **Med Biol**, v. 58, n. 4, p. 182-7, Aug 1980. ISSN 0302-2137 (Print)

0302-2137 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6167826> >.



ALBRECHT, P. et al. Extracellular cyclic GMP and its derivatives GMP and guanosine protect from oxidative glutamate toxicity. **Neurochem Int**, v. 62, n. 5, p. 610-9, Apr 2013. ISSN 1872-9754 (Electronic)

0197-0186 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357478> >.



ALLEN, N. J.; KARADOTTIR, R.; ATTWELL, D. Reversal or reduction of glutamate and GABA transport in CNS pathology and therapy. **Pflugers Arch**, v. 449, n. 2, p. 132-42, Nov 2004. ISSN 0031-6768 (Print)

0031-6768 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338308> >.



AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. **J Pharmacol Sci**, v. 108, n. 3, p. 227-38, Nov 2008. ISSN 1347-8613 (Print)

1347-8613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008644> >.



ARRIZA, J. L. et al. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 8, p. 4155-60, Apr 15 1997. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108121> >.



ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1

participation. **Behav Brain Res**, v. 204, n. 1, p. 206-11, Dec 1 2009. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19523494> >.

[OBJ]

AULD, D. S. et al. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies.

Prog Neurobiol, v. 68, n. 3, p. 209-45, Oct 2002. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450488> >.

[OBJ]

BARDEHLE, S. et al. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 5, p. 580-6, May 2013. ISSN 1546-1726 (Electronic)

1097-6256 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23542688> >.

[OBJ]

BAU, C. et al. Guanosine stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of heme oxygenase and cyclic GMP. **Purinergic Signal**, v. 1, n. 2, p. 161-72, Jun 2005. ISSN 1573-9538 (Print). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404501> >.

[OBJ]

BEAL, M. F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. **Ann Neurol**, v. 58, n. 4, p. 495-505, Oct 2005. ISSN 0364-5134 (Print)

0364-5134 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16178023> >.

[OBJ]

BEAS-ZARATE, C. et al. Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. **Neurochem Int**, v. 39, n. 1, p. 1-10, Jul 2001. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311443> >.

[OBJ]

BEAUQUIS, J. et al. [Hippocampal and cognitive alterations precede amyloid deposition in a mouse model for Alzheimer's disease]. **Medicina (B Aires)**, v. 74, n. 4, p. 282-6, 2014. ISSN 0025-7680 (Print)

0025-7680 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25188653> >.

[OBJ]

BELLAVER, B. et al. Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. **Purinergic Signal**, v. 11, n. 4, p. 571-80, Dec 2015. ISSN 1573-9546 (Electronic). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26431832> >.

[OBJ]

BENDER, A. S.; REICHEL, W.; NOREMBERG, M. D. Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. **Neurochem Int**, v. 37, n. 2-3, p. 269-76, Aug-Sep 2000. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10812212> >.

OBJ

BENFENATI, V. et al. Guanosine promotes the up-regulation of inward rectifier potassium current mediated by Kir4.1 in cultured rat cortical astrocytes. **Journal of neurochemistry**, v. 98, p. 430-45, 2006.

OBJ

BETTIO, L. E. et al. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behav Brain Res**, v. 234, n. 2, p. 137-48, Oct 1 2012. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743004> >.

OBJ

_____. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 127, p. 7-14, Dec 2014. ISSN 1873-5177 (Electronic)

0091-3057 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316306> >.

OBJ

BICCA, M. A. et al. The selective and competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, (-)-6-phosphonomethyl-deca-hydroisoquinoline-3-carboxylic acid, prevents synaptic toxicity induced by amyloid-beta in mice. **Neuroscience**, v. 192, p. 631-41, Sep 29 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21756976> >.

OBJ

BLOOM, G. S. Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. **JAMA Neurol**, v. 71, n. 4, p. 505-8, Apr 2014. ISSN 2168-6157 (Electronic)

2168-6149 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24493463> >.

OBJ

BRINGMANN, A. et al. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. **Neurochem Int**, v. 54, n. 3-4, p. 143-60, Mar-Apr 2009. ISSN 1872-9754 (Electronic)

0197-0186 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114072> >.

OBJ

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 12, p. 1471-83, Jun 2007. ISSN 1420-682X (Print)

1420-682X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17375261>>.

[OBJ]

BUTTERFIELD, D. A.; BOYD-KIMBALL, D. Amyloid beta-peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. **Brain Pathol**, v. 14, n. 4, p. 426-32, Oct 2004. ISSN 1015-6305 (Print)

1015-6305 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15605990>>.

[OBJ]

BZOWSKA, A.; KULIKOWSKA, E.; SHUGAR, D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. **Pharmacol Ther**, v. 88, n. 3, p. 349-425, Dec 2000. ISSN 0163-7258 (Print)

0163-7258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337031>>.

[OBJ]

CACABELOS, R.; TAKEDA, M.; WINBLAD, B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 14, n. 1, p. 3-47, Jan 1999. ISSN 0885-6230 (Print)

0885-6230 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029935>>.

[OBJ]

CANALS, M. et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. **J Biol Chem**, v. 278, n. 47, p. 46741-9, Nov 21 2003. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933819>>.

[OBJ]

CASTRO-GAGO, M. et al. Concentrations of purine nucleotides and purine and pyrimidine bases in cerebrospinal fluid of neurologically healthy children. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, v. 30, n. 11, p. 761-5, Nov 1992. ISSN 0939-4974 (Print)

0939-4974 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1489848>>.

[OBJ]

CHANG, R. et al. Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo. **Neuroscience letters**, v. 431, p. 101-5, 2008.

[OBJ]

CHAUDHRY, F. A. et al. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. **Neuron**, v. 15, n. 3, p. 711-20, Sep 1995. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546749>>.

OBJ

CHEN, Y.; SWANSON, R. A. Astrocytes and brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 23, n. 2, p. 137-49, Feb 2003. ISSN 0271-678X (Print) 0271-678X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571445> >.

OBJ

CICCARELLI, R. et al. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **Int J Dev Neurosci**, v. 19, n. 4, p. 395-414, Jul 2001. ISSN 0736-5748 (Print) 0736-5748 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11378300 >.

OBJ

_____. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. **Glia**, v. 29, n. 3, p. 202-11, Feb 1 2000. ISSN 0894-1491 (Print) 0894-1491 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642747> >.

OBJ

_____. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. **Glia**, v. 25, n. 1, p. 93-8, Jan 1999. ISSN 0894-1491 (Print) 0894-1491 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9888301> >.

OBJ

CIRUELA, F. et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, p. 2080-2087, 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking).

OBJ

COBB, J. A. et al. Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder. **Neuroscience**, Dec 30 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742791> >.

OBJ

_____. Hippocampal volume and total cell numbers in major depressive disorder. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 3, p. 299-306, Mar 2013. ISSN 1879-1379 (Electronic) 0022-3956 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201228> >.

OBJ

CONNELL, B. J. et al. Guanosine protects against reperfusion injury in rat brains after ischemic stroke. **J Neurosci Res**, v. 91, n. 2, p. 262-72, Feb 2013. ISSN 1097-4547 (Electronic)

0360-4012 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151946>>.

[DOI]
 CONRAD, M.; SATO, H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. **Amino Acids**, v. 42, n. 1, p. 231-46, Jan 2012. ISSN 1438-2199 (Electronic)

0939-4451 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21409388>>.

[DOI]
 CRESPO-BIEL, N.; THEUNIS, C.; VAN LEUVEN, F. Protein tau: prime cause of synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. **Int J Alzheimers Dis**, v. 2012, p. 251426, 2012. ISSN 2090-0252 (Electronic). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22720188>>.

[DOI]
 CRISTOVAO-FERREIRA, S. et al. A1R-A2AR heteromers coupled to Gs and G i/0 proteins modulate GABA transport into astrocytes. **Purinergic Signal**, v. 9, n. 3, p. 433-49, Sep 2013. ISSN 1573-9546 (Electronic). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23657626>>.

[DOI]
 D'ALIMONTE, I. et al. Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells. **J Immunol**, v. 178, n. 2, p. 720-31, Jan 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print)
 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list_uids=17202332>.

[DOI]
 D'ANDREA, M. R. et al. Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. **Histopathology**, v. 38, n. 2, p. 120-34, Feb 2001. ISSN 0309-0167 (Print)
 0309-0167 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207825>>.

[DOI]
 DAL-CIM, T. et al. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **J Neurochem**, v. 126, n. 4, p. 437-50, Aug 2013. ISSN 1471-4159 (Electronic)

0022-3042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23713463>>.

[DOI]
 _____. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca(2)+-activated K+ channels, phosphatidilinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neuroscience**, v. 183, p. 212-20, Jun 2 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21435378> >.

[OBJ]

_____. Neuroprotection Promoted by Guanosine Depends on Glutamine Synthetase and Glutamate Transporters Activity in Hippocampal Slices Subjected to Oxygen/Glucose Deprivation. **Neurotox Res**, Feb 8 2016. ISSN 1476-3524 (Electronic)

1029-8428 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26858177> >.

[OBJ]

_____. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3beta pathway. **Neurochem Int**, Jun 7 2012. ISSN 1872-9754 (Electronic)

0197-0186 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683349> >.

[OBJ]

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in neurobiology**, v. 65, p. 1-105, 2001.

[OBJ]

DANYSZ, W. et al. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. **Neurotox Res**, v. 2, n. 2-3, p. 85-97, 2000. ISSN 1029-8428 (Print)

1029-8428 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16787834> >.

[OBJ]

DE FELICE, F. G. et al. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **J Biol Chem**, v. 282, n. 15, p. 11590-601, Apr 13 2007. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308309> >.

[OBJ]

DE OLIVEIRA, D. L. et al. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. **Brain Res**, v. 1018, n. 1, p. 48-54, Aug 20 2004. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15262204> >.

[OBJ]

DECKER, H. et al. Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 9, p. 1943-51, Jul 2007. ISSN 0360-4012 (Print)

0360-4012 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17526012> >.

[OBJ]

DEKOSKY, S. T.; SCHEFF, S. W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. **Ann Neurol**, v. 27, n. 5, p. 457-64, May 1990. ISSN 0364-5134 (Print)
0364-5134 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2360787> >.

[OBJ]

DEUTSCHENBAUR, L. et al. Role of calcium, glutamate and NMDA in major depression and therapeutic application. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 64, p. 325-33, Jan 4 2016. ISSN 1878-4216 (Electronic)
0278-5846 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747801> >.

[OBJ]

DI LIBERTO, V. et al. Identification of GPR23/LPA4 as a candidate G protein-coupled receptor for guanosine. **Acta Physiologica**, v. 206, n. Supplement 692 O.16, 2012. ISSN 1748-1716.

[OBJ]

DINGLEDDINE, R. et al. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 1, p. 7-61, Mar 1999. ISSN 0031-6997 (Print)
0031-6997 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049997> >.

[OBJ]

DRURY, A. N.; SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **J Physiol**, v. 68, n. 3, p. 213-37, Nov 25 1929. ISSN 0022-3751 (Print)
0022-3751 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16994064> >.

[OBJ]

DU, H. et al. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 43, p. 18670-5, Oct 26 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937894> >.

[OBJ]

DUAN, S. et al. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. **J Neurosci**, v. 19, n. 23, p. 10193-200, Dec 1 1999. ISSN 0270-6474 (Print)
0270-6474 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10575016> >.

[OBJ]

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 31-55, 2001. ISSN 0147-006X (Print)
0147-006X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283304> >.

OBJ

ELEUTERI, S. et al. Novel therapeutic strategy for neurodegeneration by blocking Abeta seeding mediated aggregation in models of Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, v. 74, p. 144-57, Feb 2015. ISSN 1095-953X (Electronic) 0969-9961 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25173807> >.

OBJ

FERNANDEZ-DUENAS, V. et al. Fluorescence resonance energy transfer-based technologies in the study of protein-protein interactions at the cell surface. **Methods**, v. 57, n. 4, p. 467-72, Aug 2012. ISSN 1095-9130 (Electronic) 1046-2023 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683304> >.

OBJ

FERREIRA, S. T.; KLEIN, W. L. The Abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiol Learn Mem**, v. 96, n. 4, p. 529-43, Nov 2011. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914486> >.

OBJ

FIGUEIREDO, C. P. et al. Folic acid plus alpha-tocopherol mitigates amyloid-beta-induced neurotoxicity through modulation of mitochondrial complexes activity. **J Alzheimers Dis**, v. 24, n. 1, p. 61-75, 2011. ISSN 1875-8908 (Electronic) 1387-2877 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21157027> >.

OBJ

FRANCIS, P. T. Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 18, n. Suppl 1, p. S15-21, Sep 2003. ISSN 0885-6230 (Print) 0885-6230 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12973746> >.

OBJ

FRANCO, R. et al. G-protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology. **British journal of pharmacology**, v. 153 Suppl p. S90-S98, 2008. ISSN 0007-1188 (Print)\n0007-1188 (Linking).

OBJ

FREDHOLM, B. B. et al. Adenosine and brain function. **Int Rev Neurobiol**, v. 63, p. 191-270, 2005. ISSN 0074-7742 (Print) 0074-7742 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15797469> >.

OBJ

FRIZZO, M. E. et al. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. **Cell Mol Neurobiol**, v. 22, n. 3, p. 353-63, Jun 2002. ISSN 0272-4340 (Print) 0272-4340 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12469876> >.

[OBJ]

FURUTA, A. et al. Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. **Neuroscience**, v. 81, n. 4, p. 1031-42, Dec 1997. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9330365> >.

[OBJ]

FUXE, K. et al. Evidence for the existence of a dopamine receptor of the D-1 type in the rat median eminence. **Neurosci Lett**, v. 43, n. 2-3, p. 185-90, Dec 30 1983. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6231493> >.

[OBJ]

_____. Moonlighting Proteins and Protein-Protein Interactions as Neurotherapeutic Targets in the G Protein-Coupled Receptor Field. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, p. 131-155, 2013.

[OBJ]

GANDIA, J. et al. Adenosine A2A receptor-mediated control of pilocarpine-induced tremulous jaw movements is Parkinson's disease-associated GPR37 receptor-dependent. **Behav Brain Res**, v. 288, p. 103-6, Jul 15 2015. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862943> >.

[OBJ]

GARCIA-NEGREDO, G. et al. Coassembly and coupling of SK2 channels and mGlu5 receptors. **J Neurosci**, v. 34, n. 44, p. 14793-802, Oct 29 2014. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25355231> >.

[OBJ]

GIULIANI, P. et al. Tissue distribution and metabolism of guanosine in rats following intraperitoneal injection. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 26, n. 1, p. 51-65, Jan-Mar 2012. ISSN 0393-974X (Print)

0393-974X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22475097> >.

[OBJ]

_____. Protective activity of guanosine in an in vitro model of Parkinson's disease. **Panminerva Med**, v. 54, n. 1 Suppl 4, p. 43-51, Dec 2012. ISSN 1827-1898 (Electronic)

0031-0808 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23241934> >.

[OBJ]

GOEDERT, M. et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the

microtubule-associated protein tau. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 11, p. 4051-5, Jun 1988. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3131773> >.

OBJ

GOTZ, J. et al. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. **Science**, v. 293, n. 5534, p. 1491-5, Aug 24 2001. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520988> >.

OBJ

GRILLO, M. et al. Brain expression and 3H-guanosine binding analysis of novel G protein-coupled receptor for guanosine (GPR23/LPA4). **Acta Physiologica**, v. 206, n. Supplement 692 P4.19, 2012.

OBJ

GYSBERS, J. W.; RATHBONE, M. P. Guanosine enhances NGF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. **Neuroreport**, v. 3, n. 11, p. 997-1000, Nov 1992. ISSN 0959-4965 (Print)

0959-4965 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1482771> >.

OBJ

HAASS, C.; SELKOE, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 2, p. 101-12, Feb 2007. ISSN 1471-0072 (Print)

1471-0072 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245412> >.

OBJ

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184-5, Apr 10 1992. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1566067> >.

OBJ

HEINONEN, O. et al. Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 64, n. 2, p. 375-84, Jan 1995. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7700527> >.

OBJ

HERNANDEZ, F. et al. GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. **Exp Neurol**, v. 223, n. 2, p. 322-5, Jun 2010. ISSN 1090-2430 (Electronic)

0014-4886 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782073> >.

OBJ

HOOPER, C.; KILLICK, R.; LOVESTONE, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 104, n. 6, p. 1433-9, Mar 2008. ISSN 1471-4159 (Electronic)

0022-3042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18088381>>.



HU, J. et al. Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. **Brain Res**, v. 785, n. 2, p. 195-206, Mar 2 1998. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518610>>.



JACKSON, E. K. et al. Extracellular guanosine regulates extracellular adenosine levels. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 304, n. 5, p. C406-21, Mar 1 2013. ISSN 1522-1563 (Electronic)

0363-6143 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242185>>.



JIANG, S. et al. Remyelination after chronic spinal cord injury is associated with proliferation of endogenous adult progenitor cells after systemic administration of guanosine. **Purinergic signalling**, v. 4, p. 61-71, 2008.



KACZOR, A. A.; SELENT, J. Oligomerization of G protein-coupled receptors: biochemical and biophysical methods. **Curr Med Chem**, v. 18, n. 30, p. 4606-34, 2011. ISSN 1875-533X (Electronic)

0929-8673 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864280>>.



KARRAN, E.; MERCKEN, M.; DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 9, p. 698-712, Sep 2011. ISSN 1474-1784 (Electronic)

1474-1776 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21852788>>.



KELLER, J. N. et al. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. **J Neurochem**, v. 69, n. 1, p. 273-84, Jul 1997. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202320>>.



KOKKINIDIS, L. Sensitization to amphetamine and tolerance to cocaine and phencyclidine stimulation in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 25, n. 6, p. 1175-80, Dec 1986. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3809218> >.

[OBJ]

LANZNASTER, D. et al. Guanosine: a neuromodulator with therapeutic potential in aging-related disorders. **Aging and Disease**, 2016.

[OBJ]

LARA, D. R. et al. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. **Brain Res**, v. 912, n. 2, p. 176-80, Sep 7 2001. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532434> >.

[OBJ]

LEDO, J. H. et al. Amyloid-beta oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 10, p. 1053-4, Oct 2013. ISSN 1476-5578 (Electronic)

1359-4184 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23183490> >.

[OBJ]

LEHRE, K. P. et al. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. **J Neurosci**, v. 15, n. 3 Pt 1, p. 1835-53, Mar 1995. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7891138> >.

[OBJ]

LEUSSIS, M. P.; BOLIVAR, V. J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 30, n. 7, p. 1045-64, 2006. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16774787> >.

[OBJ]

LEVY, L. M.; WARR, O.; ATTWELL, D. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. **J Neurosci**, v. 18, n. 23, p. 9620-8, Dec 1 1998. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9822723> >.

[OBJ]

LIPPMAN, F. Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. **Enzymology**, v. 1, 1941.

[OBJ]

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med**, v. 330, n. 9, p. 613-22, Mar 3 1994. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7905600> >.

[OBJ]

LIU, Y. et al. Detecting bioactive amyloid beta peptide species in Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 91, n. 3, p. 648-56, Nov 2004. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485495> >.

[OBJ]

LOPES, L. V. et al. Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. **Neuroscience**, v. 112, n. 2, p. 319-329, 2002. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <Go to ISI>://000176525700008 >.

[OBJ]

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> >.

[OBJ]

LUDKA, F. K. et al. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 23, n. 5, p. 400-12, May 2013. ISSN 1873-7862 (Electronic) 0924-977X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682406> >.

[OBJ]

MACDONALD, J. F.; JACKSON, M. F.; BEAZELY, M. A. Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. **Crit Rev Neurobiol**, v. 18, n. 1-2, p. 71-84, 2006. ISSN 0892-0915 (Print) 0892-0915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17725510> >.

[OBJ]

MARAGAKIS, N. J.; ROTHSTEIN, J. D. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. **Neurobiol Dis**, v. 15, n. 3, p. 461-73, Apr 2004. ISSN 0969-9961 (Print) 0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15056453> >.

[OBJ]

MARTINS, W. C. et al. Atorvastatin Prevents Cognitive Deficits Induced by Intracerebroventricular Amyloid-beta1-40 Administration in Mice: Involvement of Glutamatergic and Antioxidant Systems. **Neurotox Res**, v. 28, n. 1, p. 32-42, Jul 2015. ISSN 1476-3524 (Electronic) 1029-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25827781> >.

[OBJ]

MASLIAH, E. Mechanisms of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. **Histol Histopathol**, v. 10, n. 2, p. 509-19, Apr 1995. ISSN 0213-3911 (Print)

0213-3911 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7599445> >.

[OBJ]

MASTERS, C. L. et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 12, p. 4245-9, Jun 1985. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3159021> >.

[OBJ]

MATHEUS, F. C. et al. Decreased synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory deficits in 6-OHDA-lesioned rats. **Behav Brain Res**, v. 301, p. 43-54, Mar 15 2016. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26707254> >.

[OBJ]

MATUTE, C.; DOMERCQ, M.; SANCHEZ-GOMEZ, M. V. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. **Glia**, v. 53, n. 2, p. 212-24, Jan 15 2006. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16206168> >.

[OBJ]

MAZUREK, A. A. Treatment of Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 342, n. 11, p. 821; author reply 821-2, Mar 16 2000. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722342> >.

[OBJ]

MCBEAN, G. J. Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 7, p. 299-302, Jul 2002. ISSN 0165-6147 (Print)

0165-6147 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119142> >.

[OBJ]

MCGOWAN, E.; ERIKSEN, J.; HUTTON, M. A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. **Trends Genet**, v. 22, n. 5, p. 281-9, May 2006. ISSN 0168-9525 (Print)

0168-9525 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567017> >.

[OBJ]

MEDEIROS, R. et al. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. **J Neurosci**, v. 27, n. 20, p. 5394-404, May 16 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507561> >.

[OBJ]

MELDRUM, B. S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **Neurology**, v. 44, p. S14-23, 1994.

[DOI]

MERZ, P. A. et al. Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. **Acta Neuropathol**, v. 60, n. 1-2, p. 113-24, 1983. ISSN 0001-6322 (Print)

0001-6322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6683919>>.

[DOI]

MIE, M. et al. Development of a split SNAP-tag protein complementation assay for visualization of protein-protein interactions in living cells. **The Analyst**, v. 137, p. 4760, 2012. ISSN 10.1039/C2AN35762C.

[DOI]

MODREGO, P. J.; FERRANDEZ, J. Depression in patients with mild cognitive impairment increases the risk of developing dementia of Alzheimer type: a prospective cohort study. **Arch Neurol**, v. 61, n. 8, p. 1290-3, Aug 2004. ISSN 0003-9942 (Print)

0003-9942 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313849>>.

[DOI]

MOLZ, S. et al. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. **Neurochem Res**, v. 30, n. 1, p. 83-9, Jan 2005. ISSN 0364-3190 (Print)

0364-3190 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15756936>>.

[DOI]

_____. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. **Brain Res**, v. 1231, p. 113-20, Sep 22 2008. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18655777>>.

[DOI]

MORETTI, M. et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr Res**, v. 46, n. 3, p. 331-40, Mar 2012. ISSN 1879-1379. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22154133>>.

[DOI]

NAGASAWA, K. et al. Characterization of guanine and guanosine transport in primary cultured rat cortical astrocytes and neurons. **Glia**, v. 55, n. 14, p. 1397-404, Nov 1 2007. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674371>>.

[DOI]

NARANG, H. K. High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril in Alzheimer's disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 39, n. 6, p. 621-31, Nov 1980. ISSN 0022-3069 (Print)

0022-3069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7452318> >.

[OBJ]

O'KANE, E. M.; STONE, T. W. Interaction between adenosine A(1) and A(2) receptor-mediated responses in the rat hippocampus in vitro. **Eur J Pharmacol**, v. 362, n. 1, p. 17-25, Nov 27 1998. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <Go to ISI>://000077332900003 >.

[OBJ]

OLABARRIA, M. et al. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. **Glia**, v. 58, n. 7, p. 831-8, May 2010. ISSN 1098-1136 (Electronic)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20140958> >.

[OBJ]

OLESKOVICZ, S. P. et al. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. **Neurochem Int**, v. 52, n. 3, p. 411-8, Feb 2008. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17822807> >.

[OBJ]

OLIVEIRA, K. R. et al. Pharmacological characterization of glutamate Na⁺-independent transport in retinal cell cultures: implications in the glutathione metabolism. **Neurochem Int**, v. 56, n. 1, p. 59-66, Jan 2010. ISSN 1872-9754 (Electronic)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19751785> >.

[OBJ]

ONALAPO, O. J. et al. Elevated Plus Maze and Y-Maze Behavioral Effects of Subchronic, Oral Low Dose Monosodium Glutamate in Swiss Albino Mice. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 21-27, 2012.

[OBJ]

PAAS, Y. et al. Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor. **EMBO J**, v. 15, n. 7, p. 1548-56, Apr 1 1996. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8612578> >.

[OBJ]

PALACIN, M. et al. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. **Physiol Rev**, v. 78, n. 4, p. 969-1054, Oct 1998. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790568> >.

[OBJ]

PALMER, T. M.; STILES, G. L. Adenosine receptors. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 7, p. 683-94, Jul 1995. ISSN 0028-3908 (Print) 0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8532135> >.

[OBJ]

PAMPLONA, F. A. et al. Altered emotionality leads to increased pain tolerance in amyloid beta (A beta 1-40) peptide-treated mice. **Behav Brain Res**, v. 212, n. 1, p. 96-102, Sep 1 2010. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <Go to ISI>://000278408400013 >.

[OBJ]

PARAMESHWARAN, K.; DHANASEKARAN, M.; SUPPIRAMANIAM, V. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. **Exp Neurol**, v. 210, n. 1, p. 7-13, Mar 2008. ISSN 0014-4886 (Print) 0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18053990> >.

[OBJ]

PARSONS, C. G. et al. Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. **Neurotox Res**, v. 24, n. 3, p. 358-69, Oct 2013. ISSN 1476-3524 (Electronic) 1029-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23657927> >.

[OBJ]

PATEL, S. A. et al. Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system xc(-): an obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 2, p. 273-84, Feb 2004. ISSN 0028-3908 (Print) 0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14680765> >.

[OBJ]

PAULA-LIMA, A. C.; BRITO-MOREIRA, J.; FERREIRA, S. T. Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 126, n. 2, p. 191-202, Jul 2013. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23668663> >.

[OBJ]

PAZ, M. M. et al. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum. **FEBS Lett**, v. 355, n. 2, p. 205-8, Nov 28 1994. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7982502> >.

[OBJ]

PEKKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. **J Pathol**, v. 204, n. 4, p. 428-37, Nov 2004. ISSN 0022-3417 (Print)

0022-3417 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15495269> >.

[OBJ]

PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neurosci Lett**, v. 565, p. 30-8, Apr 17 2014. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24406153> >.

[OBJ]

PENG, L. et al. Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. **Glia**, v. 52, n. 1, p. 25-35, Oct 2005. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15892125> >.

[OBJ]

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, n. 2, p. 346-56, Dec 1977. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/603028> >.

[OBJ]

PETTIFER, K. M. et al. Guanosine protects SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced apoptosis. **Neuroreport**, v. 15, n. 5, p. 833-6, Apr 9 2004. ISSN 0959-4965 (Print)

0959-4965 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073525> >.

[OBJ]

PIERMARTIRI, T. C. B. et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β 1-40 administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Experimental Neurology**, v. 226, p. 274-284, 2010. ISSN 1090-2430 (Electronic)\r0014-4886 (Linking).

[OBJ]

PODLISNY, M. B. et al. Oligomerization of endogenous and synthetic amyloid beta-protein at nanomolar levels in cell culture and stabilization of monomer by Congo red. **Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 3602-11, Mar 17 1998. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521679> >.

[OBJ]

PODUSLO, J. F. et al. Alzheimer's disease amyloid beta-protein mutations and deletions that define neuronal binding/internalization as early stage nonfibrillar/fibrillar aggregates and late stage fibrils. **Biochemistry**, v. 51, n. 19, p. 3993-4003, May 15 2012. ISSN 1520-4995 (Electronic)

0006-2960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22545812> >.

[OBJ]

PORCIUNCULA, L. O. et al. Guanine based purines inhibit [(3)H]glutamate and [(3)H]AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats. **Brain Res**, v. 928, n. 1-2, p. 106-12, Feb 22 2002. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844477> >.

[OBJ]

PORTELA, L. V. C. et al. Guanine and adenine nucleotidase activities in rat cerebrospinal fluid. **Brain Research**, v. 950, n. 1-2, p. 74-78, Sep 20 2002. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <Go to ISI>://000178477600008 >.

[OBJ]

POW, D. V. Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to amino adipic acid, a selectively transported substrate. **Glia**, v. 34, n. 1, p. 27-38, Apr 1 2001. ISSN 0894-1491 (Print) 0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11284017> >.

[OBJ]

PREDIGER, R. D. et al. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav Brain Res**, v. 177, n. 2, p. 205-13, Feb 27 2007. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17194489> >.

[OBJ]

PRILLER, C. et al. Excitatory synaptic transmission is depressed in cultured hippocampal neurons of APP/PS1 mice. **Neurobiol Aging**, v. 30, n. 8, p. 1227-37, Aug 2009. ISSN 1558-1497 (Electronic) 0197-4580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077058> >.

[OBJ]

PUJADAS, L. et al. Reelin delays amyloid-beta fibril formation and rescues cognitive deficits in a model of Alzheimer's disease. **Nat Commun**, v. 5, p. 3443, 2014. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24599114> >.

[OBJ]

QUARTA, D. et al. Adenosine receptor-mediated modulation of dopamine release in the nucleus accumbens depends on glutamate neurotransmission and N-methyl-D-aspartate receptor stimulation. **J Neurochem**, v. 91, n. 4, p. 873-80, Nov 2004. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15525341> >.

[OBJ]

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. **J Neurochem**, v. 130, n. 1, p. 61-74, Jul 2014. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24673378> >.

[OBJ]

RAHMAN, A. The role of adenosine in Alzheimer's disease. **Curr Neuropharmacol**, v. 7, n. 3, p. 207-16, Sep 2009. ISSN 1875-6190 (Electronic) 1570-159X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190962> >.

[OBJ]

RAJKOWSKA, G.; STOCKMEIER, C. A. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. **Curr Drug Targets**, v. 14, n. 11, p. 1225-36, Oct 2013. ISSN 1873-5592 (Electronic) 1389-4501 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23469922> >.

[OBJ]

RATHBONE, M. et al. Neurotrophic Effects of Extracellular Guanosine. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 27, p. 666-672, 2008.

[OBJ]

RATHBONE, M. P. et al. The trophic effects of purines and purinergic signaling in pathologic reactions of astrocytes. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 12 Suppl 2, p. S36-45, 1998. ISSN 0893-0341 (Print) 0893-0341 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9769028> >.

[OBJ]

_____. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Prog Neurobiol**, v. 59, n. 6, p. 663-90, Dec 1999. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845757> >.

[OBJ]

_____. Systemic administration of guanosine promotes functional and histological improvement following an ischemic stroke in rats. **Brain Research**, v. 1407, p. 79-89, 2011. ISSN 1872-6240 (Electronic)\r0006-8993 (Linking).

[OBJ]

REBOLA, N. et al. Enhanced adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. **J Neurophysiol**, v. 90, n. 2, p. 1295-303, Aug 2003. ISSN 0022-3077 (Print) 0022-3077 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12904509> >.

[OBJ]

REGNER, A. et al. Guanine nucleotides are present in human CSF. **Neuroreport**, v. 8, n. 17, p. 3771-4, Dec 1 1997. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427368> >.

[OBI]

RIAL, D. et al. Behavioral phenotyping of Parkin-deficient mice: looking for early preclinical features of Parkinson's disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114216, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25486126>>.

[OBI]

RODBELL, M. et al. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. **J Biol Chem**, v. 246, n. 6, p. 1877-82, Mar 25 1971. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4926550>>.

[OBI]

RODRIGUEZ, J. J. et al. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 3, p. 378-85, Mar 2009. ISSN 1476-5403 (Electronic)

1350-9047 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19057621>>.

[OBI]

ROESLER, R. et al. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. **Neuroreport**, v. 11, n. 11, p. 2537-40, Aug 3 2000. ISSN 0959-4965 (Print)

0959-4965 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10943718>>.

[OBI]

ROTHSTEIN, J. D. et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. **Neuron**, v. 13, n. 3, p. 713-25, Sep 1994. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7917301>>.

[OBI]

SANTOS, D. B. et al. Probuocol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. **Experimental Neurology**, v. 233, p. 767-775, 2012. ISSN 1090-2430 (Electronic)

r0014-4886 (Linking).

[OBI]

SANTOS, T. G.; SOUZA, D. O.; TASCA, C. I. GTP uptake into rat brain synaptic vesicles. **Brain Res**, v. 1070, n. 1, p. 71-6, Jan 27 2006. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405924>>.

[OBI]

SAUTE, J. A. et al. Amnesic effect of GMP depends on its conversion to guanosine. **Neurobiol Learn Mem**, v. 85, n. 3, p. 206-12, May 2006. ISSN 1074-7427 (Print)

1074-7427 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325434>>.

[OBJ]

SCHADECK, R. J. et al. Synaptosomal apyrase in the hypothalamus of adult rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 22, n. 3, p. 303-14, 1989. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2553177> >.

[OBJ]

SCHEFF, S. W. et al. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Neurology**, v. 68, n. 18, p. 1501-8, May 1 2007. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470753> >.

[OBJ]

SCHMIDT, A. P.; AVILA, T. T.; SOUZA, D. O. Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. **Neurochem Res**, v. 30, n. 1, p. 69-73, Jan 2005. ISSN 0364-3190 (Print) 0364-3190 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15756934> >.

[OBJ]

SCHMIDT, A. P. et al. Antinociceptive effects of intracerebroventricular administration of guanine-based purines in mice: evidences for the mechanism of action. **Brain Res**, v. 1234, p. 50-8, Oct 9 2008. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708036> >.

[OBJ]

_____. Anti-nociceptive properties of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in mice: Role of A1 adenosine receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 163-172, 2009. ISSN 1476-5381 (Electronic)r0007-1188 (Linking).

[OBJ]

_____. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Research**, v. 864, p. 40-43, 2000.

[OBJ]

SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; SOUZA, D. O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacol Ther**, v. 116, n. 3, p. 401-16, Dec 2007. ISSN 0163-7258 (Print) 0163-7258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17884172> >.

[OBJ]

SCHMIDT, A. P. et al. Guanosine Prevents Thermal Hyperalgesia in a Rat Model of Peripheral Mononeuropathy. **Journal of Pain**, v. 11, p. 131-141, 2010.

[OBJ]

_____. The NMDA antagonist MK-801 induces hyperalgesia and increases CSF excitatory amino acids in rats: reversal by guanosine. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 91, n. 4, p. 549-53, Feb 2009. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854198> >.

[OBJ]

SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. **Neurotox Res**, v. 8, n. 3-4, p. 221-5, Nov 2005. ISSN 1029-8428 (Print)

1029-8428 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371316> >.

[OBJ]

SEBASTIAO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Evidence for the presence of excitatory A2 adenosine receptors in the rat hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 138, n. 1, p. 41-4, Apr 13 1992. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1407664> >.

[OBJ]

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. **J Alzheimers Dis**, v. 3, n. 1, p. 75-80, Feb 2001. ISSN 1875-8908 (Electronic)

1387-2877 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12214075> >.

[OBJ]

_____. Folding proteins in fatal ways. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 900-4, Dec 18 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685251> >.

[OBJ]

SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. **Life Sciences**, v. 87, p. 521-536, 2010. ISSN 1879-0631 (Electronic)\n0024-3205 (Linking).

[OBJ]

SHELDON, A. L.; ROBINSON, M. B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. **Neurochem Int**, v. 51, n. 6-7, p. 333-55, Nov-Dec 2007. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517448> >.

[OBJ]

SHIM, J. O. et al. Signal transduction mechanism via adenosine A1 receptor in the cat esophageal smooth muscle cells. **Cell Signal**, v. 14, n. 4, p. 365-72, Apr 2002. ISSN 0898-6568 (Print)

0898-6568 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11858944> >.

[OBJ]

SIMS, N. R. et al. Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. **J Neurochem**, v. 40, n. 2, p. 503-9, Feb 1983. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6822833> >.

[OBJ]

SNYDER, E. M. et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 8, p. 1051-8, Aug 2005. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16025111> >.

OBJ

SOUZA, D. O.; RAMIREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **J Mol Neurosci**, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991. ISSN 0895-8696 (Print) 0895-8696 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1653002> >.

OBJ

SPECTOR, R.; JOHANSON, C. E. The origin of deoxynucleosides in brain: implications for the study of neurogenesis and stem cell therapy. **Pharm Res**, v. 24, n. 5, p. 859-67, May 2007. ISSN 0724-8741 (Print) 0724-8741 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17372683> >.

OBJ

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3923523> >.

OBJ

STODDART, L. A. et al. Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs. **Nature Methods**, v. 12, p. 1-5, 2015.

OBJ

TAKASHIMA, A. GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 9, n. 3 Suppl, p. 309-17, 2006. ISSN 1387-2877 (Print) 1387-2877 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16914869> >.

OBJ

TAKSANDE, B. G. et al. Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress induced behavioral alteration in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 720, n. 1-3, p. 115-20, Nov 15 2013. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183973> >.

OBJ

TAMAGNO, E. et al. Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. **J Neurochem**, v. 104, n. 3, p. 683-95, Feb 2008. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18005001> >.

OBJ

TAROZZI, A. et al. Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers. **J Biol**

Regul Homeost Agents, v. 24, n. 3, p. 297-306, Jul-Sep 2010. ISSN 0393-974X (Print)

0393-974X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846477>>.



TASCA, C. I. et al. Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptor activation. **Neurochem Res**, v. 23, n. 2, p. 183-8, Feb 1998. ISSN 0364-3190 (Print)

0364-3190 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9475513>>.



TASCA, C. I.; CARDOSO, L. F.; SOUZA, D. O. Effects of guanine nucleotides on adenosine and glutamate modulation of cAMP levels in optic tectum slices from chicks. **Neurochem Int**, v. 34, n. 3, p. 213-20, Mar 1999. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10355488>>.



TASCA, C. I. et al. A2A adenosine receptors and ionotropic glutamate receptors are involved on gmp-or guanosine-induced trophic effects in cultured cerebellar granule neurons. **Purinergic signalling**, v. 6, p. 42-42, Jun 2010. ISSN 1573-9538. Disponível em: <<Go to ISI>://000280241700089 >.



_____. The neuroprotective agent Guanosine activates big conductance Ca²⁺-activated Potassium channels (BK) transfected to HEK-293 cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 125, p. 273-273, May 2013. ISSN 0022-3042. Disponível em: <<Go to ISI>://000316961700641 >.



_____. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. **Neuroreport**, v. 6, n. 2, p. 249-52, Jan 26 1995. ISSN 0959-4965 (Print)

0959-4965 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7756603>>.



TAVARES, R. G. et al. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. **Neurochemical research**, v. 30, p. 439-44, 2005.



TAYLOR, C. W. The role of G proteins in transmembrane signalling. **Biochem J**, v. 272, n. 1, p. 1-13, Nov 15 1990. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2176077>>.



TERRY, A. V., JR.; BUCCAFUSCO, J. J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their

implications for novel drug development. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 306, n. 3, p. 821-7, Sep 2003. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805474> >.

OBJ

TERWEL, D. et al. Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. **Am J Pathol**, v. 172, n. 3, p. 786-98, Mar 2008. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258852> >.

OBJ

TRAVERSA, U. et al. Rat brain guanosine binding site. Biological studies and pseudo-receptor construction. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, p. 5417-25, 2003.

OBJ

_____. Specific [(3)H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. **British journal of pharmacology**, v. 135, p. 969-76, 2002.

OBJ

VINADE, E. R. et al. Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. **Neurobiol Learn Mem**, v. 81, n. 2, p. 137-43, Mar 2004. ISSN 1074-7427 (Print)

1074-7427 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990233> >.

OBJ

VINADÉ, E. R. et al. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. **Brain Research**, v. 977, p. 97-102, 2003. ISSN 0006-8993 (Print)\n0006-8993 (Linking).

OBJ

_____. Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, p. 248-253, 2005. ISSN 0360-4012 (Print)\n0360-4012 (Linking).

OBJ

VOLPINI, R. et al. Evidence for the existence of a specific g protein-coupled receptor activated by guanosine. **ChemMedChem**, v. 6, p. 1074-80, 2011.

OBJ

WAGNER, J. A.; CARLSON, S. S.; KELLY, R. B. Chemical and physical characterization of cholinergic synaptic vesicles. **Biochemistry**, v. 17, n. 7, p. 1199-206, Apr 4 1978. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/656382> >.

OBJ

WANG, X. F.; CYNADER, M. S. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. **J Neurochem**, v. 74, n. 4, p. 1434-42, Apr 2000. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737599>>.

[OBJ]

WILLIAMS, C. cAMP detection methods in HTS: selecting the best from the rest. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 2, p. 125-35, Feb 2004. ISSN 1474-1776 (Print)

1474-1776 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040577>>.

[OBJ]

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 93, n. 3, p. 358-64, 1987. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3124165>>.

[OBJ]

WYSS-CORAY, T. et al. Chronic overproduction of transforming growth factor-beta1 by astrocytes promotes Alzheimer's disease-like microvascular degeneration in transgenic mice. **Am J Pathol**, v. 156, n. 1, p. 139-50, Jan 2000. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623661>>.

[OBJ]

ZERANGUE, N.; KAVANAUGH, M. P. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. **Nature**, v. 383, n. 6601, p. 634-7, Oct 17 1996. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8857541>>.

[OBJ]

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 49, n. 6, p. 589-618, Aug 1996. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8912394>>.

[OBJ]

_____. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, Jan-Feb 2001. ISSN 0272-4391. Disponível em: <<Go to ISI>://000168532400006 >.

[OBJ]

_____. Ectonucleotidases in the nervous system. **Novartis Found Symp**, v. 276, p. 113-28; discussion 128-30, 233-7, 275-81, 2006a. ISSN 1528-2511 (Print)

1528-2511 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805426>>.

[OBJ]

_____. Nucleotide signaling in nervous system development. **Pflugers Arch**, v. 452, n. 5, p. 573-88, Aug 2006b. ISSN 0031-6768 (Print) 0031-6768 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16639549>>.

[OBJ]

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N. Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. **J Auton Pharmacol**, v. 16, n. 6, p. 397-400, Dec 1996. ISSN 0144-1795 (Print) 0144-1795 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9131425>>.

[OBJ]

[OBJ]