

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIA BÁSICA DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**BIOQUÍMICA**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE GMP SOBRE PARAMETROS  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS**

**MARCELO GANZELLA**

**Orientador**

**Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza**

**Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.**

**Porto Alegre**

**2007**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Diogo, por além de me orientar, ser a incrível pessoa que é; demonstrando a cada oportunidade que tem a alegria de viver e o valor das pessoas.

Aos Profs. Felix A. Soares, Lisiane O. Porciúncula, Luis Valmor “Roska” Portela e Susana T. Wofchuk, por me fazerem ver que as pessoas, além de crescer, evoluem, sem perder a admiração pela vida.

Às Profs. Carina Rodrigues Boeck e Deusa Vendite por abrirem as portas deste departamento, e me fazer perceber o gosto pela pesquisa.

Às ilustres e formidáveis pessoas dos labs. 26 e 28 - Bibi, Ana Elisa, Vanessa, Renata, Julia, Gisele, Miriam, Fernanda, Natalia, Carolina, Daniela, Victor, João, Marcos, Bruno, Giordano, Jean, Rafael, André, Alexandre, Olavo, Denis, que além do companheirismo na bancada, propiciaram um incrível desenvolvimento humano, em todos os possíveis e imagináveis sentidos. Não esquecendo, agradeço também aos amigos do lab.35: Graça, Ana Paula, Cíntia e Dioguinho

Aos parceiros Roberto, Luisa, Jonas e Leonardo por me acompanharem em boa parte dos experimentos e me deixar aprender um pouquinho de ciência com cada um deles.

Aos meus amigos, ou melhor, a minha família gaúcha - Dani, Helen e Marcos, que desde a minha chegada aqui no sul estão sempre do meu lado.

A minha família paulista, esta também sanguínea, que mesmo longe, vem a cada dia ficando mais perto de mim. Amo vocês: Camila, Diogo, Maluca (Mãe) e Clovis. Ah, não podia deixar de agradecer aos meus amigos de longe que sempre que podem se estão por perto: Paola e Arthur.

Aos professores e funcionários deste departamento, que em conjunto constroem a excelência deste curso. Um abraço especial à Cléia e à Simone.

Ao CNPQ por financiar não somente a minha bolsa, mas a de vários estudantes, e por assim fazer um proveitoso uso dos impostos brasileiros.

## SUMARIO

Resumo	V
Abstract	VI
Abreviaturas	VII
Apresentação	VIII
I- Introdução	1
II- Objetivos	7
III- Materiais, Métodos	8
IV- Resultados	8
V- Discussão	16
VI- Conclusões	19
VII- Referências Bibliográficas	20

## RESUMO

Várias evidências indicam que os derivados da guanina (nucleotídeos GTP, GDP, GMP e o nucleosídeo guanosina) são capazes, além de atuarem intracelularmente, de atuarem do lado externo da membrana plasmática celular, exercendo efeitos neuromoduladores no sistema nervoso central. Funções tróficas, mitóticas e até antiapoptóticas nas diferentes células neurais já foram descritas para alguns dos derivados, mas são os efeitos relacionados ao antagonismo do sistema glutamatérgico que parecem indicar um grande potencial terapêutico para os derivados da guanina.

Os derivados da guanina, especialmente a guanosina, são capazes de estimular a captação de glutamato em cultura de células astrocíticas e em fatias de tecido cerebral. Atuam como anticonvulsivantes pelas mais diversas vias de administração, e ainda possuem efeito amnésico em ratos e camundongos. Tanto o aumento provocado na captação de glutamato, como o efeito anticonvulsivante parece ser realizado especificamente pela guanosina, uma vez que os nucleotídeos necessitam ser hidrolisados para exercerem tais efeitos. Nesta dissertação, demonstramos que o GMP administrado tanto sistemicamente, como centralmente é capaz de exercer um efeito amnésico em camundongos na tarefa da esQUIVA inibitória. Como na ação anticonvulsivante e, sobre a modulação da captação de glutamato, a guanosina parece ser a real efetora do efeito amnésico apresentado pelo GMP, uma vez que o uso de um inibidor da conversão de GMP para guanosina leva à inibição do seu efeito. Ainda, essa conversão do GMP a guanosina parece ser realizada tanto sistemicamente como centralmente em camundongos. Desta forma, a administração de GMP parece ser uma efetiva estratégia para aumentar os níveis de GUO em futuros estudos sobre as possíveis ações terapêuticas da GUO.

## ABSTRACT

Several evidences report that guanine based purines (nucleotides GTP, GDP, GMP and guanosine nucleoside) acts , besides intracellularly, at the outside of plasmatic membrana, exerting neuromodulatory roles in central nervous system. Trophic, mitotic and even antiapoptotic functions in different neural cells have been described to some of the guanine based purines, however the effects in relation to the glutamatergic system seem to indicate an important therapeutic potential for guanine based purines.

The guanine based purines, mainly guanosine, are able to stimulate the glutamate uptake in astrocyte culture and brain tissue slices. They act as anticonvulsant by different vias of administration, and also display an amnesic effect in rats and mice. Both the stimulatory upon the glutamate uptake, and the anticonvulsant effects seem to be specifically to guanosine, given that the nucleotides has to be hydrolyzed to display these effects. In this study, we showed that both a systemic or a centrally administration of GMP is able to display an amnesic effect at the inhibitory avoidance task in mice. Like the anticonvulsant and stimulatory upon glutamate uptake effects, the guanosine seems to be the real agent for the amnesic effect displayed by GMP, since when an inhibitor of the conversion of GMP to guanosine is used before the centrally nucleotide administration, the amnesic effect is not observed. In addition, the conversion of GMP to guanosine seems to occur both systemically and centrally in mice. the action of ecto-5V-nucleotidase. Therefore, administration of GMP may also be an effective strategy to increase GUO levels in future studies of possible therapeutic actions of GUO.

## ABREVIATURAS

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDP	Guanosina difosfato
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GMP	Guanosina monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
GUO	Guanosina
iGluR	Receptores ionotrópicos para glutamato
KA	Ácido cáinico
L-AP4	L-2-amino-4-fosfonobutirato
MGluR	Receptores metabotrópicos para glutamato
MK-801	(+)-5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina
NMDA	N-metil-D-aspartato
SNC	Sistema nervoso central

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação se constitui de:

Item I – Introdução: uma breve fundamentação que originou o trabalho.

Item II – Objetivos: os objetivos gerais que orientaram esta dissertação.

Item III – Materiais e Métodos e item IV - Resultados: A apresentação dos materiais e métodos e resultados estão sob a forma de artigo científico já publicado na revista *Neurobiology of Learning and Memory* 85: 206-212 (2006).

Item V – Discussão: são apresentados comentários gerais sobre os resultados obtidos neste trabalho.

Item VI - Conclusões: e as conclusões sobre os resultados obtidos neste trabalho.

Item VII – Referências Bibliográficas: refere-se somente às citações contidas no Item I e V desta dissertação.



## I- INTRODUÇÃO

Os derivados da guanina – nucleotídeos: GTP, GDP e GMP, e o nucleosídeo guanosina (GUO) - em conjunto com os derivados da adenina compõem o sistema purinérgico. Atualmente várias evidências indicam que além das ações intracelulares classicamente associadas aos derivados da guanina, como a participação no sistema de sinal transmembrana via proteína G (Gudermann et al., 1997), eles são capazes de atuar do lado externo da membrana plasmática celular, exercendo efeitos fisiológicos e neuromoduladores no sistema nervoso central. Já foi observado que o nucleosídeo GUO é capaz de exercer efeitos tróficos e mitóticos em células neurais (Rathbone et al., 1999), e de possuir uma ação antiapoptótica em astrócitos (Di Iorio et al., 2004). Alguns estudos já descreveram que tanto o nucleotídeo GTP, via da ERK e a mobilização de  $Ca^{2+}$  intracelular (Guarnieri et al., 2004), como o nucleosídeo GUO, via ativação de heme oxigenase e GMPc (Baú et al., 2005), atuam sinergisticamente com o EGF para estimular o crescimento de neuritos em células da linhagem PC12 (Gysbers & Rathbone, 1996).

Com relação às ações neuromoduladoras dos derivados da guanina, estas estão fortemente relacionadas com o sistema glutamatérgico. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e está presente na maior parte das sinapses (Cotman et al., 1995; Ozawa et al., 1998). Sendo responsável por respostas excitatórias pós-sinápticas, o glutamato desempenha papel fundamental em diversos processos fisiológicos, como aprendizado e memória, e na formação de redes neurais durante o desenvolvimento e o envelhecimento de mamíferos (Collingridge & Lester, 1989; Izquierdo & Medina, 1997; Castellano et al., 2001; Segovia et al., 2001). Entretanto, em algumas situações patológicas, quando ocorre uma excessiva ativação de receptores glutamatérgicos, pode haver dano ou

morte neuronal, situação denominada de excitotoxicidade por Olney e Ho (1970). Vários trabalhos têm associado a excitotoxicidade do glutamato com patologias e desordens neurodegenerativas como a isquemia cerebral, epilepsia, encefalopatia isquêmicas, doenças de Alzheimer e de Huntington (Lipton & Rosenberg, 1994).

Existem dois tipos de receptores glutamatérgicos: os ionotrópicos (iGluR) e os metabotrópicos (mGluR). Os ionotrópicos são canais iônicos, ou seja, permitem a passagem de um íon específico quando ativados. São subdivididos, de acordo com a sensibilidade a agonistas, em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico (AMPA) e ácido cainico (KA). Todos os subtipos de receptores são ativados pelo glutamato, porém cada um deles é ativado seletivamente por um agonista diferente. Os receptores metabotrópicos (mGluR) são receptores que interagem com proteínas G, ativando ou inibindo eventos celulares pela modificação de efetores intracelulares (Ozawa et al., 1998; Bear et al., 2001).

Uma vez sintetizado no citosol, o glutamato é estocado em vesículas sinápticas no terminal pré-sináptico, até ser liberado destas na fenda sináptica por um processo chamado exocitose, que é dependente da concentração de  $Ca^{2+}$ . Após interação com seus receptores pré- e pós-sinápticos, o glutamato é removido da fenda sináptica por sistemas de transporte dependentes de  $Na^{+}$ , localizados na glia, principalmente, sendo este transporte a principal maneira de inibir a ação glutamatérgica (Anderson & Swanson, 2000; Amara & Fontana, 2002).

Alguns estudos demonstraram que os derivados da guanina GTP, GDP e GMP, são capazes de inibir a união de glutamato e alguns de seus agonistas, como KA, L-AP4 e NMDA, a seus receptores em preparações de membrana plasmática (Monahan et al., 1988; Baron et al., 1989; Migani et al., 1997; Ramos et al., 1997; Rubin et al., 1997A). Outros

estudos ainda evidenciam que os nucleotídeos derivados da guanina inibem a união de alguns antagonistas de glutamato, um efeito que não é modulado pelas proteínas G (Monahan et al., 1998; Baron et al., 1989; Barnes et al., 1993). No entanto, os efeitos dos nucleotídeos da guanina sobre os receptores glutamatérgicos não são particularmente potentes, ocorrendo geralmente na faixa de 100  $\mu$ M a 1 mM (Monahan et al., 1988; Baron et al., 1989; Tasca et al., 1995; 1998; Regner et al., 1998; Burgos et al., 1998).

Todavia, os derivados da guanina bloqueiam respostas celulares à ação de glutamato ou de seus agonistas tais como: inibem a quimioluminescência induzida por glutamato (Regner et al., 1998), bloqueiam o influxo de cálcio induzido por NMDA em retina de pintos (Burgos et al., 2000), diminuem a fosforilação de GFAP e o aumento de AMPc induzido por glutamato em preparações em que nucleotídeos da guanina não penetram no espaço intracelular e proteínas G não interagem diretamente com moléculas no espaço externo da membrana (Tasca et al., 1995; Tasca e Souza, 2000).

Os derivados da guanina ainda são capazes de aumentar a captação de glutamato em cultura de astrócitos e em fatias corticais de ratos (Frizzo et al., 2001; 2002; 2003, 2005). Estudos complementares demonstraram que a guanosina parece ser a principal responsável pelos efeitos estimulatórios na captação de glutamato exercido pelos derivados da guanina, uma vez que os nucleotídeos precisam ser hidrolisados para exercer esse efeito, e que não ocorre efeito aditivo quando testados em conjunto com a guanosina (Frizzo et al., 2003). A ação sobre a captação ainda parece ser específica sobre o sistema de captação do glutamato, uma vez que a guanosina não consegue aumentar a captação astrocitária de GABA (Frizzo et al., 2003).

Nosso grupo de pesquisa tem apontado, a partir de vários trabalhos, para um possível papel neuroprotetor dos derivados da guanina. Os nucleotídeos da guanina (GTP,

GDP e GMP) são capazes de proteger culturas de neurônios hipocampais e corticais dos efeitos excitotóxicos do NMDA e KA (Morciano et al., 2003). Ainda o GMP é capaz de proteger fatias hipocampais de ratos submetidas à privação de glicose e a modelos de neurotoxicidade induzidos por glutamato e outros agonistas glutamatergicos (ionotrópicos emetabotrópicos), diminuindo a liberação de lactato desidrogenase nestas fatias (Molz et al., 2005).

Em cultura de astrócitos, a exposição a condições de hipóxia associada a hipoglicemia eleva a concentração extracelular da guanosina em aproximadamente quatro vezes, sendo esta elevação maior e mais prolongada do que a elevação nos níveis de adenosina (Cicarelli et al., 1999). In vivo, a isquemia cerebral produz um aumento dos níveis de guanosina de cerca de 140% por mais de uma semana após a injúria (Uemura et al. 1991). Além disso, um estudo de microdiálise no tálamo de ratos demonstrou que a despolarização in vivo por K<sup>+</sup>, cainato e oubaína elevam a concentração de guanosina e adenosina (Dobolyi et al., 2000). Ao mesmo tempo, a hidrólise dos nucleotídeos purinérgicos no líquido cérebro-espinhal, tem uma V<sub>max</sub> e um K<sub>m</sub> maiores para os derivados da guanina, quando comparamos as velocidades de hidrólise do GDP e ADP, indicando a formação de uma quantidade maior de guanosina e GMP (Portela et al., 2002).

Experimentos in vivo, evidenciaram que o GMP e a guanosina são capazes de prevenir convulsões provocadas pelo ácido quinolínico injetado no ventrículo lateral de cérebro de camundongos (Schmidt et al., 2000; 2005; Lara et al., 2001) e que o GMP é capaz de proteger as células de lesão induzida por ácido quinolínico em estriado de ratos (Malcon et al., 1997). O efeito anticonvulsante da guanosina também foi observado quando a mesma é administrada intraperitonealmente em ratos (Soares et al., 2004), ou por via oral aguda ou cronicamente em ratos e camundongos (Vinade et al., 2003, 2004, 2005).

Este efeito anticonvulsivante da guanosina foi observado tanto em ratos jovens (de Oliveira et al., 2004) como em ratos e camundongos adultos (Schmidt 200, 2001, 2005, Lara et al., 2001, Vinade et al., 2003, 2004, 2005, Soares et al., 2004)

Recentes estudos demonstraram que, como na captação, os efeitos anticonvulsivantes dos nucleotídeos derivados da guanina são exercidos a partir da sua hidrólise, uma vez que compostos pouco hidrolisáveis como o GTP e o GDP rígidos não são capazes de prevenir convulsões, efeito não encontrado se utilizam seus análogos, o GTP e o GDP (Schmidt et al., 2005). Reforçando a demonstração de que a conversão de GMP a GUO parece ter um papel crucial nos efeitos da captação de glutamato na culturas de astrocitos (Frizzo et al., 2003), em um recente trabalho foi demonstrado que essa conversão também se faz necessária para o modelo in vivo de convulsão porque AOPCP, um agente inibidor da enzima ecto-5'-nuicleotidase que é a enzima responsável pela conversão do GMP à GUO, quando administrado previamente ao GMP, diminui o efeito protetor do nucleotídeo.

Recentemente foi descrito um efeito remielinizante da guanosina na medula espinhal de ratos, com a recuperação da função perdida com a desmielinização (Jiang et al., 2003) e uma ação neuroprotetora em reverter a diminuição da captação de glutamato frente a um insulto hipóxico-isquêmico em ratos neonatos (Moretto et al., 2005).

Alguns estudos sugerem que os derivados da guanina afetam a memória e o aprendizado. Uma administração intrahippocampal de GMP é capaz de alterar o desempenho na tarefa de esquiva inibitória através de mecanismos gabaérgicos e glutamatérgicos em ratos (Rubin et al., 1996, 1997B) e também de reverter o efeito facilitatório do glutamato na mesma tarefa (Rubi et al., 1996). Também foi observado que quando administrado sistemicamente e previamente à sessão de treino, a GUO exerce um

efeito amnésico na mesma tarefa da esQUIVA inibitória (Roesler et al., 2000; Vinadé et al., 2003; 2004; 2005). Este efeito amnésico promovido pela GUO parece estar associado com o processo de aquisição da memória e não ter relação com os processos de consolidação e de evocação na tarefa da esQUIVA inibitória (Roesler et al., 2000). É bem estabelecido que a aquisição de novas memórias é iniciada durante a sessão de aprendizado, pela ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, metabotrópicos e AMPA (Izquierdo & Medina, 1997; Malenka & Nicoll, 1999).

Apesar dos efeitos extracelulares já descritos, o exato mecanismo pelo qual os derivados da guanina exercem tais efeitos não está completamente identificado. Recentemente foram descritos sítios de união específicos para guanosina em membranas plasmáticas de cérebro de ratos (Traversa et al., 2002; 2004).

## **II- OBJETIVOS**

Estudar o efeito da administração sistêmica ou central de GMP sobre a memória e o aprendizado de camundongos através da tarefa da esquiwa inibitória.

Determinar se o efeito amnésico observado envolve a conversão do GMP à GUO e determinar se esta conversão ocorre periférica- ou centralmente.

### **III- MATERIAIS E MÉTODOS**

Os materiais e métodos dessa dissertação serão apresentados na forma de artigo científico publicado na revista internacional *Neurobiology of Learning and Memory*, 85: 206-212 (2006).

### **IV- RESULTADOS**

Os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de artigo científico publicado na revista internacional *Neurobiology of Learning and Memory*, 85: 206-212 (2006).





## Amnesic effect of GMP depends on its conversion to guanosine

Jonas Alex Morales Saute<sup>a,\*</sup>, Leonardo Evangelista da Silveira<sup>a</sup>, Félix Antunes Soares<sup>b</sup>,  
Lúcia Helena Martini<sup>a</sup>, Diogo Onofre Souza<sup>a</sup>, Marcelo Ganzella<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Rua Ramiro Barcelos 2600 Anexo CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria,  
Av Roraima, Camobi, 97.900-035, Santa Maria, RS, Brazil

Received 19 September 2005; revised 19 October 2005; accepted 25 October 2005  
Available online 1 December 2005

### Abstract

Extracellular guanine-based purines, namely the nucleotides GTP, GDP, GMP and the nucleoside guanosine, exert important neuroprotective and neuromodulator roles in the central nervous system, which may be related to inhibition of the glutamatergic neurotransmission activity. In this study, we investigated GMP effects on mice inhibitory avoidance performance and the dependence on its conversion to guanosine for such effect, by using the ecto-5'-nucleotidase specific inhibitor AOPCP. We also investigated if this conversion occurs in the central nervous system or peripherally, and if guanosine and GMP affect nociception by the tail-flick test. I.p. GMP or guanosine (7.5 mg/kg) or i.c.v. GMP (480 nmol) pretraining administration was amnesic for the inhibitory avoidance task. I.c.v. AOPCP (1 nmol) administration completely reversed the amnesic effect of i.c.v. GMP, but not of i.p. GMP, indicating that peripheral conversion of GMP to guanosine is probably relevant to this effect. AOPCP alone did not interfere with the performance. Furthermore, tail-flick measurement was unaffected by i.p. GMP and guanosine, suggesting that the amnesic effect of both purines was not due to some antinociceptive effect against the footshock used in the task. All these data together, in accordance to those previously observed in studies involving glutamate uptake and seizures reinforce the idea that guanosine is the specific extracellular guanine-based purines effector and indicate that its conversion occurs not only in the central nervous system but also peripherally.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** GMP; Guanosine; AOPCP; MK-801; Dizocilpine; Purines; Glutamate; Inhibitory avoidance; Memory; Neuromodulator; Tail-flick

### 1. Introduction

Extracellular guanine-based purines (GBPs), namely the nucleotides GTP, GDP, GMP and the nucleoside guanosine (GUO) possess important neuromodulatory roles in the central nervous system (CNS).

In vitro studies demonstrated that GBPs: (i) present trophic and recovery effects on neural cells (Ciccarelli et al., 2001; Jiang et al., 2003) and (ii) are capable to decrease glutamatergic neurotransmission activity, by inhibiting the binding of glutamate and analogs (Paz, Ramos, Ramirez, &

Souza, 1994; Porciúncula, Vinade, Wofchuk, & Souza, 2002; Souza & Ramirez, 1991) and neural cell responses to glutamate and analogs (Burgos, Barat, & Ramirez, 2000; Tasca, Wofchuk, Souza, Ramirez, & Rodnight, 1995) as well as to stimulate glutamate uptake by astrocytes and brain slices (Frizzo et al., 2001; Frizzo et al., 2002; Frizzo, Soares, Dall'Onder, Lara, & Swanson, 2003; Frizzo, Schwalm, Frizzo, Soares, & Souza, 2005), decreasing its extracellular levels at synaptic space.

In vivo studies have shown that GBPs act as anticonvulsants in models of overstimulation of the glutamatergic system induced by quinolinic acid (QA) and by the glutamate releaser  $\alpha$ -dendrotoxin in mice (Lara et al., 2001; Schmidt, Lara, Maraschin, Perla, & Souza, 2000; Schmidt, Ávila, & Souza, 2005; Vinadé et al., 2003) and by QA in rats

\* Corresponding author. Fax: +55 51 3316 5540.  
E-mail address: [jonas.saute@ufrgs.br](mailto:jonas.saute@ufrgs.br) (J.A.M. Saute).

(Vinadé et al., 2005). Additionally, GUO reverted the decrease in brain glutamate uptake observed after *in vivo* ischemia in rats (Moretto et al., 2005) and after QA-induced seizures in young (de Oliveira et al., 2004) and adult (Vinadé et al., 2005) rats.

Both *in vitro* and *in vivo* effects of GBPs on astrocytic glutamate uptake and as anticonvulsants, respectively, seem to be exerted specifically by the nucleoside GUO (Frizzo et al., 2003; Soares et al., 2004). *In vitro*, the inhibition of the hydrolysis of GMP to GUO, through addition of the ecto-5'-nucleotidase specific inhibitor  $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-diphosphate (AOPCP), prevented stimulatory GMP effect on glutamate uptake (Frizzo et al., 2003). Furthermore, a poorly hydrolysable guanine nucleotide (GMP-PNP) had no effect on glutamate uptake, reinforcing the hypothesis that GUO is the final mediator of such effects of guanine nucleotides. *In vivo*, the administration of AOPCP intracerebroventricularly (*i.c.v.*) prevented GMP anticonvulsant effect (Soares et al., 2004), and the poorly hydrolysable analogs of GDP and GTP had no effect (Schmidt et al., 2005), indicating that this effect depends on GMP conversion to GUO.

These data suggest that both the stimulation of glutamate uptake and the anticonvulsant role of GUO are interconnected. This hypothesis is reinforced by the demonstration that the GUO action on glutamate uptake is effective only when glutamate is present in high concentrations (which is the case during seizures), indicating that GUO acts specifically in excitotoxic conditions (Frizzo et al., 2002, 2005).

Searching for the involvement of the adenosinergic receptors in these GUO effects, we showed that nonselective adenosine receptor antagonists, such as caffeine and theophylline, did not affect GUO action on glutamate uptake (Frizzo et al., 2001) and on seizures (Lara et al., 2001), and that adenosine is not able to reproduce the GUO effects on glutamate uptake (Frizzo et al., 2001), indicating that GUO effects are not due to adenine-based purines system (Schmidt et al., 2000).

Several lines of evidence have suggested that GBPs affect memory and learning. Intrahippocampal GMP administration alters the inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats (Rubin et al., 1997, 1997) and also reverses the facilitatory effect of glutamate on the same task (Rubin et al., 1996). GUO systemically administered before the training session is also amnesic on inhibitory avoidance task (Roesler et al., 2000; Vinadé, Izquierdo, Lara, Schmidt, & Souza, 2004; Vinadé et al., 2003; Vinadé et al., 2005). This effect seems not to be related to classic adenosine receptors, since caffeine is not able to reverse GUO effect on this task (Vinadé et al., 2004).

Considering these amnesic effects of GBPs and the specificity of GUO as the neuroprotective agent among GBPs, the aim of this study was to examine GMP effects on mice inhibitory avoidance performance and to determine if its effects are dependent on its conversion to GUO. We also investigated if this conversion occurs centrally or peripher-

ally. Furthermore, we evaluated the effects of GUO and GMP on nociception by the tail-flick test.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male adult Swiss albino mice (35–45 g) were kept on a 12-h light/dark cycle (light on at 7:00 AM) at temperature of  $22 \pm 1$  °C, housed in plastic cages with tap water and commercial food *ad libitum*. All procedures are carried out according to the institutional policies on animal experimental handling, designed to minimize suffering of animals used. All behavioral procedures were conducted between 3:00 and 6:00 PM. Each animal was used only once.

### 2.2. Drugs

Guanosine (GUO), guanosine 5'-monophosphate (GMP),  $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-diphosphate (AOPCP), 5-methyl-10-11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,b*]cyclohepta-5-10-imine maleate (MK-801 or dizocilpine) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Anesthetic sodium thiopental and morphine sulphate (Dimorf) was obtained from Cristália (Itapira, SP, Brazil). Other reagents were purchased from local suppliers.

### 2.3. Surgical procedure

Surgery and *i.c.v.* infusion techniques were adapted from Haley and McCormick (1957). Animals were anesthetized with sodium thiopental (60 mg/kg, 10 ml/kg, *i.p.*). In a stereotaxic apparatus the skin of the skull was removed, and an *i.c.v.* guide cannula for infusion was implanted. Stereotaxic coordinates were 1 mm posterior to bregma, 1 mm right of the midline, and 1 mm above the lateral brain ventricle. The guide cannula was implanted 1.5 mm ventral to the superior surface of the skull and fixed with jeweler's acrylic cement. Experiments were performed 48 h after surgery. *I.c.v.* treatments were performed with a 30-gauge cannula, which was fitted into the guide cannula and connected by a polyethylene tube to a microsyringe. The tip of the infusion cannula protruded 1 mm beyond the guide cannula, aiming the lateral brain ventricle. After experiments, methylene blue (4  $\mu$ l) was injected through the cannula and animals without dye in the lateral brain ventricle were discarded (Schmidt et al., 2005).

### 2.4. Treatments

We performed *i.p.* and/or *i.c.v.* treatments with GMP, GUO, AOPCP, MK-801, and morphine. The doses of GMP and GUO used here were based upon previous studies from our group using the same *in vivo* protocols investigating the anticonvulsant effect of GMP and GUO (Lara et al., 2001; Schmidt et al., 2000, 2005) and the amnesic effect for GUO (Roesler et al., 2000). MK-801 was used as a glutamatergic antagonist with amnesic properties (de Oliveira et al., 2005; Izquierdo & Medina, 1997) and morphine was used as a classic antinociceptive drug (D'Amato, 1998).

#### 2.4.1. Treatment 1

Mice received vehicle (saline 0.9%), GMP (7.5 mg/kg), GUO (7.5 mg/kg) or MK-801 (0.25 mg/kg) *i.p.*, 30 min before the training session of the inhibitory avoidance task.

#### 2.4.2. Treatment 2

Mice received *i.c.v.* infusion of 4  $\mu$ l of vehicle (saline 0.9%) or 0.25 mM AOPCP. After 3 min, an *i.c.v.* infusion of 4  $\mu$ l of the vehicle or GMP 120 mM was performed and after 5 min animals were submitted to the training session.

#### 2.4.3. Treatment 3

Mice received *i.c.v.* infusion of 4  $\mu$ l of vehicle (saline 0.9%) or 0.25 mM AOPCP. After 3 min, an *i.p.* injection of vehicle or GMP (7.5 mg/kg) was performed and 30 min later animals were submitted to the training session.

#### 2.4.4. Treatment 4

Mice received vehicle (saline 0.9%), morphine (5 mg/kg), GMP (7.5 mg/kg) or GUO (7.5 mg/kg) i.p., 30 min before tail-flick test.

#### 2.5. Inhibitory avoidance task

The apparatus was a 50 × 25 × 25 cm acrylic box whose floor consisted of a parallel caliber stainless-steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 100 cm<sup>2</sup> square, 2.0 cm high, acrylic platform was placed in the center of the floor. Animals were placed on the platform and their latencies to step-down on the floor with the four paws were measured automatically. In training sessions, immediately after stepping-down, animals received a 0.3 mA, 2 s footshock. In test sessions, carried out 24 h after training, no footshock was given and the step-down latency (180 s ceiling) was taken as a measure of retention. Data for inhibitory avoidance are shown as median (interquartile ranges) of training and test latencies to step-down on the grid. Comparisons among groups were performed using a Kruskal–Wallis analysis of variance followed by a Mann–Whitney *U* test if necessary. Differences between training and test latencies to step-down within each group were performed using a Wilcoxon test. We consider a difference statistically significant when  $P \leq 0.05$ .

#### 2.6. Tail-flick measurement

Nociception was assessed with a tail-flick apparatus (D'Amour & Smith, 1941). Mice were wrapped in a towel and placed on the apparatus; the light source positioned below the tail was focused on a point 2–3 cm rostral to the tip of the tail. Deflection of the tail activated a photocell and automatically terminated the trial. Light intensity was adjusted so as to obtain a baseline tail-flick latency (TFL) of 3–6 s. TFL represented the period of time from the beginning of the trial to the tail deflection. A cut-off time of 15 s was used to prevent tissue damage. The general procedure was as follows. On day 1, subjects were familiarized with the TFL apparatus. This was done because it has been observed that novelty itself can induce antinociception (Netto, Siegfried, & Izquierdo, 1987). On day 2, animals were submitted to the TFL measurement, first the baseline and after drug treatment the test sessions. Data for tail-flick are shown as median (interquartile ranges) of baseline and test TFL. Comparisons among groups were performed using a Kruskal–Wallis analysis of variance followed by a Mann–Whitney *U* test if necessary. Differences between training and test latencies to tail-flick within each group were performed

using a Wilcoxon test. We consider a difference statistically significant when  $P \leq 0.05$ .

### 3. Results

Pretraining i.p. injection of GMP was amnesic for inhibitory avoidance task measured in a test session 24 h after its administration (Fig. 1). As described previously, GUO and MK-801 also presented an amnesic effect. GMP 7.5 mg/kg ( $U=55$ ,  $P<.001$ ), GUO 7.5 mg/kg ( $U=82$ ,  $P<.05$ ) and MK-801 0.25 mg/kg ( $U=20$ ,  $P<.001$ ) significantly reduced the latency to step-down in the test session, on Mann–Whitney test, when compared to vehicle group.

Fig. 2 shows the effect of pretraining i.c.v. infusion of 480 nmol GMP. GMP was amnesic ( $U=18$ ,  $P<.05$ ) and i.c.v. AOPCP (1 nmol) alone did not interfere with the performance ( $U=46.5$ ,  $P=0.791$ ), as compared to vehicle group. However, pretreatment with AOPCP completely reversed the GMP amnesic effect, when compared to vehicle group ( $U=52$ ,  $P=0.832$ ) or to GMP group alone ( $U=23$ ,  $P=.05$ ).

Fig. 3 shows that the amnesic effect of pretraining GMP 7.5 mg/kg i.p. was not reversed by i.c.v. pretreatment with AOPCP, indicating that conversion of GMP to GUO probably also occurs peripherally. GMP 7.5 mg/kg ( $U=11$ ,  $P<.05$ ), and AOPCP 1 nmol i.c.v./GMP 7.5 mg/kg i.p. treatments ( $U=11$ ,  $P<.05$ ) significantly reduced test latency to step-down when compared to vehicle group.

In all inhibitory avoidance experiments (Figs. 1–3), the comparison of training step-down latencies showed no significant difference among groups, on Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U* tests.

Furthermore, tail-flick measurement was unaffected by i.p. GMP ( $U=25$ ,  $P=0.462$ ) and i.p. GUO ( $U=23$ ,  $P=0.345$ ), while morphine significantly augmented test

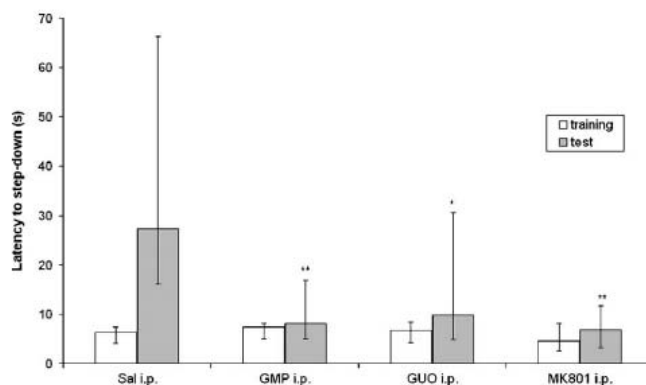


Fig. 1. Effects of i.p. pretraining administration of GMP, GUO, and MK-801 on inhibitory avoidance task. Mice received vehicle (saline 0.9%), GMP, GUO or MK-801 i.p. For procedure details, see Section 2. Data are medians (interquartile ranges) of the step-down latencies on training (white columns) and test sessions (grey columns);  $n=17$ – $19$  animals per group, except for the MK-801 group ( $n=10$ ). Statistical comparison between groups was performed with Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test. (\*\*) indicates a difference at  $P<.001$ , and (\*) indicates a difference at  $P<.05$ , from the saline group (Mann–Whitney test).

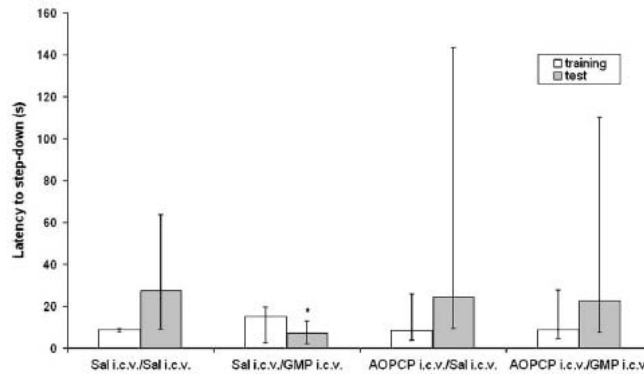


Fig. 2. Amnesic effects of pretraining administration of i.c.v. GMP on inhibitory avoidance task and its reversion by pretreatment with i.c.v. AOPCP. For procedure details, see Section 2. Data are medians (interquartile ranges) of the step-down latencies on training (white columns) and test sessions (grey columns);  $n = 9–11$  animals per group. Statistical comparison between groups was performed with Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test. (\*) Indicates a difference from all other groups at  $P \leq .05$  (Mann–Whitney test).

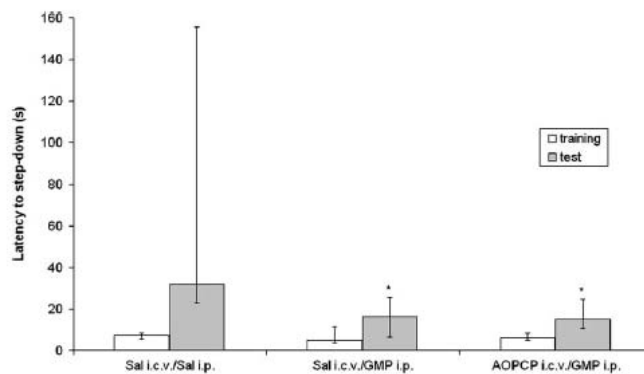


Fig. 3. Amnesic effect of pretraining i.p. GMP administration is not reversed by administration of i.c.v. AOPCP. For procedure details, see Section 2. Data are medians (interquartile ranges) of the step-down latencies on training (white columns) and test sessions (grey columns);  $n = 7–8$  animals per group. Statistical comparison between groups was performed with Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test. (\*) Indicates a difference from saline group at  $P < .05$  (Mann–Whitney test).

latency to tail-flick ( $U = 6$ ,  $P < .05$ ), on Mann–Whitney test, when compared to control group (Fig. 4).

#### 4. Discussion

GBPs exert important roles on the modulation of the glutamatergic system, which is a neurotransmission system involved in plastic events on CNS, as learning and memory processes (Izquierdo & Medina, 1997).

Our group has shown that GUO impairs inhibitory avoidance in rodents (Roesler et al., 2000; Vinadé et al., 2003, 2004, 2005) and that GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance performance (Rubin et al., 1996). However, there was no previous evidence depicting an amnesic effect with GMP treatment. We show here for the first time that GMP, when administered

i.p. and i.c.v. was also amnesic. The observed effect was similar to that demonstrated by the NMDA antagonist MK-801 and GUO on the same task (Fig. 1).

Both the tail-flick test and the footshock sensitivity involve pain-related spinal and peripheral opioid pathways, (Menéndez, Andres-Trelles, Hidalgo, & Baamonde, 1993). Our (Fig. 4) and previous (Roesler et al., 2000) data demonstrated that i.p. GUO (and GMP) did not alter these pathways, thus ruling out their influence on the observed amnesic effects.

The observed amnesic effect for GMP could be due to its own action or, like demonstrated against seizures, dependent on its conversion to GUO (Soares et al., 2004). Our protocols provide strong evidence that the central blockage of GMP conversion to GUO by using AOPCP i.c.v. reverses the amnesic effect observed with i.c.v. GMP. These

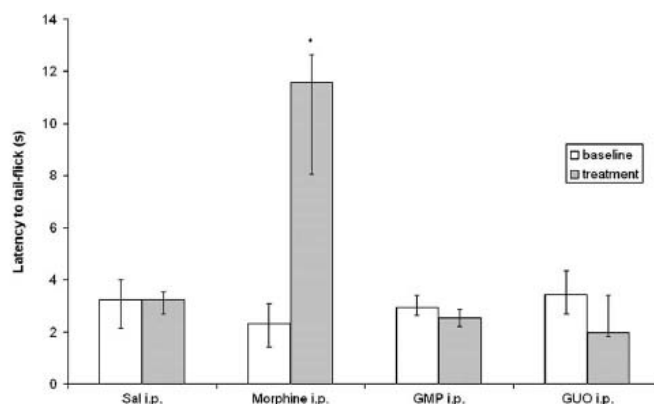


Fig. 4. Effects of GMP, GUO, and morphine on tail-flick measurement. Mice received vehicle (saline 0.9%), morphine, GMP or GUO i.p., 30 min before the tail flick test. For procedure details, see Section 2. Data are medians (interquartile ranges) of the tail-flick latencies on baseline (white columns) and test sessions (grey columns);  $n = 8$  animals per group. Statistical comparison between groups was performed with Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test. (\*) Indicates a difference from all other groups at  $P < .05$  (Mann–Whitney test).

findings could indicate some similarity between the amnesic and neuroprotective GMP effects, which involve the conversion of GMP to GUO by the action of ecto-5'-nucleotidase. It is interesting to note that AOPCP alone did not affect mice step-down latency (Fig. 2) and GLU uptake (Frizzo et al., 2003), indicating that physiological conversion of endogenous GMP to GUO seems not to alter the amnesic or anticonvulsant effects of GMP.

We also demonstrated that, when i.p. GMP injection was preceded by i.c.v. AOPCP in the same dose that reversed GMP i.c.v. effect, the amnesic action persisted. The comparison of our findings with previous observation that i.p. administration of GMP produces a 3-fold increase of cerebrospinal fluid levels of guanosine without affecting GMP levels (Soares et al., 2004) provides consistent data that i.p. GMP is peripherally converted to GUO. Accordingly, the presence of 5'-nucleotidase activity in blood is described (Bruno et al., 2002; Bruno et al., 2003). It should be considered that our data was obtained with a single dose of AOPCP, which did not exclude the possibility that higher doses could block the amnesia induced by i.p. GMP or could even enhance mice performance by its action on endogenous purines. Thus, it would be interesting to demonstrate the effect of higher doses of AOPCP in further experiments.

We considered amnesic effect the reduction of test session step-down latency induced by drugs, as compared to saline. Nevertheless, our methodological approach did not permit us to distinguish the steps of the behavior (acquisition, consolidation, evocation) that were specifically affected by the purines. However, we could suggest that their effects were on acquisition, based upon a previous study of our group (Roesler et al., 2000), which indicated that GUO does not affect the consolidation nor the evocation of inhibitory avoidance task and upon the present evi-

dence that the amnesia induced by GMP was dependent on its conversion to GUO.

Besides the physiological roles of glutamate, overstimulation of the glutamatergic system is involved in various brain disorders such as epilepsy, stroke, and neurodegenerative disorders (Bleich, Romer, Wiltfang, & Kornhuber, 2003; Hynd, Scott, & Dodd, 2004; Lea & Faden, 2003; Lipton & Rosemberg, 1994; Maragakis & Rothstein, 2004; Meldrum, 1994). Consequently, inhibition of glutamatergic activity is a useful strategy to overcome these disorders.

GBPs show various neuroprotective actions over the glutamatergic system, such as preventing ischemic injury *in vitro* and *in vivo*, and acting as anticonvulsant *in vivo* (Lara et al., 2001; Moretto et al., 2005; Schmidt et al., 2000, 2005; Soares et al., 2004; Souza, Frizzo, & Lara, 2000; Vinadé et al., 2003, 2005). Anticonvulsive effect of GMP is also dependent on its conversion to GUO, suggesting that GUO is responsible for GBPs effects against seizures (Soares et al., 2004). GUO has no effect on glutamate uptake when it is in low levels (Frizzo et al., 2002), indicating that GUO acts only when extracellular glutamate are in high levels. Our group also has suggested that guanosine may be useful for treating diseases associated with glutamatergic excitotoxicity (e.g. stroke, ischemia, and neurodegenerative disorders) (Frizzo et al., 2002; Moretto et al., 2005; Vinadé et al., 2003).

Based upon the recent identification of a high affinity binding site for GUO in rat brain membranes (Traversa et al., 2002) and the evidence that GUO is a poor displacer of glutamate ligands (Souza & Ramirez, 1991), the neuroprotective and anticonvulsant effects of GBPs seem to involve the stimulatory action of GUO on glutamate uptake, rather than a direct antagonism of glutamatergic receptors (Frizzo et al., 2001, 2003, 2005).

In conclusion, this study shows an amnesic effect of i.c.v. and i.p. GMP treatment. As previously demonstrated against seizures (Soares et al., 2004), GMP presented similar actions to the nucleoside GUO. GBPs actions depend on converting nucleotides to GUO and probably occur by modulating glutamate uptake (de Oliveira et al., 2004; Frizzo et al., 2001, 2002, 2003, 2005; Vinadé et al., 2005). All finds observed here for GBPs (concerning memory) and previously (concerning glutamate uptake and anticonvulsant effects) (Frizzo et al., 2003; Soares et al., 2004) seem to be related to their ability to generate GUO through the action of ecto-5'-nucleotidase, and indicate that its conversion occurs not only in the CNS but also peripherally. These results could contribute to the evidence that administration of GMP may also be an effective strategy to increase GUO levels in future studies of possible therapeutic actions of GUO.

#### Acknowledgments

This research was supported by the Brazilian funding agencies FAPERGS, CAPES, CNPq, and PRONEX (#41960904).

#### References

- Bleich, S., Romer, K., Wiltfang, J., & Kornhuber, J. (2003). Glutamate and the glutamate receptor system: A target for drug action. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *18*, 33–40.
- Bruno, A. N., Oses, J. P., Bonan, C. D., Walz, R., Battastini, A. M., & Sarkis, J. J. (2002). Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylene-tetrazol. *Neuroscience Research*, *43*, 283–288.
- Bruno, A. N., Oses, J. P., Amaral, O., Coitinho, A., Bonan, C. D., Battastini, A. M., et al. (2003). Changes in nucleotide hydrolysis in rat blood serum induced by pentylene-tetrazol-kindling. *Molecular Brain Research*, *10*, 140–145.
- Burgos, J. S., Barat, A., & Ramirez, G. (2000). Guanine nucleotides block agonist-driven  $45\text{Ca}^{2+}$  influx in chick embryo retinal explants. *NeuroReport*, *11*, 2303–2305.
- Ciccarelli, R., Ballerini, P., Sabatino, G., Rathbone, M. P., D'Onofrio, M., Caciagli, F., et al. (2001). Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *19*, 395–414.
- D'Amato, F. R. (1998). Kin interaction enhances morphine analgesia in male mice. *Behavioural Pharmacology*, *9*, 369–373.
- D'Amour, F. E., & Smith, D. L. (1941). A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *72*, 74–79.
- de Oliveira, D. L., Horn, J. F., Rodrigues, J. M., Frizzo, M. E., Moriguchi, E., Souza, D. O., et al. (2004). Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: Reversal by orally administered guanosine. *Brain Research*, *1018*, 48–54.
- de Oliveira, R. V., Dall'Igna, O. P., Tort, A. B., Schuh, J. F., Neto, P. F., Santos Gomes, M. W., et al. (2005). Effect of subchronic caffeine treatment on MK-801-induced changes in locomotion, cognition and ataxia in mice. *Behavioural Pharmacology*, *16*, 79–84.
- Frizzo, M. E. S., Lara, D. R., Dahm, K. C. S., Prokopiuk, A. S., Swanson, R. A., & Souza, D. O. (2001). Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *NeuroReport*, *12*, 879–881.
- Frizzo, M. E. S., Lara, D. R., Prokopiuk, A. S., Vargas, C. R., Salbego, C. G., & Wajner, M. (2002). Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *22*, 353–363.
- Frizzo, M. E. S., Soares, F. A. A., Dall'Onder, L. P., Lara, D. R., Swanson, R. A., et al. (2003). Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Research*, *972*, 84–89.
- Frizzo, M. E., Schwalm, F. D., Frizzo, J. K., Soares, F. A., & Souza, D. O. (2005). Guanosine enhances glutamate transport capacity in brain cortical slices. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *25*, 913–921.
- Haley, T. J., & McCormick, W. G. (1957). Pharmacologic effects of intracerebral injection of drugs in conscious mouse. *British Journal of Pharmacology*, *12*, 12–15.
- Hynd, M. R., Scott, H. L., & Dodd, P. R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, *45*, 583–595.
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, *68*, 285–316.
- Jiang, S., Khan, M. I., Lu, Y., Wang, J., Buttigieg, J., Werstik, E. S., et al. (2003). Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. *NeuroReport*, *14*, 2463–2467.
- Lara, D. R., Schmidt, A. P., Frizzo, M. E. S., Burgos, J. S., Ramirez, G., & Souza, D. O. (2001). Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Research*, *912*, 176–180.
- Lea, P. M., 4th, & Faden, A. I. (2003). Modulation of metabotropic glutamate receptors as potential treatment for acute and chronic neurodegenerative disorders. *Drug News and Perspectives*, *16*, 513–522.
- Lipton, S. A., & Rosemberg, P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*, *330*, 613–622.
- Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2004). Glutamate transporters: Animal models to neurologic disease. *Neurobiology of Disease*, *15*, 461–473.
- Meldrum, B. S. (1994). The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology*, *44*, 14–23.
- Menéndez, L., Andres-Trelles, F., Hidalgo, A., & Baamonde, A. (1993). Involvement of spinal kappa opioid receptors in a type of footshock induced analgesia in mice. *Brain Research*, *611*, 264–271.
- Moretto, M. B., Arteni, N. S., Lavinsky, D., Netto, C. A., Rocha, J. B., Souza, D. O., et al. (2005). Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: Prevention by guanosine. *Experimental Neurology*, *195*, 400–406.
- Netto, C. A., Siegfried, B., & Izquierdo, I. (1987). Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: Effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behavioral and Neural Biology*, *48*, 304–309.
- Paz, M. M., Ramos, M., Ramirez, G., & Souza, D. (1994). Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum. *FEBS Letters*, *355*, 205–208.
- Porciúncula, L. O., Vinade, L., Wofchuk, S., & Souza, D. O. (2002). Guanine based purines inhibit  $[^3\text{H}]$ glutamate and  $[^3\text{H}]$ AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats. *Brain Research*, *928*, 106–112.
- Roesler, R., Vianna, M. R. M., Lara, D. R., Izquierdo, I., Schmidt, A. P., & Souza, D. O. (2000). Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. *NeuroReport*, *11*, 2537–2540.
- Rubin, M. A., Jurach, A., da Costa, E. M., Jr., Lima, T. T. F., Jiménez-Bernal, R. E., Begnini, J., et al. (1996). GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task in rats. *NeuroReport*, *7*, 2078–2080.
- Rubin, M. A., Jurach, A., Zanolla, G. R., Boemo, R. L., Souza, D. O., & de Mello, C. F. (1997). Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *NeuroReport*, *8*, 3713–3716.
- Rubin, M. A., Medeiros, A. C., Rocha, P. C., Livi, C. B., Ramirez, G., & Souza, D. O. (1997). Effect of guanine nucleotides on  $[^3\text{H}]$ glutamate

- binding and on adenylate cyclase activity in rat brain membranes. *Neurochemical Research*, 22, 181–187.
- Schmidt, A. P., Lara, D. R., Maraschin, J. F., Perla, A. S., & Souza, D. O. (2000). Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Research*, 864, 40–43.
- Schmidt, A. P., Ávila, T. T., & Souza, D. O. (2005). Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizure induced by quinolinic acid in mice. *Neurochemical Research*, 30, 69–73.
- Soares, F. A., Schmidt, A. P., Farina, M., Frizzo, M. E., Tavares, R. G., Portela, L. V., et al. (2004). Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Research*, 1005, 182–186.
- Souza, D. O., & Ramirez, G. (1991). Effects of guanine nucleotides on KA binding and on adenylate cyclase activity in optic tectum and cerebellum of chicken. *Journal of Molecular Neuroscience*, 3, 39–46.
- Souza, D. O., Frizzo, M. E. S., & Lara, D. R. (2000). Glutamate uptake enhanced by guanosine in vitro: Possible neuroprotective mechanism against hypoxia/hypoglycemia injury. *Drug Development Research*, 50, 115.
- Tasca, C. I., Wofchuk, S. T., Souza, D. O., Ramirez, G., & Rodnight, R. (1995). Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. *NeuroReport*, 6, 249–252.
- Traversa, U., Bombi, G., Di Iorio, P., Ciccarelli, R., Werstiuk, E. S., & Rathbone, M. P. (2002). Specific [<sup>3</sup>H]guanosine binding sites in rat brain membranes. *British Journal of Pharmacology*, 135, 969–976.
- Vinadé, E. R., Izquierdo, I., Lara, D. R., Schmidt, A. P., & Souza, D. O. (2004). Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81, 137–143.
- Vinadé, E. R., Schmidt, A. P., Frizzo, M. E. S., Izquierdo, I., Elisabet-sky, E., & Souza, D. O. (2003). Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Research*, 977, 97–102.
- Vinadé, E. R., Schmidt, A. P., Frizzo, M. E. S., Portela, L. V., Soares, F. A., & Schwalm, F. D. (2005). Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. *Journal of Neuroscience Research*, 79, 248–253.

## V- DISCUSSÃO

Tanto uma administração sistêmica (intraperitoneal - i.p.) como uma administração central (intracerebroventricular - i.c.v.) de GMP exerceram efeito amnésico na tarefa da esQUIVA inibitória em camundongos. Este efeito é similar ao efeito amnésico exercido pela administração i.p. de GUO ou por uma administração i.p. do antagonista glutamatérgico MK-801.

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, pudemos constatar que quando administrado intrahippocampal, o GMP além de exercer efeito amnésico, é capaz de reverter o efeito facilitatório do glutamato na mesma tarefa da esQUIVA inibitória (Rubin et al., 1996; 1997; 1997B). Sobre o efeito amnésico da guanosina, este já foi verificado em diferentes trabalhos, os quais mostraram que por diferentes vias de administração (oral aguda, oral crônica, intracerebroventricular e intraperitoneal) ela é capaz de exercer o efeito amnésico tanto em ratos como em camundongos. (Roesler et al., 2000; Vinadé et al., 2003, 2004, 2005). Com um desenho experimental um pouco mais complexo do que o realizado neste trabalho, em que foi administrado GUO previamente (aquisição) ou rapidamente posterior ao treino (consolidação), ou ainda, anterior ao teste (evocação), foi observado que a GUO foi capaz de exercer o efeito amnésico apenas na aquisição da memória (Roesler et al., 2000), na qual o GMP parece também afetar.

O efeito amnésico exercido pelo GMP parece envolver a ação da enzima ecto-5'-nucleotidase, isso porque quando AOPCP, um inibidor dessa enzima, é administrado via i.c.v. previamente à administração i.c.v. de GMP, o efeito amnésico não foi observado. Esses resultados podem indicar uma similaridade entre os efeitos: amnésico, neuroprotetor e modulador da captação de glutamato exercidos pelo GMP, os quais



parecem envolver a conversão do nucleotídeo a GUO (Soares et al., 2004; Frizzo et al., 2003).

Interessantemente, a administração i.c.v. de AOPCP é incapaz de reverter o efeito amnésico exercido pelo GMP quando administrado sistemicamente (i.p.). Em um estudo anterior, já foi observado que uma administração i.p. de GMP triplica a concentração de guanosina no fluido cerebrospinal, sem alterar a concentração do próprio GMP (Soares et al., 2004). Estes dados são corroborados com a constatação da presença de atividade da ecto-5'-nucleotidase no sangue de ratos (Bruno et al., 2002; Bruno et al., 2003), possibilitando assim uma conversão sistêmica do GMP a GUO.

Uma administração i.c.v. de AOPCP, na dose de 0,25 mM, não foi capaz de afetar o desempenho na tarefa da esQUIVA inibitória. O AOPCP também não foi capaz de exercer, por si só, efeito sobre a convulsão com ácido quinolínico em ratos (Soares et al., 2004) ou sobre a captação de glutamato em fatias corticais (Frizzo et al., 2003), processos pelos quais a conversão de GMP a GUO se faz necessária. Esses dados nos permitem sugerir que a conversão endógena do GMP a GUO não altera os efeitos observados pela administração de GMP (amnésico, anticonvulsivante e modulador da captação de glutamato). Porém, um estudo mais detalhado se faz necessário para investigar a participação da conversão endógena de GMP à GUO, nos processos em que essa conversão está envolvida.

Por sua vez, o GMP foi incapaz de exercer efeito no teste do tail-flick, teste utilizado para investigar a influência do GMP sobre a nocicepção. Tanto o teste do tail-flick, como o teste da sensibilidade a choques nas patas realizado em um trabalho anterior pelo nosso grupo (Roesler et al., 2000), envolvem o sistema opióide periférico e espinhal relacionados à dor (Menéndez et al., 1993), o qual parece não ser alterado pela ação dos derivados da guanina (Roesler et al., 2000).

Diante dos resultados, a administração de GMP parece ser uma efetiva estratégia para aumentar os níveis de GUO em futuros estudos sobre as possíveis ações terapêuticas da GUO. Em razão dessa afirmação, durante a realização desta dissertação, um tratamento oral crônico com GMP, durante 25 dias, em uma concentração relativamente alta (1,5 mg/ml) quando comparada a tratamentos orais com GUO (0,5 mg/ml), foi realizado, com o intuito de estudar possíveis alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos.

Devido a problemas técnicos, não conseguimos finalizar até o momento alguns dos experimentos cruciais para a discussão dos resultados obtidos. Desta forma, temos como perspectiva a finalização dos experimentos envolvendo a quantificação dos derivados da guanina no fluido cerebrospinal dos animais cronicamente tratados com GMP “ad libitum” em solução aquosa, e a publicação dos resultados até então obtidos com os mesmos animais. Dentre os resultados obtidos, verificamos que o tratamento referido com GMP exerceu uma ação anticonvulsivante frente ao modelo de convulsão induzida por ácido quinolínico e alterou a captação basal de glutamato em fatias corticais.

## VI – CONCLUSÕES

Tanto uma administração periférica quanto central de GMP é capaz de promover efeito amnésico em camundongos.

O efeito amnésico promovido pelo GMP está associado com a sua capacidade de conversão à guanosina, sugerindo que esta seria a real promotora do efeito comportamental relatado.

A conversão do GMP à guanosina além de central-, ocorre também periféricamente.

## VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amara, S. & Fonatana, A. (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry International*. 41:313-318.
2. Anderson & Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions. *Glia*. 32:1-14.
3. Barnes, J. M., Murphy, P. A., Kiekaahm, D., Helney, J. M. (1993). Interaction of guanine nucleotides with [3H] kainite and 6-[3H] cyano-7-nitroquinoxaline-2-3-dione binding in goldfish brain. *J. Neurochem*. 61: 1685-1691.
4. Baron, B. M., Dudley, M. W., McCarthy, D.R. Miller, F. P., Reynolds, I. J., Schmidt, C. J. (1989). Guanine nucleotides are competitive inhibitors of N-methyl-D-aspartate at its receptor site both in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 250: 162-169.
5. Bau, C., Middlemiss, P. J., Hindley, S., Jiang, S., Ciccarelli, R., Caciagli, F. Di Iorio, P., Werstiuk, E. S., Rathbone, M. P. (2005). Guanosine stimulate neurite outgrowth in PC 12 cells via activation of heme oxygenase and cyclic GMP. *Purinergic Signaling* 1: 161-172.
6. Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (2001). *Neuroscience Exploring the Brain*. 2ed., USA: Lippincott Williams & Wilkins, cap. 6, 130-162.

7. Bruno, A. N., Oses, J. P., Bonan, C. D., Walz, R., Battastini, A. M., Sarkis, J. J. (2002). Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylenetetrazol. *Neuroscience Research*. 43: 283–288.
8. Bruno, A. N., Oses, J. P., Amaral, O., Coitinho, A., Bonan, C. D., Battastini, A. M., et al. (2003). Changes in nucleotide hydrolysis in rat blood serum induced by pentylenetetrazol-kindling. *Molecular Brain Research*. 10: 140–145.
9. Burgos, J. S., Barat, A., Souza, D. O., Ramires, G. (1998). Guanine nucleotides protect against toxicity in an ex vivo chick retinal preparation. *FEBS Lett*. 430: 176-180.
10. Burgos, J. S., Barat, A., Ramirez, G. (2000). Guanine nucleotides block agonist-driven  $45\text{Ca}^{2+}$  influx in chick embryo retinal explants. *Neuroreport* 11: 2303-2305.
11. Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A. (2001). NMDA receptors and learning and memory process. *Current Drug Targets*. 2: 273-278.
12. Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Giuliani, P., D'Alimonte, I., Ballerini, P., Caciagli, F., Rathbone, M. P. (1999). Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia* 25: 93-98.

13. Collingridge, G. L., & Lester, R. A. J.. (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacological Reviews*. 40: 143-210.
14. Cotman, C. W., Kahle, J. S., Miller, S. E., Ulas, J., Bridges, R. J. (1995). Excitatory aminoacid neurotransmission. *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*, Cap. 7, pp. 75-85. Eds Bloom & Kupfer, Raven Press, New York.
15. de Oliveira, D. L., Horn, J. F., Rodrigues, J. M., Frizzo, M. E., Moriguchi, E., Souza, D. O., Wofchuk, S. (2004). Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administrad guanosine. *Brain Res*. 1018: 48-54.
16. Di Iorio, P., Ballerini, P., Traversa, U., Nicoletti, F., D'Alimonte, I., Kleyweg, S., Werstiuk, E. S., Rathbone, M. P., Caciagli, F., Ciccarelli, R. (2004). The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI-3kinase/Aft/PK-B pathway in cultured rat astrocytes. *Glia* 46: 356-368.
17. Dobolyi, A., Reichart, A., Szikra, T., Nyitrai, G., Kékesi, K. A., Juhász, G. (2000). Sustained depolarization induces changes in the intracellular concentrations of purines and pyrimidine nucleotides in the rat thalamus. *Neurochem. Int*. 37: 71-79.

18. Frizzo, M. E. S., Lara, D. R., Dahm, K. C. S., Prokopiuk, A. S., Swanson, R. A., Souza, D. O. (2001). Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neureport* 12: 1-3.
19. Frizzo, M. E. S., Lara, D. R., Prokopiuk, A. S., Vargas, C. R., Salbego, S. G., Wajner, M., souza, D. O. (2002). Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22: 353-63.
20. Frizzo, M. E., Antunes Soares, F. A., Dall'Onder, L. P. Lara, D. R., Swanson, R. A., souza, D. O. (2003). Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Res.* 972: 84-89.
21. Guarnieri, S., Fano, G., Rathbone, M. P., Mariggio, M. A. (2004). Cooperation in signal transduction of extracellular guanosine 5' triphosphate and nerve growth factor in neuronal differentiation of PC 12 cells. *Neuroscience* 128: 697-712.
22. Gudermann, T., Schonenberg, T., Schultz, G. (1997). Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 399-427.

23. Gysbers J. W. & Rathbone, M. P. (1996). GTP and guanosine synergistically enhance NGF-induced neurite outgrowth from PC 12 cells. *Int J. Dev. Neurosci.* 14: 19-34.
24. Izquierdo, I. & Medina, J. H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory.* 10: 99-104.
25. Jiang, S., Khan, M. I., Lu, Y., Wang, J., Buttgieg, J., Werstiuk, E. S., Ciccarelli, R., Caciagli, F., Rathbone, M. P. (2003). Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. *Neuroreport.* 14: 2463-2467.
26. Lara, D. R., Schmidt, A. P., Frizzo, M. E., Burgos, J. S., Ramirez, G., Souza, D. O. (2001). Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.* 912: 176-180.
27. Lipton, S. A. & Rosemberg, P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine.* 330:613-622.
28. Malcon, C., Achaval, M., Komlos, F., Partata, W., Sauregg, M., Ramirez, G., Souza, D. O. (1997). GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH-diaphorase-positive cells in the rat striatum. *Neurosci. Lett.* 225: 145-148.



29. Menéndez, L., Andres-Trelles, F., Hidalgo, A., Baamonde, A. (1993). Involvement of spinal kappa opioid receptors in a type of footshock induced analgesia in mice. *Brain Research*. 611: 264–271.
30. Migani, P., Fiorini, R., Ferreti, E., Manini, E., Chimichi, S., Moneti, G. (1997). Role of guanine nucleotides as endogenous ligands of a kainic acid binding site population in the mammalian cerebellum. *J. Neurochem*. 68: 1648-54.
31. Molz, S., Decker, H. Oliveira, I. S., Souza, D. O., Tasca, C. I. (2005). Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem Res*. 30: 83-89.
32. Monahan, B., Hood, W. F., Michel, J., Compton, R.P. (1988). Effects of guanine nucleotides on N-methyl-D-aspartate receptor-ligand interactions. *Mol. Pharmacol*. 34: 111-116.
33. Morciano, M., Ortinau, S., Zimmermann, H. (2004). Guanine nucleotides inhibit NMDA and kainate-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal and neocortical neurons. *Neurochem Int*. 45: 95-101.
34. Moretto, M. B., Arteni, N. S., Lavinsky, D., Netto, C. A., Rocha, J. B., Souza, D. O., Wofchuk, S. (2005). Hypoxic–ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: Prevention by guanosine. *Experimental Neurology* 195: 400–406.

35. Olney, J. W. & Ho, O. L. (1970). Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature*. 227:609-611.
36. Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*. 54:581-618.
37. Portela, L. V. C., Oses, J. P., Silveira, A. L., Schmidt, A. P., Lara, D. R., Battastini, A. M., Ramirez, G., Vinade, L., Sarkis, J. J., Souza, D. O. (2002). Guanine and adenine nucleotidase activities in rat cerebrospinal fluid. *Brain Res*. 950: 74-78.
38. Ramos, M., Souza, D. O., Ramirez, G. (1997). Specific binding of [3H]GppNHp to extracellular receptors in chick cerebellum possible involvement of kainic acid receptors. *FEBS Lett*. 406: 114-118.
39. Rathbone, M. P., Middlemiss, P. J., Gysbers, J. W., Andrew, C., Herman, M. A. R., Reed, J. K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F. (1999). Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol*. 59: 663-690.
40. Regner, A., Ramirez, G., Bell'o-Klein, A., Souza, D. O. (1998). Effects of guanine nucleotides on glutamate-induced chemiluminescence of hippocampal slices submitted to hypoxia. *Neurochem. Res*. 23: 519-524.

41. Roesler, R., Vianna, M. R. M., Lara, D. R., Izquierdo, I., Schmidt, A. P., Souza, D. O. (2000). Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. *NeuroReport*, 11, 2537–2540.
42. Rubin, M. A., Jurach, A., da Costa, E. M., Jr., Lima, T. T. F., Jiménez-Bernal, R. E., Begnini, J. (1996). GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task in rats. *NeuroReport*, 7, 2078–2080.
43. Rubin, M. A., Jurach, A., Zanolla, G. R., Boemo, R. L., Souza, D. O., de Mello, C. F. (1997). Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *NeuroReport*. 8: 3713–3716.
44. Rubin, M. A., Medeiros, A. C., Rocha, P. C., Livi, C. B., Ramirez, G., Souza, D. O. (1997). Effect of guanine nucleotides on [3H]glutamate binding and on adenylate cyclase activity in rat brain membranes. *Neurochemical Research*. 22: 181–187.
45. Schmidt, A. P., Lara, D. R., Maraschin, J. F., Perla, A. S., Souza, D. O. (2000). Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res*. 864: 40-43.
46. Schmidt, A. P., Avila, T. T., Souza, D. O. (2005). Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. *Neurochem Res*. 30: 69-73.

47. Segovia, G., Porras, A., del Arco, A., Mora, F. (2001). Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mechanisms Ageing Development*. 122(1):1-29.
48. Soares, F. A., Schmidt, A. P., Farina, M., Frizzo, M. E. S., Tavares, R. G., Portela, L. V. C., Lara, D. R., Souza, D. O. (2004) *Brain Researc*. 1005: 182-186.
49. Tasca, C. I., Wofchuk, S. T., Souza, D. O., Ramires, G., Rodnight, R. (1995). Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. *NMeuroreport* 6: 249-252.
50. Tasca, C. I. & Souza, D. O. (2000). Interaction of adenosine and guanine derivatives in the rat hippocampus: effects on cyclic AMP levels and on the binding of adenosine analogs and GMP. *Neurochem. Res.* 25: 181-188.
51. Traversa, U., Bombi, G., Di Iorio, P., Ciccarelli, R., Werstiuk, E. S., Rathbone, M. P. (2002). Specific [3H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *British Journal of Pharmacology*. 135: 969-976.
52. Uemura, Y., Miller, J. M., Matson, W. R., Beal, M. F. (1991). Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke* 22: 1548-1553.

53. Vinade, E. R., Schmidt, A. P., Frizzo, M. E. S., Izquierdo, I., Elisabetsky, E., Souza, D. O. (2003). Chronically administered guanosine is anticonvulsivant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Res.* 977: 97-102.
54. Vinade, E. R., Izquierdo, I., Lara, D. R., Schmidt, A. P., Souza, D. O. (2004). Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. *Neurobiol Learn Mem.* 81: 137-143.
55. Vinade, E. R., Schmidt, A. P., Frizzo, M. E. S., Portela, L. V., Soares, F. A., Schwalm, F. D., Elisabetsky, E., Izquierdo, I., Souza, D. O. (2005). Effects of chronic administered guanosine on behavioral árameters and brain glutamate uptake in rats. *J Neurosci. Res.* 79: 248-253.
56. Zimmermann, H. B. (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Progress Neurobiol.* 49: 589-618.