

Victor Coelho

**ESTUDO DOS EFEITOS DA GUANOSINA E DOS  
EVENTOS INICIAIS DE TOXICIDADE DO PEPTÍDEO  $\beta$ -  
AMILOIDE ( $A\beta_{1-40}$ ) EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS**

Trabalho apresentado ao Curso de  
Graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Inês  
Tasca

Coorientador: M.Sc. Daniel Tonial  
Thomaz

Florianópolis  
2017

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

Coelho, Victor

Estudo dos efeitos da guanosina e dos eventos  
iniciais de toxicidade do peptídeo  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ 1-40)  
em hipocampo de camundongos / Victor Coelho ;  
orientadora, Carla Inês Tasca, coorientador, Daniel  
Tonial Thomaz, 2017.

60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Guanosina. 3.  
Glutamato. 4. Peptídeo A $\beta$ 1-40. 5. Doença de Alzheimer.  
I. Tasca, Carla Inês. II. Thomaz, Daniel Tonial.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Victor Coelho

**ESTUDO DOS EFEITOS DA GUANOSINA E DOS  
EVENTOS INICIAIS DE TOXICIDADE DO PEPTÍDEO  $\beta$ -  
AMILOIDE (A $\beta$ <sub>1-40</sub>) EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS**

Trabalho julgado e aprovado em sua forma final pelos membros da  
Banca Examinadora  
Florianópolis, 23 de julho de 2017.

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Inês Tasca  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

M.Sc. Daniel Tonial Thomaz  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dr. Gianni Mancini  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dr.<sup>a</sup> Tetsade C. B. Piermartiri  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado a todos que  
contribuíram de alguma forma ou de  
outra a realização deste.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha família, meus pais, Wilsair e Alzira, que me apoiaram durante toda minha vida.

À minha orientadora Carla Inês Tasca, pela paciência, orientação e conhecimento.

Aos meus co-orientadores Daniel e Débora, que permitiram este trabalho ser possível.

Aos meus amigos que fiz durante da vida e durante a graduação, que tornaram os momentos difíceis mais fáceis.

Aos meus professores durante a graduação e ensino médio, por terem me ensinado muito.

Ao pessoal do laboratório de Neuroquímica 4 pelas instruções e ensinamentos.

À UFSC e ao CNPQ, pelo suporte financeiro ao laboratório e pela oportunidade do recebimento da bolsa de iniciação científica.

E a todos que de alguma maneira contribuíram direta e indiretamente a este trabalho.





We look up at the same stars and see such  
different things.

(George R. R. Martin, 2000)



## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível que causa demência, perda de memória e danos cognitivos, atingindo cerca de 35,6 milhões de pessoas no mundo, sendo mais comum em pessoas com mais de 65 anos e a principal causa de demência no Brasil. A principal lesão característica é a formação de placas senis, que ocorrem através do acúmulo do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), o que resulta na principal causa do desenvolvimento da DA. A presença do  $A\beta$  nas sinapses neuronais causa uma exacerbada liberação do aminoácido glutamato - que é o principal neurotransmissor excitatório em mamíferos, responsável por processos como aprendizagem e memória - na fenda sináptica. Isso causa um evento conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica. Este evento causa um desbalanço na neurotransmissão normal do glutamato, causando uma série de eventos que podem levar à morte neuronal, incluindo despolarização da membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e perda de viabilidade celular. A guanosina (GUO) é um nucleosídeo liberado pelas células gliais, e é apontado como um potencial agente neuroprotetor, já que promove a recaptação de glutamato para células gliais através da modulação de seus transportadores. Entretanto, esses mecanismos de neuroproteção da GUO não foram completamente descritos e ainda necessitam ser elucidados. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda gerada pela administração do peptídeo  $A\beta$  em hipocampus de camundongos após 24h, e o possível efeito neuroprotetor promovido pela GUO. Os resultados apontam que não há diminuição na viabilidade celular, nem mudanças no potencial de membrana mitocondrial.

Também não foi observado um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, mas parece haver uma tendência no aumento dos níveis de óxido nítrico, efeito que parece ser revertido pela ação da GUO. Também foram avaliados os níveis intracelulares de ATP, que permaneceram estáveis durante a toxicidade do A $\beta$  por 24h. De maneira geral, a toxicidade gerada pelo peptídeo A $\beta$  não é suficiente para causar danos celulares em um período de 24 horas *in vivo*.

**Palavras-chave:** guanosina, glutamato, peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disease that causes dementia, memory loss and cognitive impairment, affecting around de 35,6 million people in the world, being more common in people with more than 65 years old, and the main cause of dementia in Brazil. The main characteristic lesion is the formation of senile plaques, which occur through accumulation of the  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) peptide, which results in the main cause of the development of AD. The presence of  $A\beta$  in neuronal synapses causes an exacerbated release of the aminoacid glutamate – the major excitatory neurotransmitter in mammals, responsible for process such as learning and memory – in the synaptic cleft. This causes an event known as glutamatergic excitotoxicity. This event causes an imbalance in the glutamate normal neurotransmission, causing a series of events that may lead to neuronal death, including mitochondrial membrane depolarization, reactive oxygen and nitrogen species production, and cellular viability loss. Guanosine (GUO) is a nucleoside release by glial cells, and is appointed as a potential neuroprotective agent, since it promotes glutamate recaptation to glial cells by modulating its transporters. However, these GUO neuroprotective mechanisms have not been fully described and still need to be elucidated. The objective of this study was to evaluate the acute toxicity generated by  $A\beta$  peptide administration in mice hippocampus after 24h, and the possible neuroprotective effect promoted by GUO. Results indicate that there is no cellular viability decrease or changes in the mitochondrial membrane potential. Also, there was no increase in reactive oxygen species levels, but there seems to have a trend towards increased nitric oxide levels, an

effect that seems to be reversed by GUO action. Intracellular levels of ATP were also evaluated, which remained stable during A $\beta$  toxicity during 24h. In general, the toxicity generated by A $\beta$  peptide is not sufficient to cause cell damage in 24 hours *in vivo*.

**Keywords:** guanosine, glutamate, A $\beta_{1-40}$  peptide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação de placas amiloides. ....	23
Figura 2 - Esquema do protocolo experimental.....	31
Figura 3 - Estrutura química do MTT e de seu produto formazan .....	32
Figura 4 – Clivagem de DCFH-DA.....	34
Figura 5 – Clivagem de DAF-2 DA .....	35
Figura 6 - Avaliação do efeito da guanosina na viabilidade celular de fatias hipocampais submetidas à toxicidade do peptídeo $\beta$ -amiloide através do ensaio de MTT .....	37
Figura 7 - Avaliação do efeito da guanosina na viabilidade celular de fatias hipocampais submetidas à toxicidade do peptídeo $\beta$ -amiloide através do ensaio de IP .....	38
Figura 8 - Avaliação do efeito da guanosina na produção de espécies reativas de oxigênio em fatias hipocampais submetidas à toxicidade do peptídeo $\beta$ -amiloide através da sonda DCFH-DA .....	39
Figura 9 - Avaliação do efeito da guanosina na produção de óxido nítrico em fatias hipocampais submetidas à toxicidade do peptídeo $\beta$ - amiloide através da sonda DAF-2 DA .....	39
Figura 10 - Avaliação do efeito da guanosina no potencial de membrana mitocondrial em fatias hipocampais submetidas à toxicidade do peptídeo $\beta$ -amiloide através da sonda fluorescente TMRE.....	40
Figura 11 - Avaliação do efeito da guanosina nos níveis de ATP intracelulares em hipocampus submetidas à toxicidade do peptídeo $\beta$ - amiloide através do kit enzimático luciferina-luciferase.....	41





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
- APP: proteína precursora amiloide
- ATP: adenosina trifosfato
- A $\beta$ :  $\beta$ -amiloide (do inglês amyloid beta)
- BK: canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio
- Ca<sup>2+</sup>: cálcio
- DA: doença de Alzheimer
- DAF-2 DA: 4-5-diaminofluoresceína diacetato
- DCFH: diclorofluoresceína
- DCFH-DA: 2',7-diclorofluoresceína diacetato
- DMSO: dimetil-sulfóxido
- EROs: espécies reativas de oxigênio
- GLU: glutamato
- GS: glutamina sintase
- GUO: guanosina
- i.c.v.: infusão intracerebroventricular
- K<sup>+</sup>: potássio
- KRB: tampão bicarbonato Krebs-Ringer
- Na<sup>+</sup>: sódio
- NMDA: o N-metil-D-aspartato
- NO: óxido nítrico
- SNC: sistema nervoso central
- TMRE: tetrametilrodamina-etil-éster
- $\Psi$ m: potencial de membrana mitocondrial



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1	DOENÇA DE ALZHEIMER.....	21
1.2	GLUTAMATO .....	23
1.3	GUANOSINA.....	25
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1	ANIMAIS.....	30
4.2	PREPARAÇÃO DO PEPTÍDEO B-AMILOIDE <sub>1-40</sub> .....	30
4.3	PROTOCOLO DE TRATAMENTO .....	30
4.4	INFUSÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DO PEPTÍDEO B-AMILOIDE <sub>1-40</sub> .....	31
4.5	PREPARAÇÃO DE FATIAS HIPOCAMPAIS .....	31
4.6	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	32
<b>4.6.1</b>	<b>Ensaio de redução de MTT .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Ensaio de incorporação do iodeto de propídeo (IP) .....</b>	<b>32</b>
4.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	33
4.8	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO.....	34
4.9	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	35
4.10	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP .....	35
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
5.1	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GUANOSINA E DO PEPTÍDEO AB SOBRE A VIABILIDADE CELULAR .....	36
5.2	ANÁLISE DO EFEITO DA GUANOSINA E DO PEPTÍDEO AB SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO .....	38

5.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GUANOSINA E DO PEPTÍDEO AB SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	40
5.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GUANOSINA E DO PEPTÍDEO AB SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE ATP	41
6	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
8	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>47</b>
9	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, progressiva e irreversível, caracterizada pela perda gradual da memória e de funções cognitivas. Está principalmente relacionada com o avanço da idade, sendo observada uma maior incidência em pessoas com idade superior a 65 anos. Após essa idade, existe um aumento de 0,5% ao ano nas chances de desenvolver a doença (MAYEUX; SANO, 1999). AD é a mais frequente forma de demência (HERRERA et al., 2002), atingindo cerca de 1 milhão e 200 mil pessoas no Brasil, e cerca de 35,6 milhões de pessoas no mundo. (Norton Sayeg em <<http://www.alzheimermed.com.br/>>. Acesso em 12 de maio de 2017).

No início do século XX, o médico alemão Aloysius Alzheimer caracterizou anatomico-patologicamente a DA por apresentar atrofia em algumas estruturas cerebrais, proeminentemente no córtex, na amígdala e no hipocampo. Posteriormente, foram encontradas as duas lesões características: a formação de emaranhados neurofibrilares, formados pela hiperfosforilação da proteína tau; e placas amiloides, formados pelo acúmulo dos peptídeos  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) (DE STROOPER; KARRAN, 2016). De acordo com a hipótese amiloide, o acúmulo dos peptídeos  $A\beta$  nas células do sistema nervoso central (SNC) resulta na principal causa para o desenvolvimento da doença, enquanto que outras características como a formação de emaranhados, é resultado de um desbalanço entre a produção e remoção dos peptídeos  $A\beta$  (HARDY; SELKOE, 2002).

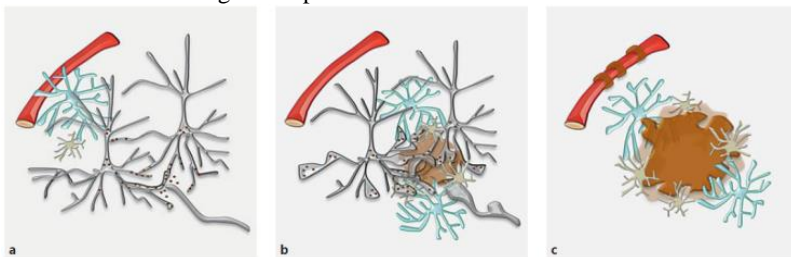
Os peptídeos  $A\beta$  são formados através de duas clivagens a partir da proteína precursora amiloide (APP, do Inglês, amyloid precursor protein), uma glicoproteína transmembrana localizada principalmente

em regiões sinápticas. Sua função principal ainda é pouco conhecida, mas desempenha um papel de regulação na formação de sinapses (PARAMESHWARAN et al., 2007) e na plasticidade neuronal (TURNER et al., 2003). Fisiologicamente localizada na membrana celular, a APP sofre uma clivagem pela enzima  $\alpha$ -secretase, entretanto, quando este processo falha a APP pode ser internalizada e ser clivada por duas diferentes enzimas:  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase (PRILLER et al., 2006). A clivagem realizada pela sequência de  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase pode formar dois oligômeros tóxicos contendo 40 ou 42 aminoácidos, sendo ambos os mais predominantes em células do SNC acometidos com a AD (TURNER et al., 2003). Quando esta clivagem ocorre no retículo endoplasmático, forma-se o  $A\beta_{1-40}$ , e quando ocorre no complexo de Golgi, forma-se o  $A\beta_{1-42}$  (PRILLER et al., 2006). A APP é sintetizada por neurônios e transportada via axônios e dendritos para a proximidade de neuritos e sinapses (KOO et al., 1990; TIENARI et al., 1996), locais onde é preferencialmente clivada o  $A\beta$ , sendo mantida em vesículas endossomais. Extracelularmente,  $A\beta$  é agregado próximo às sinapses formando oligômeros que constituem as placas amiloides (TAKAHASHI et al., 2002; GOURAS et al., 2013) (Figura 1), causando uma cascata de eventos que inclui estresse oxidativo (BICCA et al., 2011), podendo levar as células à apoptose (PETTIFER et al., 2004).

Outro evento relacionado ao desenvolvimento da DA no córtex e hipocampo se dá pelo acúmulo do peptídeo  $A\beta$  é o aumento da liberação do neurotransmissor glutamato no SNC, já que a toxicidade desse aminoácido pode exacerbar a transmissão glutamatérgica, evento que é associado à plasticidade neuronal, incluindo aprendizagem e memória

(REVETT et al., 2013; ESPOSITO et al., 2013; DANYSZ; PARSONS 2012).

Figura 1 - Formação de placas amiloides. **a** O acúmulo do peptídeo A $\beta$  ocorre através do envelhecimento, principalmente em neuritos e sinapses, levando a redução da função sináptica. **b** A $\beta$  fibrilar, mais resistente à degradação do que outros detritos neurais, se acumula formando depósitos. Células gliais sensíveis à disfunção neuronal (astrócitos em azul e micróglias em bege) contribuem para formação da placa. **c** Estágio avançado da placa amiloide formado por um denso núcleo constituído pelos peptídeos A $\beta$ . Neste estágio, o acúmulo também é evidente em vasos sanguíneos próximos.



Fonte: GOURAS et al. (2013).

## 1.2 GLUTAMATO

O aminoácido L-glutamato (GLU) é o principal neurotransmissor excitatório do SNC em mamíferos, e desempenha papel importante em processos como aprendizado, cognição e memória, além de exercer um papel fundamental na formação do SNC, como a formação e eliminação de sinapses, migração, diferenciação e morte celular atuando, sobretudo no córtex e hipocampo (DANBOLT, 2001; DANYSZ et al., 2000). Em neurônios glutamatérgicos, o GLU é sintetizado e estocado em vesículas pré-sinápticas, sendo liberado na fenda sináptica a partir de diversos estímulos, onde interagem com uma série de receptores glutamatérgicos localizados tanto nos neurônios pré e pós-sinápticos quanto nas células da glia (GEGELASHVILI; SCHOUSBOE, 1997).

Existem dois tipos de receptores glutamatérgicos: ionotrópicos, que são canais iônicos; e metabotrópicos, acoplados à proteína G. Dentre os principais receptores ionotrópicos estão o  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA), o N-metil-D-aspartato (NMDA) e o cainato. Receptores AMPA e cainato são canais permeáveis a íons como o sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), sendo assim atribuídos a neurotransmissão excitatória rápida. Já os receptores NMDA respondem de forma mais lenta ao GLU, devido à inibição exercida pelos íons  $\text{Mg}^{2+}$  presentes no meio extracelular, sendo assim conferida uma excitação em longo prazo. Receptores NMDA também são altamente permeáveis a cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), evento que é relacionado à aprendizagem e memória (DANYSZ et al., 2000; BEAS-ZÁRATE et al., 2001; MICHAELIS, 1998).

A finalização da transmissão glutamatérgica ocorre através de sua recaptação por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). A recaptação de GLU é feita principalmente por transportadores presentes em células gliais (EAAT1 e EAAT2), mas também é feita por transportadores presentes em células neuronais (EAAT3 e EAAT4) (STRUZYŃSKA et al., 2005, ZHOU; DANBOLT, 2014).

Devido a sua natureza excitatória, um desequilíbrio na transmissão glutamatérgica pode alterar significativamente o seu papel na plasticidade do sistema nervoso. O acúmulo de GLU na fenda sináptica desencadeia um processo denominado excitotoxicidade glutamatérgica (DANBOLT, 2001). Esse processo pode reduzir a expressão de receptores ionotrópicos (SNYDER et al., 2005), aumentar de forma expressiva a permeabilidade a  $\text{Ca}^{2+}$  (REVETT et al., 2013), induzir disfunção mitocondrial, assim alterando a produção de



adenosina trifosfato (ATP), e ocasionar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SNYDER et al., 2005; REVETT et al., 2013; EMERIT et al., 2004).

Diversos estudos correlacionam o acúmulo de A $\beta$  com aumento da excitotoxicidade glutamatérgica devido a consequência na redução da expressão de receptores NMDA (SNYDER et al., 2005) e da diminuição da captação de GLU (PIERMARTIRI et al., 2010). O peptídeo A $\beta$  também está relacionado com outros processos que causam danos celulares, como o aumento da permeabilidade a Ca<sup>2+</sup> (DE FELICE et al., 2006), indução da disfunção mitocondrial e consequente aumento na produção de EROs e peroxidação lipídica (FIGUEIREDO et al., 2011).

Considerando que a toxicidade glutamatérgica está estritamente envolvida na DA, estudos que avaliam moduladores da transmissão glutamatérgica têm sido sugeridos como uma estratégia de neuroproteção contra esta doença, e a guanosina vem sendo descrita como um potencial agente neuroprotetor em modelos experimentais relacionados à excitotoxicidade glutamatérgica tanto *in vivo* quanto *in vitro* (LANZMASTER et al, 2016).

### 1.3 GUANOSINA

As purinas são uma classe de moléculas aromáticas essenciais para o funcionamento de todas as células. Esse grupo engloba a adenina, guanina e seus derivados, como os nucleosídeos fosforilados e seus metabólitos, dentre eles os nucleosídeos adenosina e guanosina e as bases nitrogenadas adenina, hipoxantina, xantina e ácido úrico. No SNC as purinas derivadas da guanina possuem diversas funções intracelulares, principalmente relacionadas com sinalização celular e

neuromodulação (DECKER et al., 2007), além disto, também exercem numerosas funções extracelulares.

A guanosina (GUO) é um nucleosídeo endógeno derivado da guanina, e seu papel extracelular como modulador no SNC vem sendo atribuída a diversas evidências de efeitos neuroprotetores e neurotróficos (LANZMASTER et al., 2016). No cérebro, a GUO é liberada por células gliais (principalmente astrócitos) após eventos de isquemia ou trauma, podendo permanecer no ambiente extracelular em altas quantidades por até uma semana (RATHBONE et al., 1999).

Diversos estudos evidenciam que GUO modula a transmissão glutamatérgica em modelos experimentais de neurotoxicidade tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A GUO promove a captação de glutamato via transportadores glutamatérgicos não-neuronais em culturas astrocíticas (FRIZZO et al., 2003, 2001) e em fatias hipocâmpais de ratos (DAL-CIM et al., 2013). Também previne a produção de EROs e despolarização da membrana mitocondrial em um protocolo de privação de glicose e oxigênio, utilizado como um modelo de isquemia cerebral *in vitro* (DAL-CIM et al., 2013). Este efeito protetor também é observado em células SH-SY5Y, um neuroblastoma humano, onde é induzida a produção de EROs através do bloqueio dos complexos I e IV da cadeia respiratória; e em células astrogliais C6 através do bloqueio do complexo IV. Tais efeitos são prevenidos pela ação da GUO, que promove a ativação da heme-oxigenase-1, uma importante enzima com função antioxidante (DAL-CIM et al., 2012; QUINCOZES-SANTOS et al., 2014).

Também já foi demonstrado que GUO apresenta efeitos neuroprotetores frente à toxicidade gerada pelo peptídeo A $\beta$ . Em cultura

de células SH-SY5Y, observou-se uma diminuição significativa na morte celular apoptótica após pré-tratamento com GUO frente a adição do peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> (PETTIFER et al., 2004). Já perante a toxicidade gerada por A $\beta$ <sub>1-42</sub> também em células SH-SY5Y, GUO previne contra a apoptose e produção de EROs, além de diminuir a atividade da  $\beta$ -secretase quando adicionada simultaneamente ao peptídeo (TAROZZI et al., 2010).

Apesar de diversos estudos demonstrarem o efeito neuroprotetor da GUO, ainda não está claro se há uma proteína receptora seletiva para GUO e seu exato mecanismo de ação ainda não foi descrito. Alguns estudos sugerem que a GUO tenha um receptor de membrana seletivo (TRAVERSA et al., 2002; VOLPINI et al., 2011). Entretanto, outros alvos proteicos de interação também já foram identificados por nosso grupo. Em protocolos de privação de glicose e oxigênio, foi demonstrado que GUO possui efeito neuroprotetor através da ativação de canais de K<sup>+</sup> de alta condutância ativados por Ca<sup>2+</sup> (BK) (DAL-CIM et al., 2011). Além disto, os efeitos protetores da GUO parecem depender da ativação dos receptores de adenosina A<sub>1</sub>R e A<sub>2a</sub>R (DAL-CIM et al., 2013). Desta forma, apesar de ainda não completamente definido o alvo proteico extracelular, o efeito protetor da GUO também envolve vias de sinalização intracelular, como a via PI3K/Akt e MAPKs (TAROZZI et al., 2010; DAL-CIM et al., 2011; MOLZ et al., 2011), modulação do transporte de glutamato e da atividade da enzima glutamina sintase (GS) (DAL-CIM et al., 2016), bem como modulando o estresse nitroxidativo (THOMAZ et al., 2016).

Deste modo, apesar dos mecanismos de ação da GUO não estarem completamente elucidados, vem se demonstrando que este

nucleosídeo apresenta efeitos neuroprotetores em situações onde há dano oxidativo, mitocondrial e ativação de mediadores inflamatórios (DAL-CIM et al., 2016; THOMAZ et al., 2016).

Em relação à toxicidade do peptídeo A $\beta$ , Bicca e colaboradores (2011) avaliaram um aumento na toxicidade sináptica pelo aumento dos níveis de EROs após um período de 24h da infusão do peptídeo A $\beta$ . Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa também apontam que o A $\beta$  aumenta os níveis de óxido nítrico (NO) e EROs no mesmo período de tempo (MARTINS, 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os danos causados pela infusão do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> por um período de 24h, e o possível papel neuroprotetor da GUO frente a esta toxicidade.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A Doença de Alzheimer atinge cerca de 35,6 milhões de pessoas no mundo, sendo 1,2 milhão somente no Brasil. Presume-se que esses números cheguem a 65,7 milhões em 2030, e 115,4 milhões em 2050 (Norton Sayeg em <<http://www.alzheimermed.com.br/>>. Acesso em 12 de maio de 2017). Em virtude do aumento da expectativa de vida da população, haverá um aumento no número de idosos. O número de casos de demência aumenta em cerca de 4,6 milhões por ano (SMITH, 2006), e estima-se que nos próximos anos haja um aumento na significância da DA relacionada não somente à saúde pública, mas também a questões econômicas (PARAMESHWARAN et al., 2008). Wimo e colaboradores (2010) observaram que os gastos relacionados à demência aumentaram em 34% no período entre 2005 e 2009 a nível mundial, sendo de US\$315 bilhões para US\$422 bilhões, respectivamente.

Molecularmente, a DA é caracterizada por uma série de danos no SNC, incluindo alterações na transmissão glutamatérgica, indução de estresse oxidativo e medidores inflamatórios (MARKESBERY, 1997; ZOTOVA et al., 2010). Esforços científicos buscam por novos fármacos visando atenuar estes efeitos, e a GUO vem sendo descrita como um potencial agente neuroprotetor contra a toxicidade gerada pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide na DA (LANZMASTER et al., 2016). Deste modo, é relevante avaliar os possíveis efeitos da GUO nos eventos iniciais de toxicidade da doença.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste estudo foi avaliar se a guanosina apresenta efeito protetor em eventos iniciais envolvidos na toxicidade gerada por um modelo animal da doença de Alzheimer, através da infusão intracerebroventricular (i.c.v) do peptídeo  $\beta$ -amiloide<sub>1-40</sub>.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a viabilidade celular no hipocampo após a infusão do peptídeo  $\beta$ -amiloide;
- Investigar se a infusão do peptídeo  $\beta$ -amiloide<sub>1-40</sub> acentua a produção de espécies reativas de oxigênio;
- Analisar as alterações no potencial de membrana mitocondrial através da toxicidade gerada pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide<sub>1-40</sub>;
- Verificar os efeitos da infusão do peptídeo  $\beta$ -amiloide<sub>1-40</sub> sobre os níveis intracelulares de ATP.

- Avaliar se o tratamento com guanosina previne e/ou reverte as alterações bioquímicas e celulares ocasionadas pela infusão do peptídeo  $\beta$ -amiloide<sub>1-40</sub>;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos Swiss machos adultos (90 dias ou mais) obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Bioquímica, com acesso à água e comida *ad libitum*, ventilação e temperatura controladas (21 – 23 °C), sob ciclo claro/escuro de 12:12 horas. Os experimentos foram realizados de acordo com as especificações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC), Protocolo N° PP00955.

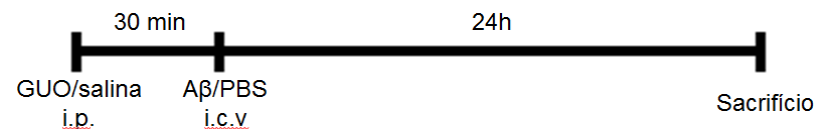
### 4.2 PREPARAÇÃO DO PEPTÍDEO B-AMILOIDE<sub>1-40</sub>

O peptídeo  $\beta$ -amiloide<sub>1-40</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) foi dissolvido em tampão fosfato (PBS 1 mg/ml; pH 7,4) e incubado a 37°C por 4 dias. Alíquotas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso (PREDIGER et al., 2007).

### 4.3 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Os animais receberam administrações de salina (0,9 %, 10 ml/kg) ou guanosina (8 mg/kg) via intraperitoneal, 30 minutos antes da administração do peptídeo A $\beta$  ou PBS (controle) (Figura 2).

Figura 2 - Esquema do protocolo experimental.



Fonte: autor

#### 4.4 INFUSÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DO PEPTÍDEO B-AMILOIDE<sub>1-40</sub>

A $\beta$  (400 pmol/animal, 3  $\mu$ l) ou solução PBS (controle) foram aplicados via i.c.v. Os animais foram anestesiados via intranasal com isoflurano e a cânula para administração i.c.v. foi implantada manualmente a partir do ponto de Bregma (1mm posterior, 1mm direita e 3mm abaixo), visando o ventrículo lateral do hemisfério esquerdo (PREDIGER et al., 2007; BICCA et al., 2011). Por fim, o local da infusão foi assepsiado com água oxigenada e xilocaína 5%.

#### 4.5 PREPARAÇÃO DE FATIAS HIPOCAMPAIS

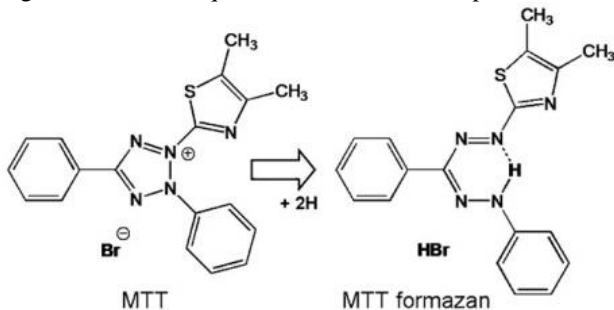
24 horas após a infusão do A $\beta$  os animais foram decapitados, e em seguida os cérebros foram rapidamente retirados e dissecados, e então foram mantidos em tampão bicarbonato Krebs-Ringer (KRB) gelado contendo (todos em mM) NaCl 122; KCl 3; CaCl<sub>2</sub>, 1,3; NaHCO<sub>3</sub> 25; MgSO<sub>4</sub> 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4; D-glicose 10, e gaseificado com 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub> para pH 7.4. As fatias foram preparadas utilizando o *Mcllwain Tissue Chopper* para obtenção de fatias de 250 ou 400  $\mu$ m de espessura. As fatias foram então separadas em tampão KRB e transferidas para uma placa contendo KRB a 37°C, onde foram mantidas sob o período de recuperação por 30 minutos, antes do início dos experimentos.

## 4.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

### 4.6.1 Ensaio de redução de MTT

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Figura 3). MTT é um tetrazólio amarelo solúvel em água, que em células viáveis é reduzido por desidrogenases em cristais de formazan azul que se acumulam no citoplasma (MOSMANN 1983). Após o período de pré-incubação, as fatias hipocampais foram incubadas com MTT (0,5 mg/ml) durante 20 minutos a 37°C. Em seguida, as fatias foram transferidas individualmente para poços contendo 200 µl de dimetil-sulfóxido (DMSO) e mantidas durante 30 minutos sob agitação, para solubilização do formazan reduzido. Deste modo, a viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância obtida pelo leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) em comprimento de onda de 550 nm.

Figura 3 - Estrutura química do MTT e de seu produto formazan.



Fonte: STOCKERT et al. (2012).

### 4.6.2 Ensaio de incorporação do iodeto de propídeo (IP)

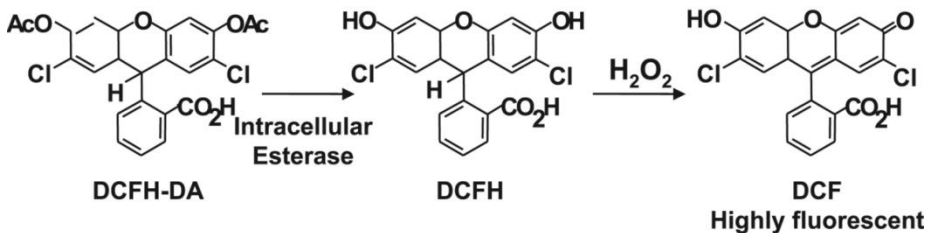


O IP é um composto polar que se difunde em células que apresentam danos em sua membrana celular. Uma vez no citoplasma, ele se liga com ácidos nucleicos e emite uma fluorescência quando excitado (NORABERG et al., 1999). Ao final do período de pré-incubação, as fatias foram incubadas com IP (7 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Em seguida, as fatias foram retiradas do meio contendo IP e foram transferidas para placa de 96 poços. Nesta placa, as fatias foram incubadas individualmente com tampão KRB (200 µl/poço) e a fluorescência foi mensurada em leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) com os comprimentos de onda de 535 e 617 nm, para excitação e emissão, respectivamente (PRINGLE et al., 1996).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Foram mensurados os níveis de espécies reativas através da sonda fluorescente 2',7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Esta sonda se difunde pela membrana celular, e no citoplasma, é hidrolisada para a forma não fluorescente diclorofluoresceína (DCFH) pela ação de esterases intracelulares. Na presença de EROs, DCFH é oxidado a forma DCF, o qual é um composto fluorescente (KRISTIANSEN et al., 2009) (Figura 4). Ao término do período de pré-incubação, as fatias de 250 µm foram incubadas com DCFH-DA (80 µM) por 30 minutos a 37°C. Após, as fatias foram transferidas para placa de 96 poços, contendo 200 µl de KRB. A fluorescência foi obtida através do leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) nos comprimentos de onda 480 e 525 nm, para excitação e emissão, respectivamente.

Figura 4 - DCFH-DA é clivado por esterases intracelulares à DCFH, que é oxidado à molécula fluorescente DCF na presença de EROs.

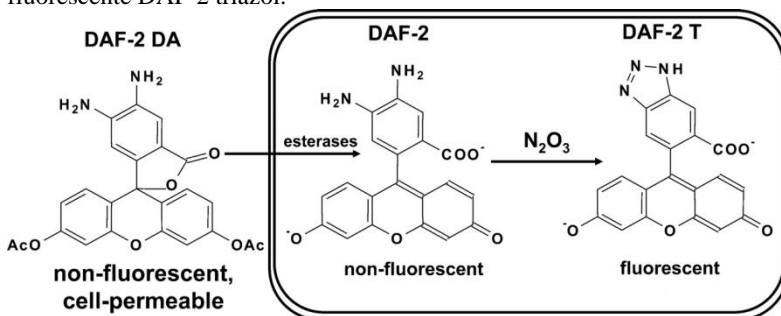


Fonte: DIKALOV et al. (2007).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE NO

Os níveis de óxido nítrico (NO) foram avaliados pela sonda molecular 4-5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA). Esta sonda se difunde pela membrana celular e é hidrolisada no citosol por esterases, formando DAF-2 não fluorescente. Na presença de NO, DAF-2 reage com estas moléculas originando a forma fluorescente DAF-2T (KOJIMA et al., 1998) (Figura 5). Ao fim do período de pré-incubação, as fatias hipocámpais de 250  $\mu\text{m}$  foram incubadas durante 30 minutos a 37°C com DAF-2 DA (10  $\mu\text{M}$ ). As fatias foram então transferidas para poços contendo 200  $\mu\text{l}$  de KRB. A fluorescência foi então medida através do leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) nos comprimentos de onda 485 e 520 nm, para excitação e emissão, respectivamente.

Figura 5 - DAF-2 DA é hidrolisado por esterases intracelulares à DAF-2 não fluorescente. Na presença de derivados de NO, DAF-2 é nitrosado ao composto fluorescente DAF-2 triazol.



Fonte: TARPEY et al. (2004).

#### 4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

O potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ) foi analisado através da sonda fluorescente tetrametilrodamina-etil-éster (TMRE). TMRE é uma sonda catiônica lipofílica, que quando carregada negativamente é acumulada na matriz mitocondrial (EHRENBERG et al., 1988). Ao fim do período de pré-incubação, as fatias foram incubadas com TMRE (100 nM) em KRB a 37°C durante 30 minutos. Depois, foram retiradas e dispostas em placa de 96 poços contendo 200  $\mu$ l de KRB. A fluorescência foi então mensurada pelo leitor de placas (Labsystems iEMS reader MF) nos comprimentos de onda 550 nm para excitação, e 590 nm para emissão.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP

A quantificação dos níveis de ATP foi mensurada através do método bioluminescente luciferina-luciferase, que consiste da adenilação da luciferina por uma molécula de ATP, dando origem à

adenil-lucifeína. Essa molécula é então oxidada por  $O_2$  molecular, formando a oxiluciferina, adenosina monofosfato, dióxido de carbono e luz. A proporção de luz gerada por essa reação é proporcional aos níveis de ATP, então não é necessária excitação para a leitura (BOWERS et al., 1993; FOSTER et al., 2006). Após a retirada, os hipocampus foram homogeneizados em água destilada e adicionados a 64  $\mu$ l de ácido tricloroacético (10%) para uma concentração final de 2%. O homogenato foi então centrifugado por 3 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Foi então retirado o sobrenadante, onde se verificou o pH, que foi ajustado para um valor próximo a 7,4 com adição de tris-(hidroximetil)-aminometano 1 M (OLIVEIRA et al., 2002). Os níveis de ATP foram então medidos através do kit de ensaio bioluminescente (Sigma Aldrich) através de uma curva padrão de concentração conhecida.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através de análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo Teste T de Tukey. Os dados foram expressos como média e erro padrão média (SEM). Foi utilizado o software GraphPad versão 5.03, e os valores considerados significantes foram os com  $p < 0,05$ .

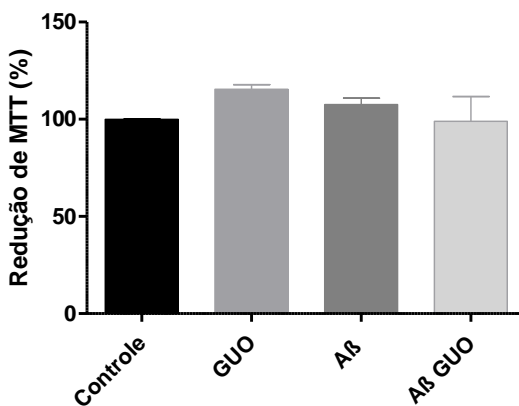
### 5 RESULTADOS

#### 5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GUANOSINA E DO PEPTÍDEO AB SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

Visando avaliar o possível dano celular ocasionado pelo peptídeo A $\beta$  e se a GUO apresenta função protetora em hipocampo de camundongos, foi verificada a viabilidade de fatias hipocampais através do ensaio de MTT.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados com GUO e A $\beta$ , demonstrando que não houve mudanças na viabilidade celular em nenhum tratamento, 24 horas após a infusão do peptídeo A $\beta$  (Figura 6).

**Figura 6 - Avaliação do efeito da guanosina na viabilidade celular de fatias hipocâmpais submetidas à toxicidade do peptídeo  $\beta$ -amiloide através do ensaio de MTT.** Os camundongos foram tratados com guanosina (8mg/kg, i.p.) ou salina (10  $\mu$ l/mg, i.p.). Após 30 minutos, receberam uma única infusão i.c.v com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 p/mol sítio) ou PBS (controle). Após 24 horas da infusão, os hipocâmpos foram retirados e as fatias (400  $\mu$ m) foram incubadas por 30 min com MTT (0,5 mg/ml). Dados expressos em porcentagem do controle com média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

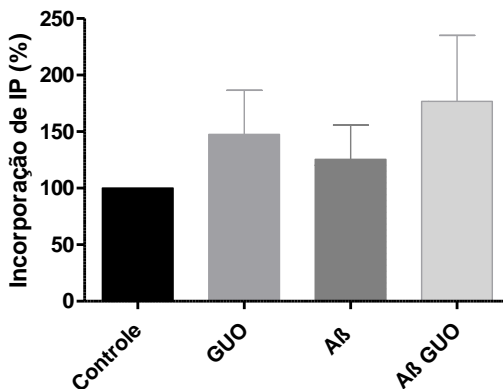


Fonte: autor

A viabilidade celular de fatias hipocâmpais também foi avaliada através do método de incorporação de IP. Esse método é utilizado como um marcador para células mortas ou em processo de morte celular, já que o IP é incorporado somente em células onde houve permeabilização da membrana celular (PRINGLE et al., 1996).

Assim como no ensaio de MTT, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 7).

**Figura 7 - Avaliação do efeito da guanosina na viabilidade celular de fatias hipocâmpais submetidas à toxicidade do peptídeo  $\beta$ -amiloide através do ensaio de IP.** Os camundongos foram tratados com guanosina (8mg/kg, i.p.) ou salina (10  $\mu$ l/mg, i.p.). Após 30 minutos, receberam uma única infusão i.c.v com  $A\beta_{1-40}$  (400 p/mol sítio) ou PBS (controle). Após 24 horas da infusão, os hipocâmpos foram retirados e as fatias (400  $\mu$ m) foram incubadas por 30 min com IP (7  $\mu$ g/ml). Dados expressos em porcentagem do controle com média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).



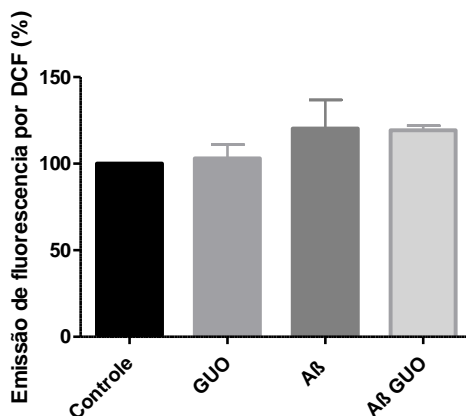
Fonte: autor

## 5.2 ANÁLISE DO EFEITO DA GUANOSINA E DO PEPTÍDEO AB SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

A partir da infusão do  $A\beta$  e do tratamento com GUO em hipocâmpos de camundongos, foi realizada a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA.

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos tratados com GUO e  $A\beta$  e o grupo controle (Figura 8). Estes resultados sugerem que não há uma significativa produção de EROs neste protocolo de tratamento.

Figura 8 - Avaliação do efeito da guanosina na produção de espécies reativas de oxigênio em fatias hipocâmpais submetidas à toxicidade do peptídeo  $\beta$ -amiloide através da sonda DCFH-DA. Os camundongos foram tratados com guanosina (8mg/kg, i.p.) ou salina (10  $\mu$ l/mg, i.p.). Após 30 minutos, receberam uma única infusão i.c.v com  $A\beta_{1-40}$  (400 p/mol sítio) ou PBS (controle). Após 24 horas da infusão, os hipocâmpos foram retirados e as fatias (250  $\mu$ m) foram incubadas por 30 min com DCFH-DA (80  $\mu$ M). Dados expressos em porcentagem do controle com média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicatas (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).



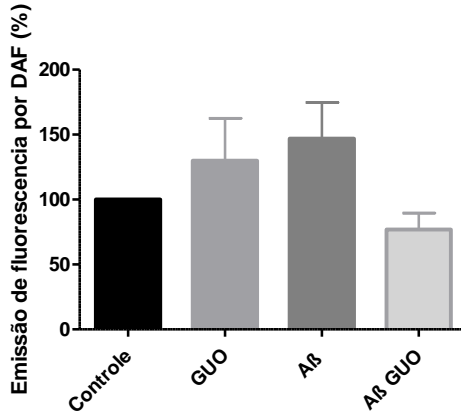
Fonte: autor

Para o ensaio da avaliação da produção de NO através da toxicidade gerada pelo  $A\beta$  e do tratamento com GUO, foi utilizada a sonda fluorescente DAF-2 DA em fatias hipocâmpais.

Assim como no ensaio de EROs, não foram observadas diferenças estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 9). Entretanto, se pode observar uma tendência de aumento na produção de NO no grupo tratado com  $A\beta$ , efeito que parece ser revertido pela ação da GUO.

Figura 9 - Avaliação do efeito da guanosina na produção de óxido nítrico em fatias hipocâmpais submetidas à toxicidade do peptídeo  $\beta$ -amiloide através da sonda DAF-2 DA. Os camundongos foram tratados com guanosina

(8mg/kg, i.p.) ou salina (10  $\mu$ l/mg, i.p.). Após 30 minutos, receberam uma única infusão i.c.v com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 p/mol sítio) ou PBS (controle). Após 24 horas da infusão, os hipocampus foram retirados e as fatias (250  $\mu$ m) foram incubadas por 30 min com DAF-H DA (10  $\mu$ m). Dados expressos em porcentagem do controle com média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos independentes realizados em quadruplicatas (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).



Fonte: autor

### 5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GUANOSINA E DO PEPTÍDEO AB SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

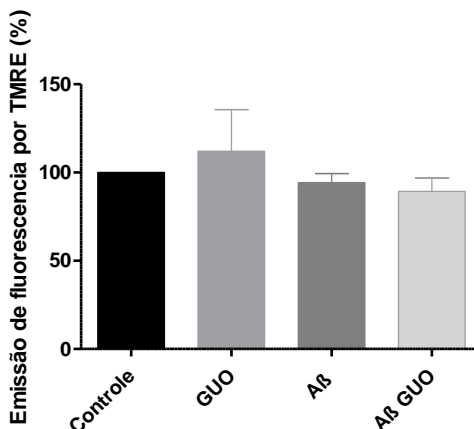
Com o intuito de investigar o  $\Psi$ m de fatias hipocampais submetidas à toxicidade do A $\beta$  e do tratamento com GUO, foi utilizada a sonda fluorescente TMRE.

Os resultados obtidos demonstram que a infusão do peptídeo A $\beta$ , por um período de 24 horas, não provocou mudanças na polarização da membrana mitocondrial, do mesmo modo, o tratamento com GUO não ocasionou mudanças neste parâmetro (Figura 10).

**Figura 10 - Avaliação do efeito da guanosina no potencial de membrana mitocondrial em fatias hipocampais submetidas à toxicidade do peptídeo  $\beta$ -amiloide através da sonda fluorescente TMRE. Os camundongos foram**



tratados com guanosina (8mg/kg, i.p.) ou salina (10 µl/mg, i.p.). Após 30 minutos, receberam uma única infusão i.c.v com A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 p/mol sítio) ou PBS (controle). Após 24 horas da infusão, os hipocampus foram retirados e as fatias (400 µm) foram incubadas por 30 min com TMRE (100 nm). Dados expressos em porcentagem do controle com média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).



Fonte: autor

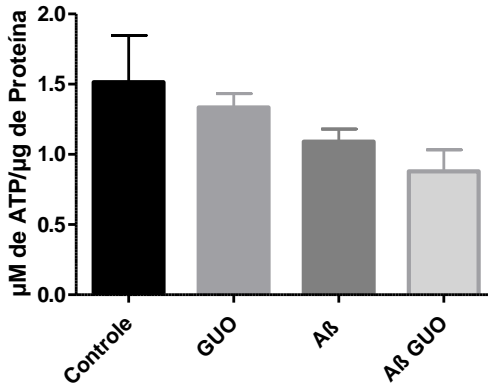
#### 5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GUANOSINA E DO PEPTÍDEO AB SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE ATP

A fim de verificar os níveis intracelulares de ATP em fatias de hipocampo de camundongos submetidos à toxicidade do peptídeo AB e ao tratamento com GUO, foi utilizado um kit enzimático pelo método bioluminescente luciferina-luciferase.

Neste protocolo também não foram observadas diferenças significativas na produção de ATP entre os diferentes grupos (Figura 11).

**Figura 11 - Avaliação do efeito da guanosina nos níveis de ATP intracelulares em hipocampus submetidas à toxicidade do peptídeo  $\beta$ -amiloide através do kit enzimático luciferina-luciferase. Os camundongos**

foram tratados com guanosina (8mg/kg, i.p.) ou salina (10  $\mu$ l/mg, i.p.). Após 30 minutos, receberam uma única infusão i.c.v com  $A\beta_{1-40}$  (400 p/mol sítio) ou PBS (controle). Após 24 horas da infusão, os hipocampus foram retirados e homogeneizados e analisados através do kit enzimático luciferina-luciferase. Dados expressos em porcentagem do controle com média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes, e foi feita uma razão entre a quantidade de ATP e de proteínas na amostra (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).



Fonte: autor

## 6 DISCUSSÃO

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva sem cura, e é vista como um grande problema de relevância clínica, já que é a causa mais frequente de demência, atingindo uma parcela relevante da população. O acúmulo dos peptídeos  $A\beta$  no cérebro resulta na principal causa para o desenvolvimento da doença, deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar os eventos iniciais da toxicidade promovida pela infusão do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  após um período de 24h em camundongos adultos. Também investigamos os possíveis efeitos neuroprotetores da guanosina, a qual foi administrada via intraperitoneal 30 minutos antes da infusão do peptídeo  $A\beta$ .

A agregação e formação de oligômeros do peptídeo  $\beta$ -amilóide são apontados como a principal causa para o desenvolvimento da DA (HARDY; SELKOE, 2002); a formação dos emaranhados fibrilares, resultante da excessiva agregação de  $A\beta$ , ocasiona uma série de eventos relacionados a exacerbada liberação de glutamato, levando à excitotoxicidade glutamatérgica (DANBOLT, 2001). Este evento envolve danos celulares, o que acaba induzindo a disfunção mitocondrial, processo que é fortemente relacionado ao aumento da produção de EROs e ao comprometimento da síntese de ATP, o que pode conduzir à morte celular (SNYDER et al., 2005; REVETT et al., 2013; EMERIT et al., 2004).

A GUO é apontada como uma potencial molécula protetora contra doenças neurodegenerativas e danos neurológicos (LANZMASTER et al., 2016). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a GUO é capaz de proteger fatias hipocâmpais de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio, já que diminui o estresse oxidativo, recupera o potencial de membrana mitocondrial (THOMAZ et al., 2016) e previne contra morte celular (DAL-CIM et al., 2012, 2013, 2016). Diversos estudos demonstram esta atividade neuroprotetora também contra a toxicidade gerada pelo  $A\beta$ . A GUO protege contra a perda de viabilidade celular e apoptose de cultura celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, que foi gerada pela administração de oligômeros de  $A\beta_{1-42}$  (TAROZZI et al., 2010). Foi observado também o papel da GUO em testes comportamentais de camundongos, onde a GUO previne o comportamento anedônico gerado pela administração do  $A\beta_{1-40}$  (LANZMASTER et al., 2016).

Tarozzi e colaboradores (2010) e Alam e colaboradores (2017) demonstraram uma diminuição da viabilidade celular após 24 e 70 horas, respectivamente, da administração de  $A\beta_{1-42}$  em cultura celular de neuroblastoma SH-SY5Y, o que demonstra que a cascata de eventos gerada pela administração do  $A\beta$  pode afetar a viabilidade celular em um curto período de tempo. Piermartiri et al. (2010) e Martins et al. (2016) (dados não publicados) também observaram perda neuronal após 15 dias de exposição à toxicidade do peptídeo  $A\beta$  após o protocolo de infusão em camundongos. Entretanto, este fenômeno não foi observado em hipocampos de camundongos após 24 horas da administração i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ . Espera-se que com o aumento do tempo da exposição ao  $A\beta$ , haja um comprometimento da viabilidade celular gerada pela toxicidade do mesmo.

Soodi e colaboradores (2016) observaram um aumento no processo apoptótico, a partir da marcação com IP, em cultura de células cerebelares granulares após 48h da infusão do peptídeo  $A\beta$ . Em nosso modelo de toxicidade, não foi observado um aumento da incorporação de IP, sugerindo que a toxicidade gerada pela administração do peptídeo  $A\beta$  não causou um aumento no processo de morte celular dentro de 24 horas.

Apesar da administração do  $A\beta$  no cérebro de roedores não induzir os aspectos patológicos da DA, esta infusão é capaz de imitar os eventos iniciais da doença, portanto, é um bom modelo para caracterização experimental. Bicca e colaboradores (2011) observaram uma toxicidade aguda 24h após a infusão do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em hipocampo de camundongos, onde foi relatado um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio. Este mesmo

evento foi verificado por Martins (2016) (dados não publicados), onde também foi observado um aumento na produção de óxido nítrico, indicando estresse oxidativo gerado pela toxicidade aguda do A $\beta$ <sub>1-40</sub>. O aumento nos níveis de EROs após 24h também foi verificado recentemente por Amin et al. (2017), em culturas celulares expostas ao A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Este fenômeno é ocasionado aparentemente pela interação dos oligômeros de A $\beta$  com os receptores NMDA, o que provoca um rápido influxo de Ca<sup>2+</sup> para os neurônios, conseqüentemente, aumentando a produção de espécies reativas (DE FELICE et al., 2006).

Os resultados obtidos neste trabalho não demonstram uma diferença na produção de EROs entre os diferentes grupos em fatias hipocâmpais de 250 $\mu$ m. Entretanto, dados obtidos por Bicca et al. (2011) e Martins (2016) (dados não publicados) demonstram um aumento nos níveis de EROs no hipocampo de camundongos tratados com A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Essa diferença pode ser devida ao baixo número de experimentos (3). Neste mesmo tratamento, Martins observou também um aumento na produção de NO. Apesar de os dados obtidos neste trabalho não apresentarem diferenças estatísticas, parece haver uma tendência no aumento da produção de NO nos grupos tratados com A $\beta$ , e o tratamento com GUO parece reverter este processo. Em experimentos adicionais, foram utilizadas fatias de 400 $\mu$ m para todas as análises, mas evidenciamos que na utilização de protocolos com sondas fluorescentes, poderíamos obter resultados mais confiáveis com fatias menos espessas. Portanto, experimentos adicionais serão necessários para uma melhor compreensão deste processo.

Uma das vias de produção de espécies reativas de está ligada a perda do potencial de membrana mitocondrial. Os resultados obtidos

neste trabalho demonstram que não houve aumento de EROs, assim como não foi observado diferenças no potencial de membrana mitocondrial pela toxicidade gerada por um período de 24 horas pelo A $\beta$ . Entretanto, em experimentos mais longos, foi observada uma diminuição no potencial de membrana gerada pela toxicidade do A $\beta$  (FAIZI et al., 2016), o que sugere que é necessário um maior período de tempo para que a toxicidade gerada pelo A $\beta$  possa alterar o potencial de membrana mitocondrial.

Lanznaster et al. (2016) observou um grande aumento nos níveis de ADP e um pequeno aumento nos níveis de ATP em cérebros de camundongos submetidos à toxicidade gerada pelo A $\beta_{1-40}$  após 21 dias. Levando-se em conta que o A $\beta$  causa danos na mitocôndria, é proposto que este evento se dá através de um mecanismo compensatório a fim de manter o metabolismo energético do cérebro. Nos resultados obtidos neste trabalho, não foram observados diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que não há mudanças nos níveis de ATP em um período de tratamento de 24 horas.

De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho apontam que a toxicidade gerada pelo peptídeo A $\beta_{1-40}$  pouco afeta os mecanismos celulares em hipocampos de camundongos durante um período curto de exposição de 24 horas, e também que a GUO não afeta estes mecanismos.

## **7 CONCLUSÕES**

No presente estudo, avaliamos o possível efeito neuroprotetor da guanosina contra a toxicidade aguda induzida pelo peptídeo A $\beta_{1-40}$  em camundongos. Neste trabalho observou-se que:

- A toxicidade gerada pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  não altera a viabilidade celular em hipocampos de camundongos 24 horas após a infusão.

- Os níveis de EROs e potencial de membrana mitocondrial parecem não ser afetados pela toxicidade gerada por  $A\beta_{1-40}$  e nem pela administração de guanosina neste período.

- Houve uma tendência no aumento dos níveis de NO após 24 horas da infusão do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , e esse efeito aparece ser atenuado pelo pré-tratamento com GUO.

- Não houve alterações nos níveis intracelulares de ATP em hipocampos submetidos à toxicidade do  $A\beta_{1-40}$  em um período de 24 horas.

## **8 PERSPECTIVAS**

- Repetir a avaliação da produção de óxido nítrico provocada pela peptídeo  $A\beta$  a fim de confirmar as tendências estatísticas obtida nos experimentos;

- Avaliar os níveis de óxido nítrico a partir de ensaios indiretos, como o de produção de nitrito e nitrato;

- Quantificar os níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ , evento que é diretamente relacionado à excitotoxicidade glutamatérgica.

## **9 REFERÊNCIAS**

<http://www.alzheimermed.com.br/>, Dr. Norton Sayeg – acessado em 12 de maio de 2017

ALAM, P., SIDDIQI, M. K., CHATURVEDI, S. K., ZAMAN, M., KHAN, R. H. Vitamin B12 offers neuronal cell protection by inhibiting A $\beta$ <sub>42</sub> amyloid fibrillation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 477–482, 2017.

AMIN, F. U., SHAH, S. A., KIM, M. O. Vanillic acid attenuates A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-15, 2017.

BEAS-ZÁRATE, C., RIVERA-HUIZAR, S. V., MARTINEZ-CONTRERAS, A., FEIRA-VELASCO, A., ARMENDARIZ-BORUNDA, J. Changes in NMDA-receptor gene expression are associated with neurotoxicity induced neonatally by glutamate in the rat brain. **Neurochemistry International**, v. 39, p. 1–10, 2001.

BICCA, M. A., FIGUEIREDO, C. P., PIERMARTIRI, T. C., MEOTTI, F. C., BOUZON, Z. L., TASCA, C. I., MEDEIROS, R., CALIXTO, J. B. 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. 631-641, 2011.

BOWERS, K. C., ALLSHIRE, A. P., COBBOLD, P. H. Continuous measurements of cytoplasmic ATP in single cardiomyocytes during simulation of the “oxygen paradox”. **Cardiovascular Research**, v. 27, p. 1836–1839, 1993.



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

DAL-CIM, T., MARTINS, W. C., SANTOS, A. R. S., TASCA, C. I. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neuroscience**, v. 183, p. 212–220, 2011.

DAL-CIM, T., MARTINS, W. C., THOMAZ, D. T., COELHO, V., POLUCENO, G. G., LANZMASTER, D., VANDRESEN-FILHO, S., TASCA, C. I. Neuroprotection Promoted by Guanosine Depends on Glutamine Synthetase and Glutamate Transporters Activity in Hippocampal Slices Subjected to Oxygen/Glucose Deprivation. **Neurotoxicity Research**, v. 29, p. 460–468, 2016.

DAL-CIM, T., MOLZ, S., EGEA, J., PARADA, E., ROMERO, A., BUDNI, J., DE SAAVEDRA, M. D. M., DEL BARRIO, L., TASCA, C. I., LÓPEZ, M. G. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. **Neurochemistry International**, v. 61, p. 397–404, 2012.

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

DANYSZ, W., PARSONS, C. G. Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine - searching for the connections. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, p. 324–352, 2012

DANYSZ, W., PARSONS, C. G., MÖBIUS, H., STÖFFLER, A., QUACK, G. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease - a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. **Neurotoxicity Research**, v. 2, p. 85–97, 2000.

DE FELICE, F. G., VELASCO, P. T., LAMBERT, M. P., VIOLA, K., FERNANDEZ, S. J., FERREIRA, S. T., & KLEIN, W. L. A $\beta$  oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 11590–11601, 2006.

DE STROOPER, B., KARRAN, E. The cellular phase of Alzheimer's disease. **Cell**, v. 164, p. 603–615, 2016.

DECKER, H., FRANCISCO, S. S., MENDES-GE-AGUIAR, C. B. N., ROMÃO, L. F., BOECK, C. R., TRENTIN, A. G., MOURA-NETO, V.,

TASCA, C. I. Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, p. 1943–1951, 2007.

DIKALOV, S., GRIENGLING, K. K., HARRISON, D. G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. **Hypertension**, v. 49, p. 717–727, 2007.

EHRENBERG, B., MONTANA, V., WEI, M. D., WUSKELL, J. P., LOEW, L. M. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. **Biophysical Journal**, v. 53, p. 785–794, 1988.

EMERIT, J., EDEAS, M., & BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 58, p. 39–46, 2004.

ESPOSITO, Z., BELLI, L., TONIOLO, S., SANCESARIO, G., BIANCONI, C., MARTORANA, A. Amyloid  $\beta$ , glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: are we on the right track? **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 19, p. 549-555, 2013.

FAIZI, M., SEYDI, E., ABARGHUYI, S., SALIMI, A., NASOOHI, S., POURAHMAD, J. A search for mitochondrial damage in Alzheimer's disease using isolated rat brain mitochondria. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 185–195, 2016.

FIGUEIREDO, C. P., BICCA, M. A., LATINI, A., PREDIGER, R. D. S., MEDEIROS, R., CALIXTO, J. B. Folic acid plus  $\alpha$ -tocopherol mitigates amyloid- $\beta$ -induced neurotoxicity through modulation of mitochondrial complexes activity. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 24, p. 61–75, 2011

FOSTER, K. A., GALEFFI, F., GERICH, F. J., TURNER, D. A., & MÜLLER, M. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 79, p. 136–171, 2006.

FRIZZO, M. E. D., SOARES, F. A. A., DALL'ONDER, L. P., LARA, D. R., SWANSON, R. A., SOUZA, D. O. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. **Brain Research**, v. 972, p. 84–89, 2003.

FRIZZO, M. E., LARA, D. R., DAHM, K. C., PROKOPIUK, A. S., SWANSON, R. A., SOUZA, D. O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. **Neuroreport**, v. 12, p. 879–81, 2001.

GEGELASHVILI, G., SCHOUSBOE, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. **Molecular Pharmacology**, v. 52, p. 6–15, 1997.

GOURAS, G. K., WILLÉN, K., FAIDEAU, M. The inside-out amyloid

hypothesis and synapse pathology in Alzheimer's disease. **Neurodegenerative Diseases**, v. 13, p. 142–146, 2013.

HARDY, J., SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, p. 353–356, 2002.

HERRERA, E., CARAMELLI, P., SILVEIRA, A. S. B., & NITRINI, R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling brazilian population. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 16, p. 103–108, 2002.

KOJIMA, H., SAKURAI, K., KIKUCHI, K., KAWAHARA, S., KIRINO, Y., NAGOSHI, H., HIRATA, Y., NAGANO, T. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, p. 373–375, 1998.

KOO, E. H., SISODIA, S. S., ARCHER, D. R., MARTIN, L. ., WEIDEMANN, A., BEYREUTHER, K., FISCHER, P. MASTERS, C.L. PRICE, D.L.PRICE, D. L. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 1561–1565, 1990.

KRISTIANSEN, K. A., JENSEN, P. E., MØLLER, I. M., SCHULZ, A. Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living

cells by use of the fluorescent probe CM-H<sub>2</sub>DCFDA and confocal laser microscopy. **Physiologia Plantarum**, v. 136, p. 369–383, 2009.

LANZMASTER, D., DAL-CIM, T., PIERMARTIRI, T. C. B., TASCA, C. I. Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. **Aging and Disease**, v. 7, p. 657-679, 2016.

LANZMASTER, D., MACK, J. M., COELHO, V., GANZELLA, M., ALMDEIRA, R. F., DAL-CIM, T., HANSEL, G., ZIMMER, E. R., SOUZA, D. O., PREDIGER, R. D., TASCA, C. I. Guanosine prevents anhedonic-like behavior and impairment in hippocampal glutamate transport following amyloid- $\beta_{1-40}$  administration in mice. **Molecular Neurobiology**, 2016.

MARKESBERY, W. R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, p. 134–147, 1997.

MAYEUX, R., SANO, M. Treatment of Alzheimer's Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1670–1679, 1999.

MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 369–415, 1998.

MOLZ, S., DAL-CIM, T., BUDNI, J., MARTÍN-DE-SAAVEDRA, M. D., EGEA, J., ROMERO, A., DEL BARRIO, L., RODRIGUES, A. L. S., LÓPEZ, M. G., TASCA, C. I. Neuroprotective effect of guanosine

against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, p. 1400–1408, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NORABERG, J., KRISTENSEN, B. W., ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Research Protocols**, v. 3, p. 278–290, 1999.

OLIVEIRA, I. J. L., MOLZ, S., SOUZA, D. O., TASCA, C. I. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an *in vitro* model of ischemia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, p. 335-344, 2002.

PARAMESHWARAN, K., DHANASEKARAN, M., SUPPIRAMANIAM, V. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. **Experimental Neurology**, v. 210, p. 7–13, 2008.

PETTIFER, K. M., KLEYWEGT, S., BAU, C. J., RAMSBOTTOM, J. D., VERTES, E., CICCARELLI, R., CACIAGLI, F., WERSTIUK, E.

S., RATHBONE, M. P. Guanosine protects SH-SY5Y cells against  $\beta$ -amyloid-induced apoptosis. **NeuroReport**, v. 15, p. 833–836, 2004.

PIERMARTIRI, T. C. B., FIGUEIREDO, C. P., RIAL, D., DUARTE, F. S., BEZERRA, S. C., MANCINI, G., DE BEM, A. F., PREDIGER, R. D. S., TASCA, C. I. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- $\beta_{1-40}$  administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Experimental Neurology**, v. 226, p. 274–284, 2010.

PREDIGER, R. D. S., FRANCO, J. L., PANDOLFO, P., MEDEIROS, R., DUARTE, F. S., DI GIUNTA, G., FIGUEIREDO, C. P., FARINA, M., CALIXTO, J. B., TAKAHASHI, R. N., DAFRE, A. L. 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. **Behavioural Brain Research**, v. 177, p. 205–213, 2007.

PRILLER, C., BAUER, T., MITTEREGGER, G., KREBS, B., KRETZSCHMAR, H. A., HERMS, J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 7212–7221, 2006.

PRINGLE, A. K., BENHAM, C. D., SIM, L., KENNEDY, J., IANNOTTI, F., SUNDSTROM, L. E. Selective n-type calcium channel antagonist omega conotoxin mviiia is neuroprotective against hypoxic



neurodegeneration in organotypic hippocampal-slice cultures. **Stroke**, v. 27, p. 2124-2130, 1996.

QUINCOZES-SANTOS, A., BOBERMIN, L. D., SOUZA, D. G., BELLAVER, B., GONÇALVES, C. A., SOUZA, D. O. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: A putative role of heme oxygenase 1. **Journal of Neurochemistry**, v. 130, p. 61–74, 2014.

RATHBONE, M. P., MIDDLEMISS, P. J., GYSBERS, J. W., ANDREW, C., HERMAN, M. A. R., REED, J. K., CICCARELLI, R., DI IORO, P., CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 56, p. 663–690, 1999.

REVETT, T. J., BAKER, G. B., JHAMANDAS, J., KAR, S. Glutamate system, amyloid  $\beta$  peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 38, p. 6-23, 2013.

SMITH, A. D. Prevention of dementia: a role for B vitamins? **Nutrition and Health**, v. 18, p. 225–226, 2006.

SNYDER, E. M., NONG, Y., ALMEIDA, C. G., PAUL, S., MORAN, T., CHOI, E. Y., NAIRIN, A. C., SALTER, M. W., LOMBROSO, P. J., GOURAS, G. K., GREENGARD, P. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . **Nature Neuroscience**, v. 8, p. 1051–1058, 2005.

SOODI, M., DASHTI, A., HAJIMEHDIPOOR, H., AKBARI, S., ATAELI, N. Melissa officinalis acidic fraction protects cultured cerebellar granule neurons against beta amyloid-induced apoptosis and oxidative stress. **Cell Journal**, v. 18, p. 556–564, 2016.

STOCKERT, J. C., BLÁZQUEZ-CASTRO, A., CAÑETE, M., HOROBIN, R. W., VILLANUEVA, Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, p. 785–796, 2012.

STRUZYŃSKA, L., CHALIMONIUK, M., SULKOWSKI, G. Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in lead-exposed adult rat brain. **Neurochemistry International**, v. 47, p. 326–333, 2005.

TAKAHASHI, R. H., MILNER, T. A., LI, F., NAM, E. E., EDGAR, M. A., YAMAGUCHI, H., BEAL, M. F., XU, H., GREENGARD, P., GOURAS, G. K. Intra-neuronal Alzheimer A $\beta$ 42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. **The American Journal of Pathology**, v. 161, p. 1869–1879, 2002.

TAROZZI, A., MERLICCO, A., MORRONI, F., BOLONDI, C., DI IORIO, P., CICCARELLI, R., ROMANO, S., GIULIANI, P., HRELIA, P. Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers. **Journal Biological Regulators Homeostatic Agents**, v. 24, p. 297–306, 2010.

TARPEY, M. M., WINK, D. A., GRISHAM, M. B. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. **Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, p. 431–444, 2004.

THOMAZ, D. T., DAL-CIM, T. A., MARTINS, W. C., CUNHA, M. P., LANZMASTER, D., BEM, A. F. DE, TASCA, C.I. Guanosine prevents nitroxidative stress and recovers mitochondrial membrane potential disruption in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. **Purinergic Signalling**, v. 12 p. 707–718, 2016.

TIENARI, P. J., DE STROOPER, B., IKONEN, E., SIMONS, WEIDEMANN, A., CZECH, C., HARTMANN, T., IDA, N., MULTHAUP, G., MASTERS, C. L., VAN LEUVEN, F., BEYREUTHER, K. M., DOTTL, C. G. The  $\beta$ -amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 5218–5229, 1996.

TRAVERSA, U., BOMBI, G., DI IORIO, P., CICCARELLI, R., WERSTIUK, E. S., RATHBONE, M. P. Specific [ $^3$ H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 969–976, 2002.

TURNER, P. R., O'CONNOR, K., TATE, W. P., ABRAHAM, W. C. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating

neural activity, plasticity and memory. **Progress in Neurobiology** , v.70, p. 1-32, 2003.

VOLPINI, R., MARUCCI, G., BUCCIONI, M., DALBEN, D., LAMBERTUCCI, C., LAMMI, C., MISHRA, R. C., THOMAS, A., CRISTALLI, G. Evidence for the existence of a specific G protein-coupled receptor activated by guanosine. **ChemMedChem**, v. 6, p. 1074–1080, 2011.

WIMO, A., WINBLAD, B., JÖNSSON, L. The worldwide societal costs of dementia: estimates for 2009. **Alzheimer's & Dementia**, v. 6, p. 98–103, 2010.

ZHOU, Y., DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, p. 799–817, 2014.

ZOTOVA, E., NICOLL, J. A. R., KALARIA, R., HOLMES, C., BOCHE, D. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 2, p. 1–9, 2010.