

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA GUANOSINA EM MODELO
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON
INDUZIDO POR 6-OHDA.**

Porto Alegre, 2009

Júlia Hennig Pimentel

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA GUANOSINA EM MODELO
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON
INDUZIDO POR 6-OHDA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional, pelo curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Tadeu Mello e Souza

PORTO ALEGRE, 2009

Dedico este trabalho ao meu namorado, Rodrigo Buttes, e aos meus pais, Rosemarie e Manoel Pimentel, pelo apoio e compreensão nas horas utilizadas com estudos e para realização deste trabalho de conclusão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer:

ao meu orientador, Tadeu Mello e Souza, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa;

a todos do ex-laboratório 35 e do atual laboratório 22 do departamento de bioquímica da UFRGS pela ajuda, ensinamentos, companhia e momentos de descontração;

às minhas “chefinhas” Roberta Silvestrin e Cristiane Batassini, que me ajudaram mais diretamente em todos os momentos da minha iniciação científica;

ao CNPq pela bolsa de iniciação científica;

a todos os professores do curso de ciências biológicas da UFRGS, que são os responsáveis por tornar este um curso de referência.

Resumo

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença multifatorial. Seu tratamento é apenas sintomático, o que salienta a importância do estudo de novas terapias. Há evidências de que a excitotoxicidade atribuída ao aumento da atividade glutamatérgica nos núcleos da base seja uma das causas da DP. A guanosina extracelular tem efeitos sobre parâmetros glutamatérgicos e é neuroprotetora: quando administrada oralmente, ela protege ratos contra convulsões induzidas por ácido quinolínico, bem como protege fatias de hipocampo submetidas à combinação de hipóxia e hipoglicemia. O objetivo do trabalho foi investigar os efeitos do consumo crônico oral de guanosina no modelo animal da DP induzido por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Ratos Wistar machos (250-350g, 100-115 dias de idade) receberam solução de guanosina 0,5mg/ml (n=20) ou água destilada (n=16) para beber durante 4 semanas. Após as duas primeiras semanas de tratamento, receberam infusão de 6-OHDA (5,5 µl, 3 µg/µl) no feixe prosencefálico medial direito. Depois de 2 semanas do término do tratamento, os animais foram submetidos ao Teste de Motricidade sobre Grade (TMG), com duração de 3 minutos e, após uma semana, foram desafiados com metilfenidato (MF) 20 mg/kg, durante 30 minutos, para verificarmos o grau de lesão dos animais. Imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) em células nigrais também foi realizada. Treze de 16 animais do grupo controle apresentaram comportamento rotacional ipsilateral espontâneo no TMG, o que diferiu do grupo tratado, onde apenas nove animais, dentre os vinte utilizados, apresentaram o mesmo comportamento (Teste Exato de Fisher, $p=0,041$). Entretanto, não verificamos uma diminuição do número das rotações induzidas por MF 20 mg/kg em animais tratados com guanosina, quando comparado com o grupo controle (Teste t para amostras independentes, $P = 0,716$). Houve tendência a uma menor perda de neurônios positivos para TH na parte compacta da substância negra no grupo tratado com guanosina (teste t para amostras independentes, $p=0,064$; grupo controle, $n=8$, $90\% \pm 5$, média \pm E.P.; grupo tratado, $n=5$, $70\% \pm 11$). Podemos concluir, a partir desses resultados, que a guanosina reverte a expressão comportamental no TMG típica de animais lesionados com 6-OHDA e, talvez, diminua a morte de células nigrais positivas para TH.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Excitotoxicidade; Purinas; Guanosina.

SUMÁRIO

1. Introdução

1.1 Doença de Parkinson

1.1.1 Excitotoxicidade

1.2 Sistema purinérgico

1.2.1 Guanosina e outros derivados de guanina

2. Objetivos

3. Material e Métodos

3.1 Infusão de 6-OHDA e tratamento com guanosina

3.2 Teste Comportamental

3.3 Imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase

3.4 Análise estatística

4. Resultados

5. Discussão

1. Introdução

1.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNpc). Ela foi primeiramente descrita em 1817 e afeta 0,5% das pessoas com mais de 50 anos (Stoof et al., 1999). A maioria dos pacientes com a DP possui corpos de Lewy no sistema nervoso, que são inclusões eosinofílicas formadas por agregados protéicos intracitoplasmáticos, principalmente de alfa-sinucleína. Porém, não se sabe se essas estruturas estão relacionadas com a causa ou consequência da DP.

Os pacientes com DP apresentam sintomas principalmente motores, mas também não motores. Dentre os sintomas motores destacam-se: dificuldade em iniciar os movimentos (acinesia), lentidão dos movimentos (bradicinesia), tremor em repouso, principalmente das mãos e da mandíbula, alteração da escrita e da fala e rigidez do tônus muscular. Os sintomas não motores, como distúrbios do sono, depressão e déficits cognitivos, são consequências da morte de neurônios em outras regiões do encéfalo (Braak et al., 2003). Os sintomas aparecem a partir de 50% da perda dos neurônios dopaminérgicos da SNpc e redução de 80% nos níveis dopaminérgicos estriatais (Deumens et al., 2002).

São conhecidas duas formas da doença: a esporádica e a familiar. A DP esporádica afeta 95% dos pacientes, atingindo pessoas com mais de 50 anos. É um distúrbio multifatorial, cujas causas ainda não são conhecidas, entretanto sabe-se que fatores genéticos e possíveis mecanismos como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, excitotoxicidade glutamatérgica, proteínas mal-enoveladas e neuroinflamação estão envolvidos na degeneração dos neurônios dopaminérgicos (Esposito et al., 2007; Yuan et al., 2007). Estudos com fluído cerebrospinal de indivíduos com DP sugerem que anormalidades nas purinas também podem estar presentes nessa doença (LeWitt et al., 1992). A forma familiar afeta 5% dos pacientes e está relacionada com mutações em genes como o da alfa-sinucleína (PARK1), parkina (PARK2), DJ-1 (PARK7), PINK1 (PARK6) e LRRK2 (PARK8). A

relação entre os genes das duas formas da DP é incerta, entretanto as patofisiologias compartilhadas sugerem o envolvimento de mecanismos patogênicos comuns (Hardy et al., 2003).

A substância negra, através da via nigroestriatal, libera dopamina no corpo estriado, sendo um dos moduladores da atividade dos núcleos da base. A expressão “núcleos da base” refere-se a vários núcleos subcorticais, incluindo o corpo estriado (caudado e putâmen), a parte externa do globo pálido (GPe), a parte interna do globo pálido (GPi), o núcleo subtalâmico (STN) e a substância negra compacta e reticulada (Svenningsson et al., 1999). Esses agrupamentos neuronais são importantes para o controle e iniciação dos movimentos (Marsden et al., 1994), uma vez que promovem um controle supervisor da atividade dos neurônios motores superiores (Purves, Neurociência, 2005).

A circuitaria dos núcleos da base se origina em múltiplas áreas corticais (sensoriais e motoras) e termina, após a retransmissão pelos núcleos da base e do tálamo, em áreas motoras e pré-motoras do lobo frontal. Os núcleos da base desempenham um papel permissivo ao movimento, uma vez que promovem uma inibição tônica do tálamo, sendo a sua desinibição necessária para o início de um movimento (Purves, Neurociência, 2005).

Os neurônios do corpo estriado recebem muitas aferências, predominando as aferências glutamatérgicas de áreas corticais, límbicas e talâmicas, e as aferências dopaminérgicas do mesencéfalo, tanto da parte compacta da substância negra quanto da área tegmental ventral. Enquanto as sinapses glutamatérgicas servem para engatilhar os circuitos estriatais, as sinapses dopaminérgicas têm um papel modulatório crucial, regulando a neurotransmissão glutamatérgica (Schiffmann et al., 2007).

As projeções dos neurônios espinhosos médios do corpo estriado ao segmento interno do globo pálido (GPi) e à parte reticular da substância negra (SNr) constituem uma “via direta” e causam uma desinibição dos neurônios do tálamo. Uma segunda via serve para aumentar o nível de inibição tônica do tálamo e é chamada de “via indireta”, uma vez que ainda há a participação de mais um componente dos núcleos da base, o segmento externo do globo pálido (GPe) (Fig.1). Como os neurônios glutamatérgicos do tálamo facilitam a estimulação de movimentos via córtex, o

resultado da via indireta é uma redução e da via direta uma acentuação do movimento (Purves, Neurociência, 2005; Richardson et al., 1997).

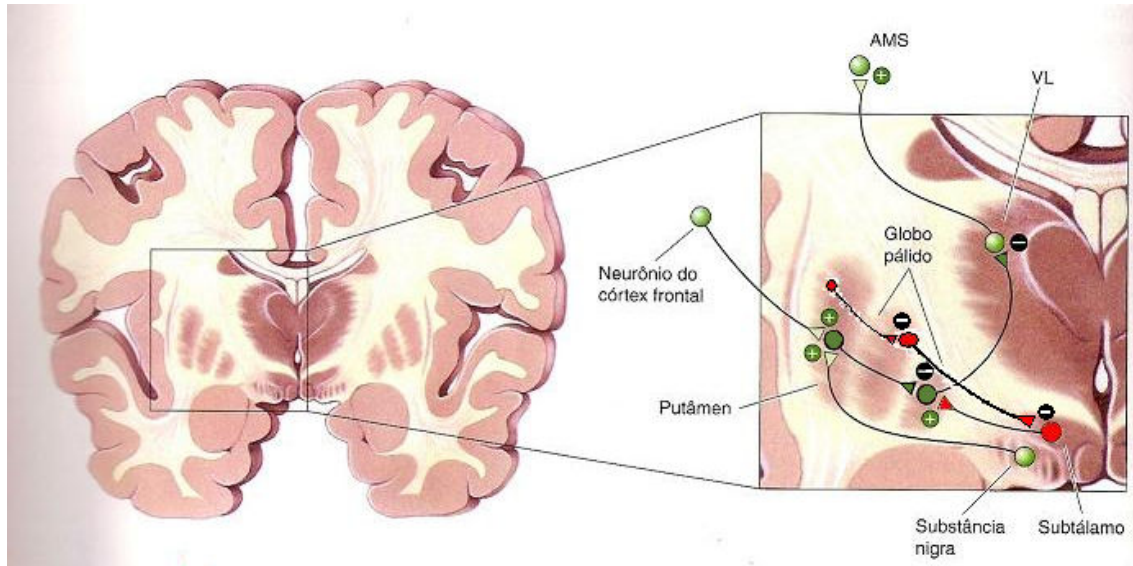


Figura 1: Esquema da circuitaria dos núcleos da base. Em verde, a via direta; em vermelho, a via indireta (Adaptado de Bear. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 3a edição).

Os neurônios espinhosos médios do corpo estriado possuem dois principais tipos de receptores para dopamina, D_1 e D_2 . Postula-se que a dopamina possa excitar os neurônios que expressam receptores de dopamina do tipo D_1 na via direta e inibir os neurônios que expressam receptores do tipo D_2 da via indireta, causando uma diminuição do efluxo inibitório dos núcleos da base no tálamo (Purves, Neurociência, 2005; Richardson et al., 1997). A morte dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra leva a uma atividade anormal dos núcleos da base, sendo responsável pelos sintomas motores da DP.

O modelo descrito acima tem sido bastante útil em estudos da anatomia e funções da circuitaria dos gânglios da base, mas representa, claramente, uma visão simplificada. Muitas conexões potencialmente importantes entre os núcleos da base e o tronco encefálico ou núcleos talâmicos não são incluídas nesse modelo. Além disso, a separação das vias estriatais em direta e indireta não são absolutas (Galvan et al., 2008).

Modelos animais baseados em toxinas que mimetizam os sintomas da DP têm sido bastante empregados em estudos. Uma das neurotoxinas utilizadas é a 6-hidróxi-dopamina (6-OHDA), que é captada por corpos celulares e fibras de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos. Sua neurotoxicidade é baseada no efeito inibitório sobre as enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (complexos I e IV) (Deumens et al., 2002), bem como na produção de radicais livres (Inden et al., 2005).

Ainda não existem tratamentos capazes de impedir ou diminuir a degeneração dos neurônios dopaminérgicos. Os tratamentos disponíveis, como administração de levodopa (precursor de dopamina), agonistas de dopamina e inibidores da enzima monoamina oxidase-B, são apenas sintomáticos e agem promovendo a manutenção dos níveis dopaminérgicos. Tais tratamentos não têm plena eficácia e geram efeitos colaterais.

1.1.1 Excitotoxicidade

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC de mamíferos (Watkins e Evans, 1981) e nos núcleos da base (Greenamyre e Porter, 1994), e, entre outras funções, participa de projeções motoras do córtex para os núcleos da base (corpo estriado, STN e SNpc), medula espinhal e tálamo e dos núcleos da base para o tálamo (Albin et al., 1989; Doble et al., 1999). Sendo assim, um mau funcionamento desse sistema pode prejudicar a atividade dos núcleos da base.

Existem evidências de que projeções dopaminérgicas da SNpc a outras regiões dos núcleos da base exercem função regulatória no padrão de disparos de algumas vias glutamatérgicas. A redução de impulsos nervosos de neurônios dopaminérgicos ao estriado resulta numa super ativação do núcleo subtalâmico (STN), causando um aumento na liberação de glutamato na SNpc, a qual é rica em receptores AMPA e NMDA (Rodriguez et al., 1998). Existe a hipótese de que esse aumento de disparos do STN serviria para aumentar a liberação de dopamina dos neurônios dopaminérgicos sobreviventes, mantendo a homeostase dopaminérgica

(Bezard et al., 1999), entretanto uma contínua liberação aumentada de glutamato pode ativar a cascata da excitotoxicidade.

A excitotoxicidade refere-se ao processo de morte neuronal causada por prolongada ativação de receptores glutamatérgicos (Doble et al., 1999). Isso pode ocorrer devido à excessiva liberação de glutamato na fenda sináptica, falha na remoção de glutamato da fenda sináptica ou disfunção da inibição de neurônios glutamatérgicos por neurônios GABAérgicos (Olney et al., 1990).

A morte celular devido à excitotoxicidade envolve prolongada despolarização dos neurônios, mudanças nas concentrações intracelulares de cálcio e a ativação de mecanismos enzimáticos e nucleares da apoptose. A ativação de receptores AMPA e NMDA está relacionada com o início desse processo. A persistente despolarização dos neurônios devido às altas concentrações extracelulares de glutamato leva a uma cascata de eventos celulares que irão resultar na morte celular. Esses eventos podem ser dependentes do influxo de sódio, dependentes do influxo de cálcio e dependentes da exocitose de glutamato, e ocorrem paralelamente (Doble et al., 1999).

O influxo de sódio, juntamente com a entrada de cloro, irá levar ao acúmulo de água dentro da célula, levando ao inchaço celular. Pode ocorrer a lise do neurônio e, conseqüentemente, liberação de seus constituintes, entre eles o glutamato, caso o estímulo despolarizante não seja retirado (Choi et al., 1987).

O aumento das concentrações de cálcio intracelular decorrente do influxo através de canais de cálcio dependentes de voltagem, receptores NMDA e do estoque celular no retículo endoplasmático (Mody e MacDonald et al., 1995; Ruiz et al., 2009), estimula a atividade de enzimas dependentes de cálcio, como proteases, lípases e nucleases. Isso leva a morte celular por necrose por diferentes vias, incluindo disfunção mitocondrial, alterações no citoesqueleto e rompimento da membrana (Greenamyre, 2001). Além disso, o aumento de cálcio na célula irá causar a exocitose das vesículas contendo glutamato nas terminações nervosas, aumentando as concentrações extracelulares do neurotransmissor excitatório (Doble et al., 1990). Em cultura de células, a remoção do cálcio extracelular previne contra a neurotoxicidade gerada por glutamato (Choi et al., 1985), o que mostra o papel fundamental do aumento das concentrações de cálcio na célula para o processo de excitotoxicidade.

Durante o processo de excitotoxicidade, há um aumento das concentrações extracelulares de glutamato decorrentes da lise celular, da exocitose das vesículas sinápticas dependente de cálcio e do transporte lento ou reverso do glutamato subsequente à despolarização. As altas concentrações extracelulares de glutamato irão, então, difundir o processo de excitotoxicidade a outros neurônios (Doble et al., 1990).

Outra forma de toxicidade induzida por glutamato consiste na habilidade desse neurotransmissor de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio no neurônio, uma vez que ele inibe a captação de cistina, que é importante para a síntese intracelular de glutatona (Greenamyre, 2001).

A hipótese de excitotoxicidade indireta diz que o glutamato também pode tornar-se tóxico em concentrações normais (Novelli et al., 1988; Zeevalk e Nicklas, 1990; Greene e Greenamyre, 1996). Conforme essa hipótese, qualquer processo que prejudique a capacidade do neurônio em manter o seu potencial de membrana, como um defeito na mitocôndria, resultaria na vulnerabilidade do neurônio às concentrações extracelulares fisiológicas de glutamato. Esta hipótese possui grande importância para estudos com a DP, devido à evidência de disfunção mitocondrial nesse distúrbio. Quando a produção de ATP é afetada devido ao mau funcionamento da mitocôndria, a bomba Na/K-ATPase, responsável por manter o potencial de membrana, irá diminuir a troca de sódio/potássio, resultando numa tendência à despolarização da membrana. Isso irá aumentar a probabilidade de canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem abrirem-se e ocorrer o potencial de ação em resposta a um estímulo (Riepe et al., 1995). Além disso, a despolarização da membrana irá permitir que os receptores NMDA sejam ativados por glutamato, iniciando uma cadeia excitotóxica. Acrescentando-se, o mau funcionamento da bomba Na/K-ATPase irá aumentar a concentração intracelular de sódio, diminuindo o gradiente eletroquímico de sódio através da membrana neuronal e prejudicando mecanismos dependentes de sódio, como a captação de glutamato pelos transportadores (Gemba et al., 1994; Roettger e Lipton, 1996).

Assim como em outras doenças neurodegenerativas, é provável que nenhum mecanismo isolado possa causar a morte neuronal na DP, e a excitotoxicidade parece ser uma via final comum às diferentes causas do dano neuronal (Fornai et al.,

1997). Sabe-se que existe uma alteração na distribuição e densidade de receptores glutamatérgicos em pacientes com a DP (Greenamyre, 2001) e que vias glutamatérgicas estão alteradas devido à depleção dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal: a atividade dos neurônios do STN, que envia projeções para a SNpc, e da via corticoestriatal está aumentada (Bergman et al., 1990; Meshul et al., 1999), enquanto que a atividade dos neurônios talamocorticais está diminuída (Ceballos-Baumann et al., 1994).

Recentemente, um trabalho investigou a contribuição da excitotoxicidade glutamatérgica em um modelo animal da DP, assim como os mecanismos de neurodegeneração envolvidos (Meredith et al. 2009). Esse foi o primeiro estudo mostrando alteração da homeostase de glutamato na SNpc em modelo da DP em ratos. Tanto autofagia quanto apoptose foram relacionadas à excitotoxicidade glutamatérgica nesse modelo.

Além da SNpc, o estriado também parece estar envolvido no processo de excitotoxicidade. Verificou-se uma *downregulation* na expressão das proteínas dos transportadores de glutamato GLT1 e GLAST nessa região após lesão por 6-OHDA (Chung et al., 2008), o que, potencialmente, leva a um aumento de glutamato extracelular. Outro estudo mostrou que há um aumento de duas vezes no nível extracelular basal de glutamato no estriado um mês após infusão de 6-OHDA (Meshul et al., 1999), o que pode estar relacionado com uma atividade glutamatérgica aumentada no córtex e no tálamo (Calabresi et al., 1993; Blandini et al., 1996a,b; Onn et al., 2000; Greenamyre, 2001) e com uma ativação aumentada do STN (Centonze et al., 2005).

1.2 Sistema purinérgico

O sistema purinérgico é formado, principalmente, pelas bases púricas adenina e guanina, nucleotídeos de adenina (ATP, ADP, AMP), nucleosídeo adenosina, nucleotídeos de guanina (GTP, GDP, GMP), nucleosídeo guanosina, metabólitos xantina e hipoxantina, ácido úrico, nucleosídeo inosina, receptores, transportadores e enzimas. As bases púricas são os principais constituintes do ADN e do ARN.

Nucleotídeos púricos, principalmente ATP, estão envolvidos em processos bioquímicos internos e transferência de energia na célula, enquanto que os nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc agem como segundo mensageiros na transdução de sinal (Barnstable et al., 2004; Bourne et al., 1990).

O metabolismo das purinas nos mamíferos é muito complexo, sendo assim, a guanosina pode ser produzida de diversas maneiras, tanto pela síntese *de novo*, quanto por rotas de recuperação de purinas (Fig. 2). Com isso, existe uma interconversão entre os derivados de guanina e adenina.

Tradicionalmente, os derivados de guanina estão relacionados a processos intracelulares, como transdução de sinal por proteínas G. Além disso, eles também estão sendo estudados por exercer efeitos extracelulares como modulação da atividade glutamatérgica (Baron et al., 1989; Schmidt et al., 2000), efeitos comportamentais (Roesler et al., 2000.) e efeitos tróficos em células neurais (Ciccarelli et al., 2001).

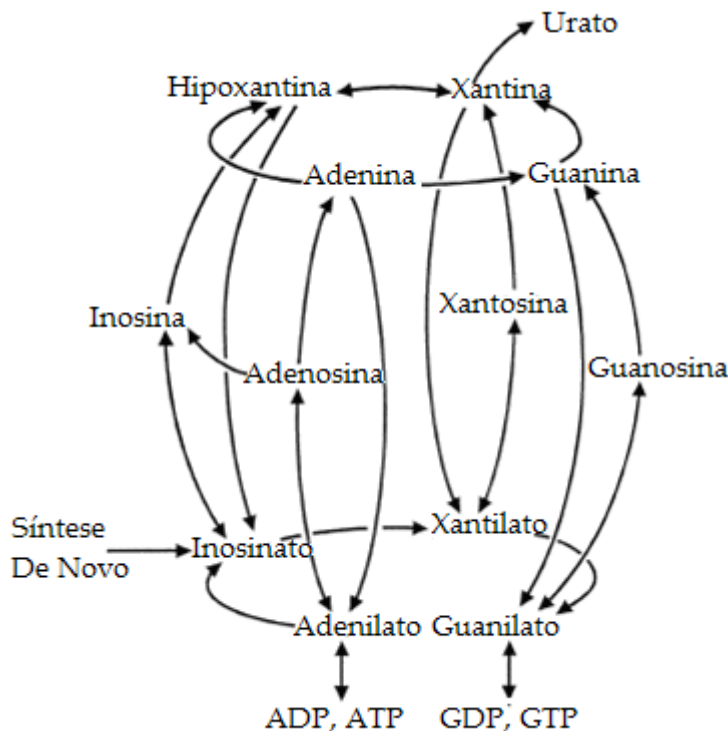


Figura 2: Esquema ilustrando vias metabólicas purinérgicas. A base nitrogenada guanina pode ser gerada pela hidrólise do guanilato em guanosina, seguido pela remoção de ribose pela purina nucleosídeo fosforilase (Adaptado de Loeffler et al., 1997).

1.2.1 Guanosina e outros derivados de guanina

Estrutura e Receptores

A guanosina é um nucleosídeo púrico, formada pela ligação *N*-glicosídica da base nitrogenada guanina ao carboidrato ribose (Fig. 3).

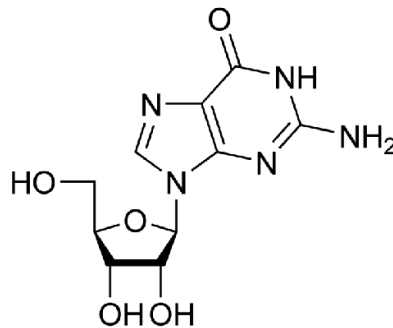


Figura 3: Estrutura química da guanosina (<http://pt.wikipedia.org/>)

Algumas ações da guanosina extracelular podem ser mediadas intracelularmente a partir da sua captação, mas muitos efeitos tróficos de derivados de guanina não são afetados por inibidores da captação de nucleosídeos (Gysbers & Rathbone, 1992). Outras funções da guanosina extracelular podem ser mediadas pela liberação de derivados de adenina, que possui ação autócrina e parácrina (Ciccarelli et al., 2000a), entretanto muitos dos efeitos dos derivados de guanina extracelular persistem na presença de antagonistas para receptores purinérgicos P1 e P2 (Frizzo et al., 2001; Gysbers & Rathbone, 1992; Tasca & Souza, 2000). Deve haver, então, um modo diferente desse nucleosídeo modular atividades de neurônios e astrócitos.

Gysbers et al. (2000) achou que células PC12 expressam sítios de ligação específicos para GTP na superfície da membrana celular, que não se ligam a ATP. Traversa et al. (2002) publicou o primeiro estudo mostrando evidências diretas da

presença de um sítio de ligação de alta afinidade para o nucleosídeo marcado radioativamente [³H]-guanosina em preparação de membrana cerebral de rato, e acredita-se que esse sítio seja um receptor de guanosina. Não menos importante, [³H]-guanosina não se ligou a receptores de glutamato, mostrando que sua ação na modulação da atividade glutamatérgica não ocorre através desse mecanismo.

Além disso, nem guanosina nem GTP ligaram-se com alta afinidade à receptores de derivados de adenina (Muller & Scior, 1993), sugerindo que os derivados de guanina possuem diferentes alvos celulares do que os derivados de adenina.

Liberação e metabolismo de derivados de guanina

Os astrócitos são a principal fonte de purinas no encéfalo tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Ciccarelli et al., 1999). Eles estão envolvidos em diversas funções fisiológicas, como desenvolvimento neuronal, atividade sináptica, controle homeostático do meio extracelular, e também em danos encefálicos (Chen & Swanson, 2003). Além de liberarem neurotransmissores como o glutamato, eles também são capazes de liberar nucleotídeos e nucleosídeos de purinas (Meghji et al., 1989; Caciagli et al., 1988) em condições normais e devido estímulos elétricos ou condições de hipoxia/hipoglicemia (Ciccarelli et al., 1996, 1997).

Os derivados de guanina estimulam a liberação de derivados de adenina em cultura de astrócitos: GTP aumenta as concentrações extracelulares de nucleotídeos de adenina, enquanto que a guanosina aumenta as concentrações extracelulares de adenosina (Ciccarelli et al., 1999). O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não é bem conhecido.

Assim como os neurônios, os astrócitos também participam da captação e do metabolismo dos nucleosídeos adenosina e guanosina (Parkinson et al., 2005). O metabolismo das purinas ocorre em parte pelas enzimas nucleotidases e ectonucleotidases. Elas catalisam a transformação de nucleotídeos púricos trifosfatados em nucleotídeos di e monofosfatados e, no final, em nucleosídeos (GTP

→ GDP → GMP → guanosina). Além da participação dos astrócitos e neurônios, através das nucleotidasas, na formação da guanosina, esse nucleosídeo também pode ser derivado do metabolismo extracelular. A inibição da atividade da ecto-5'-nucleotidase em cultura de astrócitos diminui a concentração fora da célula de guanosina, indicando a origem extracelular de uma parte desse nucleosídeo (Caciagli et al., 2000).

Modulação do sistema glutamatérgico

Os nucleotídeos de guanina possuem ação inibitória na ligação de glutamato e outros agonistas glutamatérgicos em seus receptores. Verificou-se que a estimulação da fosforilação da proteína GFAP dependente da ativação de receptores metabotrópicos por glutamato estava inibida na presença de nucleotídeos de guanina (Tasca et al., 1995), bem como a indução do aumento de AMPc intracelular decorrente da ativação de receptores metabotrópicos (Tasca et al., 1998) e a corrente gerada por ativação do receptor cainato (Aleu et al., 1999; Burgos et al., 2003).

Achava-se que, agindo via proteína G, GTP era capaz de inibir a ligação de neurotransmissores em receptores metabotrópicos e modular a atividade da adenilato ciclase, enzima que forma o AMPc através da proteína-G e que leva a uma resposta neural (Gudermann et al., 1997). Entretanto, estudos sugerem que a ação dos derivados de guanina no sistema glutamatérgico não envolve proteína G. Mostrou-se que os nucleotídeos de guanina inibem a ligação de glutamato e seus análogos em seus receptores, interagindo em sítios não relacionados com a proteína G, e que a atividade da adenilato ciclase é independente desse efeito inibitório (Paz et al., 1994; Ramos et al., 1997; Souza & Ramirez, 1991; Rubin et al., 1997;). Entretanto, a guanosina não mostrou esse mesmo efeito (Souza & Ramirez, 1991; Porciúncula et al., 2002).

Sugere-se que a inibição da ligação dos agonistas glutamatérgicos pelos derivados de guanina possa ocorrer competitivamente, uma vez que GTP e GDP e seus análogos deslocam diferentes agonistas tanto de receptores ligados a proteína G, quanto de receptores ionotrópicos (Paz et al., 1994; Baron et al., 1989). Ramos et

al. (1997) justifica esse deslocamento devido à sobreposição entre os sítios de ligação, presentes na superfície da membrana, dos nucleotídeos de guanina e do ácido caínico.

Acrescentando-se à função na modulação do sistema glutamatérgico, derivados de guanina administrados intracerebroventricularmente (i.c.v.) previniram convulsões induzidos por ácido quinolínico, uma toxina que superestimula a transmissão glutamatérgica (Stone, 2001). Além disso, GMP e guanosina administrados intraperitonalmente também previniram convulsões causadas por ácido quinolínico (Schmidt et al., 2000), e, quando administrada oralmente, a guanosina também foi efetiva nesse modelo (Lara et al., 2001).

A maioria dos efeitos dos nucleotídeos de guanina no sistema glutamatérgico parece ser devido a sua conversão em guanosina. Quando administrado um inibidor da ecto-5'-nucleotidase (AOPCP) i.c.v., GMP não preveniu convulsão induzida por ácido quinolínico, enquanto que o efeito da guanosina não foi afetado (Soares et al., 2004). O efeito anticonvulsivo de GTP e GDP administrado i.c.v parece ser mediado por guanosina, uma vez que análogos fracamente hidrolisáveis não foram capazes de prevenir as convulsões causadas por ácido quinolínico em ratos (Schmidt et al., 2005).

Captação de glutamato

A captação de glutamato pelos transportadores de glutamato dependentes de Na^+ presentes, principalmente, nos astrócitos é muito importante para a manutenção da concentração extracelular desse neurotransmissor em níveis não tóxicos, tanto em condições fisiológicas quanto no estresse (Anderson e Swanson, 2000). Mostrou-se que a guanosina foi capaz de aumentar a captação de glutamato em cultura de astrócitos e em fatias de encéfalo (Frizzo et al., 2001, 2002, 2003). Em condições basais, a guanosina foi mais eficaz em ratos jovens e no córtex, enquanto que, em condições de excitotoxicidade, a guanosina possuiu um efeito mais geral. Além de aumentar a captação de glutamato extracelular, GTP, GDP, GMP e guanosina inibiram a captação de glutamato pelas vesículas sinápticas *in vitro* (Tasca et al.,

2004), mostrando também uma interação intracelular entre os derivados de guanina e a transmissão glutamatérgica. Trabalhos mostram que o efeito máximo na captação de glutamato pela guanosina é de 80% quando comparado com o grupo controle (Gottfried et al., 2002; Frizzo et al., 2005; Thomazi et al., 2004).

Um estudo mostrou que a captação de glutamato no estriado de ratos com idade de 15 meses foi menor quando comparado com ratos de 10 meses. Entretanto em ratos com 26 meses observou-se um aumento na captação desse neurotransmissor. O autor sugere que este aumento na captação em ratos mais velhos ocorreu devido o processo de astrogliose relacionado com cérebros em idade avançada (Thomazi et al., 2004).

Por mais que GMP e GTP também tenham obtido efeito na captação de glutamato em cultura de astrócitos, a adição dos dois nucleotídeos e da guanosina simultaneamente não resulta em somatória do aumento da captação de glutamato (Frizzo et al., 2003). Além disso, um análogo do GTP (GMP-PNP), que é fracamente hidrolisável, não conseguiu estimular a captação de glutamato em cultura de astrócitos, e o efeito de GMP foi inibido quando a cultura recebeu um pré-tratamento com um inibidor da ectonucleotidase (AOPCP). Isso mostra, mais uma vez, que a ação dos nucleotídeos de guanina ocorre devido à conversão em guanosina.

Em fatias de córtex, a ativação da captação de glutamato pela guanosina apenas ocorreu quando altas concentrações de glutamato (100 μ M) estavam presentes no meio de incubação, sugerindo um papel da guanosina na manutenção das concentrações de glutamato abaixo de níveis excitotóxicos. Quando em condição de hipóxia e isquemia, a guanosina também aumentou a captação de glutamato (Frizzo et al., 2002).

Complementando a ação da guanosina na captação de glutamato, a adenosina é capaz de inibir a liberação do mesmo (Peris et al., 1985; Rudolphi et al., 1992). Uma vez que a guanosina induz liberação de adenosina (Rathbone et al., 1999), esses dois nucleosídeos podem agir conjuntamente no controle da excitotoxicidade.

Sabe-se que após danos causados por isquemia uma quantidade significativa de glutamato é liberada, resultando em numa superestimulação do sistema glutamatérgico e, conseqüentemente, dano celular (Frizzo et al., 2002; Lee et al.,

1999). Entretanto o tratamento com guanosina reduziu esses níveis de glutamato extracelular e preveniu o aumento da morte celular (Frizzo et al., 2002).

Mostrou-se que a captação de glutamato é afetada em encéfalos em processo de envelhecimento (Segovia et al., 2001) e que espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas por H_2O_2 inibem captação de glutamato em cultura de astrócitos devido à oxidação dos transportadores (Trotti et al., 1997). Corroborando com o trabalho citado anteriormente, astrócitos em cultura “mais velhos” (altos níveis de GFAP) foram mais suscetíveis a H_2O_2 e não foram modulados pela guanosina na captação de glutamato, ao contrário dos astrócitos “mais jovens” (baixos níveis de GFAP) (Gottfried et al., 2002). Entretanto, a guanosina não protegeu contra o dano oxidativo gerado pelas ERO, sugerindo que a neuroproteção da guanosina contra a excitotoxicidade não envolve efeito antioxidante.

Como a captação de glutamato pelos astrócitos é o principal mecanismo para finalizar a ação deste neurotransmissor na fenda sináptica, a sua estimulação pela guanosina deve ser um processo importante na regulação da transmissão glutamatérgica, especialmente em condições de excitotoxicidade (Chen & Swanson, 2003).

Efeitos neurotróficos

GTP e guanosina possuem efeitos tróficos comuns, estimulando a proliferação de diversos tipos celulares, como astrócitos e microglia (Rathbone et al., 1992b e 1992b; Ciccarelli et al 2000b), estimulando a síntese e a liberação de fatores tróficos pelos astrócitos (Middlemiss et al., 1995), o crescimento de neuritos de células PC12 (Gysbers e Rathbone, 1992), promovendo o crescimento de astroblastos (Kim et al., 1991) e estimulando o crescimento axonal *in vitro* (Rathbone et al., 1992a).

Ciccarelli et al (2000b) mostrou que o efeito mitogênico do GTP foi independente de sua conversão para guanosina, uma vez que seu análogo fracamente hidrolisável obteve efeitos maiores que o do GTP. Além disso, verificou-

se que uma parte da ação da guanosina foi mediada pela ação de adenosina endógena em receptores extracelulares P1 (Ciccarelli et al., 2000b).

Sendo assim, os derivados de guanina possuem funções tróficas importantes, para o desenvolvimento e manutenção de células neuronais (Rathbone et al., 1999).

Metabolismo da dopamina (DA)

Estudos mostrando que a adenosina inibe a síntese e a liberação de dopamina dos seus botões terminais (Harms et al., 1979), que a concentração estriatal de adenosina teve um decréscimo de 25% após lesão com 6-OHDA da via nigroestriatal em ratos (Wojcik et al., 1983) e que concentrações de xantina e ácido homovanílico estavam alteradas no fluido cerebrospinal de pacientes com a DP (LeWitt et al, 1992) levaram a questionamentos sobre a correlação entre o metabolismo das purinas e da dopamina.

Sabendo que a depleção da via nigroestriatal nos pacientes com a DP é acompanhada por um compensatório aumento da renovação (turnover) de dopamina pelos neurônios remanescentes (Mogi et al., 1988), Loeffler estudou a relação entre o turnover de dopamina e as concentrações de purinas no estriado. Coelhos tratados com reserpina e L-dopa, que aumentam o turnover da dopamina, tiveram os níveis estriatais de guanosina diminuídos e de guanina aumentados (Loeffler et al., 1997). O autor sugere, então, uma interação entre o metabolismo púrico e da dopamina, entretanto não é conhecido o mecanismo envolvido (Loeffler et al., 1997, 2000).

2. Objetivos

Tendo em vista que as purinas derivadas da guanina, principalmente GMP e guanosina, apresentam perfis neuroprotetores similares, em vários protocolos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Frizzo et al., 2002) e que o efeito do GMP parece ser devido a sua conversão para guanosina (Frizzo et al., 2002), o nosso objetivo foi investigar os efeitos de uma administração oral crônica de guanosina no modelo animal de hemiparkinsonismo induzido por 6-OHDA.

3. Material e Métodos

3.1 Infusão de 6-OHDA e tratamento com guanosina

Ratos Wistar machos (250-350g, 100-115 dias de idade) receberam uma solução de 0,5 mg/ml de guanosina (n=20) ou água destilada (n=16) durante 4 semanas.

Após as duas primeiras semanas de tratamento, foram submetidos à cirurgia estereotáxica, conforme a literatura (Mukhida et al., 2001), através da qual receberam a infusão de 6-OHDA (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 16,5 μg , 5,5 μl) no feixe prosencefálico medial direito a fim de promover a morte dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Como consequência dessa lesão unilateral, há uma assimetria na transmissão dopaminérgica entre os hemisférios, evidenciada pelo comportamento rotacional registrado em testes comportamentais que serão explicados a seguir.

Para a realização das infusões, utilizamos agulha ligada a uma microseringa de 10 μl (Hamilton, 701 N) e uma bomba de infusão (Insight). A agulha foi mantida no encéfalo por 4 min após cada infusão para permitir a difusão da droga. Os ratos receberam cuidados pós-operatórios até acordarem e foram então colocados de volta às suas caixas.

3.2 Teste Comportamental

Duas semanas após o final do tratamento, os animais foram submetidos ao Teste de Motricidade sobre Grade (TMG, abreviatura do inglês *Footfault test*), que consiste em uma grade elevada a 76,5 cm (80 x 60 cm, aberturas de 3 x 3 cm) (Modo et al., 2000). Os animais foram habituados à sala de comportamento por 30 minutos antes do teste. Foram, então, colocados no centro da grade onde permaneceram

durante 3 minutos para explorá-la livremente. Registrou-se a ocorrência de comportamento rotacional induzido pelo contexto (Silvestrin et al., 2009).

Uma semana após o TMG, os animais foram desafiados com metilfenidato (MF) na dose de 20 mg/kg. Após a habituação na sala de comportamento durante 30 minutos, os ratos receberam injeção intraperitoneal (i.p.) da droga, e, então, foram colocados numa arena circular por 30 minutos. O número de rotações ipsilaterais a lesão foi registrado.

3.3 Imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase (TH)

Os animais foram mortos por decapitação. Análises imunohistoquímicas do conteúdo de tirosina-hidroxilase para quantificação da lesão foram realizadas de acordo com a literatura (Castaneda et al., 2005), com pequenas modificações. A enzima tirosina-hidroxilase é limitante no processo de síntese da dopamina e catalisa a hidroxilação de L-tirosina para DOPA (Dunkley et al., 2004), podendo ser utilizada como um marcador de neurônios dopaminérgicos.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (0,7 ml/kg) e xilazina (0,6ml/kg) e perfundidos transcardialmente com 150 mL de solução de NaCl 0,9% seguidos de 150 mL de solução de paraformaldeído 4%. Após a perfusão, os encéfalos foram isolados e mantidos em geladeira, mergulhados em solução de paraformaldeído 4% por 12 horas. Após esse período, os encéfalos foram colocados em solução de sacarose 30% permanecendo em geladeira até submersão completa. Os encéfalos foram aclimatizados e seccionados a -20°C em criostato (Leica Microsystems GmbH) para a obtenção de fatias do mesencéfalo em secções coronais de 45 µm, as quais foram colocadas em tampão salina-fosfato (PBS). As fatias foram lavadas cinco vezes em PBS filtrado, sendo que cada lavagem permaneceu cinco minutos em agitador à temperatura ambiente. Após as lavagens, as fatias foram incubadas em anticorpo policlonal de coelho anti-tirosina-hidroxilase 1:750 (AB 152, Chemicon International) à temperatura ambiente e por 18 horas. As fatias foram novamente lavadas cinco vezes e, então, incubadas com anticorpo secundário (anti-coelho) fluorescente (AlexaFluor 568 A11036, Molecular Probes, USA) à temperatura

ambiente durante 1 hora. Seguido à nova lavagem com PBS filtrado, as fatias foram colocadas entre lâmina e lamínula com Fluorsave (Calbiochem, USA) para evitar a perda da fluorescência e observadas em microscópio. Analisaram-se as imagens obtidas usando o programa Scion Image para Windows, através do pareamento da quantidade de neurônios positivos para TH de ambos os hemisférios, considerando o lado não lesionado com 100% de células TH-positivas. Foram feitas duplicatas de cada rato.

3.4 Análise estatística

Para verificar a diferença na presença de rotações no TMG entre os grupos tratado (guanosina) e controle, realizamos o teste exato de Fisher. Também foi realizado o teste t para amostras independentes a fim de verificar a diferença do grau de lesão entre os grupos. Foi adotado $p < 0,05$ para significância estatística.

4. Resultados

Treze dos 16 animais do grupo controle mostraram comportamento rotacional espontâneo no TMG, o que diferiu dos animais do grupo tratado, onde somente 9 dos 20 animais mostraram o mesmo comportamento (Teste Exato de Fisher, $P=0,041$) (Tabela 1). Entretanto, nas rotações induzidas por metilfenidato 20 mg/kg, não houve uma diferença significativa no número de giros entre os grupos controle e tratado (Teste t para amostras independentes, $P = 0,716$, grupo controle, $n=16$; grupo tratado, $n=20$) (Fig.4).

Encontramos uma tendência para uma menor perda dos neurônios nigrais positivos para TH nos animais tratados com guanosina, quando comparados aos controles (teste t independente, $P=0,064$, grupo controle, $n=8$, $90\% \pm 5$, média \pm E.P.; grupo tratado, $n=5$, $70\% \pm 11$) (Fig.5 e Fig. 6).

Tabela 1. Correlação entre tratamento e comportamento rotacional no teste de motricidade elevada. Teste Exato de Fisher, $p = 0,041$.

Comportamento rotacional espontâneo no Teste de Motricidade sobre Grade (TMG)	Tratamento		Total
	Guanosina	Controle	
Sim	9	13	22
Não	11	3	14
Total	20	16	36

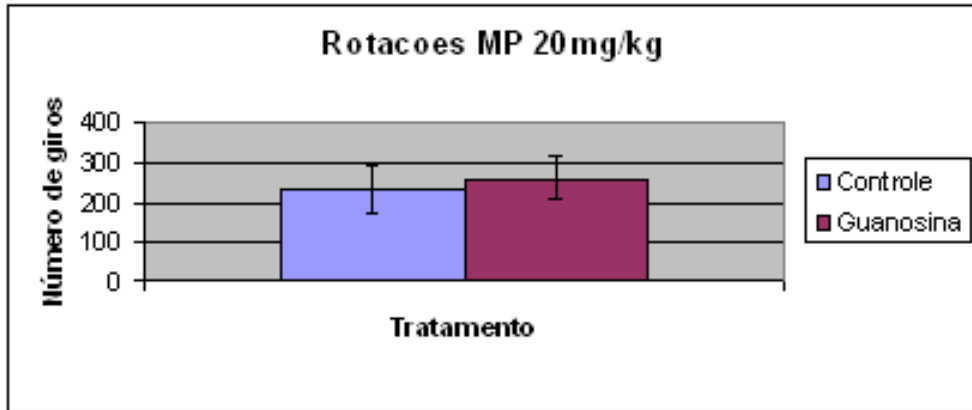


Figura 4. Rotações com metilfenidato nos grupos controle e guanosina. Teste t para amostras independentes ($P= 0,716$; média \pm E.P.; grupo controle, $n=16$; grupo tratado, $n=20$).

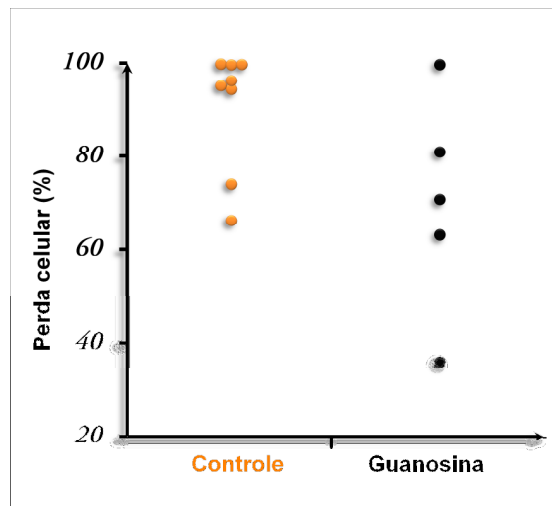


Figura 5. Comparação da perda de células TH-positivas na parte compacta da substância negra entre os grupos Controle e Tratado (Guanosina). Teste t independente, $p=0,064$.

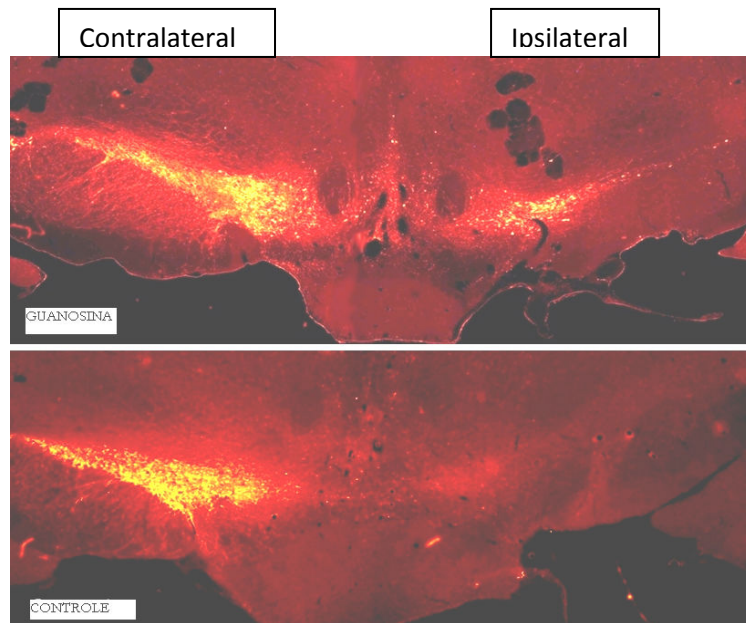


Figura 6. Imunoistoquímica mostrando a diminuição de células TH positivas na substância negra ipsilateral à lesão causada pela infusão de 6-OHDA (lado direito) em um rato tratado com guanosina e outro do grupo controle.

5. Discussão

Os resultados dos experimentos mostram que a guanosina previne, em alguns animais lesionados com 6-OHDA, o padrão comportamental de rotações induzidas pelo contexto no TMG, mas não quando induzidas por MF 20 mg/kg. Além disso, através da imunoistoquímica, verificamos que a guanosina pode ter um efeito neuroprotetor no modelo animal da DP induzido por 6-OHDA, uma vez que encontramos uma tendência a uma menor diminuição do conteúdo de TH nos animais tratados com guanosina quando comparados aos controles. Esse efeito pode tornar-se mais evidente se aumentarmos o número amostral.

As rotações induzidas pelo TMG foram analisadas considerando-se apenas a sua presença ou não, o que diferiu da análise das rotações induzidas por MF 20 mg/kg, as quais foram registradas quanto ao número de ocorrência por rato. Essa diferença na análise dos dados deve-se a resultados anteriores do nosso grupo que mostraram que somente animais com alto grau de lesão podem rodar no TMG, mas que o número de rotações, a princípio, não é importante (Silvestrin *et al.*, 2009). O mesmo não acontece no desafio de MF; entretanto, tal teste, provavelmente, apenas detecte diferentes faixas de grau de lesões, e não lesões ligeiramente próximas. Vale destacar que isto acontece com o teste de anfetamina, cujo mecanismo de detecção de lesão é similar ao do MF (Hefti *et al.*, 1980). Portanto, a diferença vista entre os testes deve ter ocorrido devido a uma possível diferença entre o grau de lesão necessário para a ocorrência de rotações no TMG e aquele necessário após desafio com MF 20 mg/kg para induzir diferentes intensidades de rotações. Sabe-se que o TMG é capaz de detectar animais lesionados quando há perda de aproximadamente 86% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (Silvestrin *et al.*, 2008), enquanto que o MF 20 mg/kg pode detectar menor grau de lesão, o que justifica a ineficiência dele em distinguir animais com diferentes graus de lesão entre os grupos no nosso experimento, que foram largamente lesionados, conforme mostrado pelos nossos resultados preliminares de imunoistoquímica.

O efeito da guanosina nas rotações no TMG e no MF 20 mg/kg provavelmente não se deve à interferência motora, uma vez que a guanosina não afeta o

desempenho locomotor no “rotarod” e no teste do campo aberto (Lara et al.,2001; Vinade et al.,2003).

A excitotoxicidade parece ser uma via final comum às diferentes causas da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc na DP, propagando-se por outros grupos de neurônios posteriormente (Fornai et al., 1997). Além disso, verificou-se que as concentrações de algumas purinas no líquido estão alteradas em pacientes com a DP (LeWitt et al, 1992) e que o metabolismo da dopamina deve estar relacionado com o das purinas (Loeffler et al.,1997, 2000), o que sugere um provável envolvimento destas no processo patológico da DP. Estudos mostram que a guanosina protege contra danos excitotóxicos (Schmidt et al., 2000; Lara et al., 2000), provavelmente devido a um papel fundamental na captura de glutamato quando os níveis desse neurotransmissor encontram-se em condições tóxicas para as células neurais (Frizzo et al., 2002). Uma vez que a administração oral de guanosina resulta em um aumento de duas vezes na concentração de guanosina no líquido (Vinadé et al., 2005), a concentração extracelular desse nucleosídeo deve ter aumentado nos núcleos da base do grupo de animais que recebeu o nosso tratamento, possivelmente exercendo seus efeitos neuroprotetores nas células TH-positivas da SNpc.

Estudos adicionais são necessários para entender os mecanismos pelos quais a guanosina diminui a assimetria motora no TMG, bem como a possível ação neuroprotetora evidenciada pela imunistoquímica. Uma vez que já foi demonstrada uma redução da quantidade de transportadores de glutamato localizados na glia (GLT1 e GLAST) do corpo estriado de ratos submetidos à lesão por 6-OHDA (Chung et al., 2008), e que a guanosina é capaz de aumentar a captação de glutamato por astrócitos em cultura e em fatias de córtex (Frizzo et al., 2001, 2002, 2003), nosso próximo objetivo de estudo é avaliar a sua ação, via tratamento oral, na captação de glutamato em corpo estriado de ratos submetidos à lesão por 6-OHDA. Em acréscimo, pretendemos finalizar o experimento de imunistoquímica, de forma a confirmar o provável efeito neuroprotetor da guanosina.

6. Referências

Albin RL, Young AB, Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.*, 12: 366–375.

Aleu J, Barat A, Burgos J, Solsona C, Marsal J and Ramirez G (1999). Guanine nucleotides, including GMP, antagonize kainate responses in *Xenopus* oocytes injected with chick cerebellar membranes. *J Neurochem.*, 72: 2170–2176.

Anderson CM, Swanson RA (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 32: 1–14.

Barnstable CJ, Wei JE, Han MH (2004). Modulation of synaptic function by cGMP and cGMP-gated cation channels. *Neurochem Int.*, 45: 875–884.

Baron BM, Dudley MW, McCarty DR, Miller FP, Reynolds IJ, Schmidt CJ (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

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurosciências: Desvendando o Sistema Nervoso*. 3a ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990). Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science*, 249: 1436–1438.

Bezard E, Boraud T, Bioulac B, Gross CE (1999). Involvement of the subthalamic nucleus in glutamatergic compensatory mechanisms. *Eur. J. Neurosci.*, 11: 2167–2170.

Blandini F, Greenamyre JT, Nappi G (1996a). The role of glutamate in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Funct Neurol.*, 11:3–15.

Blandini F, Porter RH, Greenamyre JT (1996b). Glutamate and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.*, 12:73–94.

Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, 24: 197–211.

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348: 125–131.

Burgos JS, Aleu J, Barat A, Solsona C, Marsal J, Ramírez G (2003). Kainate-triggered currents in *Xenopus* oocytes injected with chick retinal membrane fragments: effect of guanine nucleotides. *Investig Ophthalmol Vis Sci.*, 44: 3124–3129.

Caciagli F, Ciccarelli R, Di Iorio P, Ballerini P, Tacconelli L (1988). Cultures of glial cells release purines under field electrical stimulation: the possible ionic mechanisms. *Pharmacol Res Commun.*, 20: 935-47.

Caciagli F, Di Iorio P, Giuliani P, Middlemiss MP, Rathbone MP (2000). The neuroprotective activity of guanosine involves the production of trophic factors and the outflow of purines from astrocytes. *Drug Dev Res.*, 50: 32.

Calabresi P, Mercuri NB, Sancesario G, Bernardi G (1993). Electrophysiology of dopamine-denervated striatal neurons. Implications for Parkinson's disease. *Brain*, 116(2):433–452.

Castañeda E, Fleming S, Paquette MA, Boat K, Moffett J, Stachowiak EK, Bloom DC, Stachowiak MK (2005). Assessment of recovery in the hemiparkinson rat: drug-induced rotation is inadequate. *Physiol Behav.*, 84(4):525-35.

Ceballos-Baumann AO, Obeso JA, Vitek JL, et al. Restoration of thalamocortical activity after posteroventral pallidotomy in Parkinson's disease. *Lancet* 1994;344:814.

Centonze D, Gubellini P, Rossi S, Picconi B, Pisani A, Bernardi G, Calabresi P, Baunez C (2005). Subthalamic nucleus lesion reverses motor abnormalities and striatal glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. *Neuroscience*, 133:831–840.

Chen & Swanson, 2003 - Chen Y, Swanson RA (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 23: 137–149.

Choi DW (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.*, 7: 369–379.

Choi DW (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.*, 58: 293–297.

Chung EK, Chen LW, Chan YS, Yung KK (2008). Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Comp Neurol.*, 511(4):421-37.

Ciccarelli R, Rathbone MP, D'Alimonte I, Di Iorio P, Ballerini P, Giuliani P, Renzetti A, Caciagli F (1996). Modulation by metabotropic glutamate receptors of GTP effect on rat astrocytes proliferation. *Drug Develop Res.*, 37: 168.

Ciccarelli R, Di Iorio P, Middlemiss PJ, Ballerini P, D'Alimonte I, Rathbone MP, Caciagli F (1997). Potential neuroprotective effects of guanine-based purines released from rat cultured astrocytes. In: *Proceedings of Int. Symp. on Drug targets in heart and brain ischemia EPHAR Conference July 11-14*: 39.

Ciccarelli R, Di Iorio P, Giuliani P, D'Alimonte I, Ballerini P, Caciagli F et al. (1999). Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia*, 25: 93–98

Ciccarelli R, Di Iorio P, D'Alimonte I, Giuliani P, Florio T, Caciagli F et al. (2000a). Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia*, 29: 202–211.

Ciccarelli R, Di Iorio P, D'alimonte I, Giuliani P, Florio T, Caciagli F, Middlemiss PJ, Rathbone MP (2000b). Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *GLIA*, 29: 202–211.

Ciccarelli R, Ballerini P, Sabatino G, Rathbone MP, D'Onofrio M, Caciagli F et al. (2001). Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int J Dev Neurosci.*, 19: 395–414.

Deumens R, Blokland A, Prickaerts J (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol.*, 175(2):303-17.

Doble A (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther.*, 81(3):163-221. Review.

Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW (2004). Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem.*, 91(5):1025-43.

Esposito E, Di Matteo V, Di Giovanni G (2007). Death in the substantia nigra: a motor tragedy. *Expert Rev Neurother.*, 7(6):677-97.

Fahn S, Sulzer D (2004). Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx.*, 1(1):139-54.

Fornai F, Vaglini F, Maggio R, Bonuccelli U, Corsini GU (1997). Species differences in the role of excitatory amino acids in experimental parkinsonism. *Neurosci Biobehav Rev.*, 21(4):401-15. Review.

Frizzo ME, Lara DR, Dahm KC, Prokopiuk AS, Swanson R, Souza DO (2001). Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *NeuroReport.*, 12: 879–881.

Frizzo ME, Lara DR, Prokopiuk AS, Vargas CR, Salbego CG, Wajner M, Souza DO (2002). Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol.*, 22: 353–363.

Frizzo ME, Soares FA, Dall'Onder LP, Lara DR, Swanson RA, Souza DO (2003). Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Research.*, 972: 84–89.

Frizzo ME, Schwalm FD, Frizzo JK, Soares FA, Souza DO (2005). Guanosine enhances glutamate transport capacity in brain cortical slices. *Cell Mol Neurobiol.*, 25: 913–921.

Galvan A, Wichmann T (2008). Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol.*, 119(7):1459-74.

Gemba T, Oshima T, Ninomiy AM (1994). Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. *Neuroscience*, 63: 789–795.

Graybiel AM (1995). Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol.*, 5(6):733-41.

Greenamyre JT, Porter RH (1994). Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology*, 44: S7–13.

Greene JG, Greenamyre JT (1996). Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol.*, 48:613–34.

Greenamyre JT (2001). Glutamatergic influences on the basal ganglia. *Clin Neuropharmacol.*, 24:65–70.

Gottfried C, Tramontina F, Gonçalves D, Gonçalves CA, Moriguchi E, Dias RD, Wofchuk ST, Souza DO (2002). Glutamate uptake in cultures astrocytes depends on age: a study about

the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech. Ageing Dev.*, 123: 1333–1340.

Gudermann T, Schorneberg T, Schultz G (1997). Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci.*, 20: 399–427.

Gysbers JW, Rathbone MP (1992). Guanosine enhances NGF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. *NeuroReport.*, 3: 997–1000.

Gysbers JW, Guarnieri S, Mariggio MA, Pietrangelo T, Fanó G, Rathbone MP (2000). Extracellular guanosine 5-triphosphate enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth via increases in intracellular calcium. *Neuroscience*, 96: 817–824.

Hardy J (2003). Impact of genetic analysis on Parkinson's disease research. *Mov Disord.*, 18 (6):S96-8.

Harms HH, Wardeh G, Mulder AH (1979). Effects of adenosine on depolarization-induced release of various radiolabeled neurotransmitters from slices of rat corpus striatum. *Neuropharmacology*, 18:577–580;.

Hefti F, Melamed E, Sahakian BJ, Wurtman RJ (1980). Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacol Biochem Behav.*, 12(2):185-8.

Inden M, Kitamura Y, Kondo J, Hayashi K, Yanagida T, Takata K, Tsuchiya D, Yanagisawa D, Nishimura K, Taniguchi T, Shimohama S, Sugimoto H, Akaike A. (2005). Serofendic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced nigral neurodegeneration and drug-induced rotational asymmetry in hemi-parkinsonian rats. *J Neurochem.*, 95(4):950-61.

Kim JK, Rathbone MP, Middlemiss PJ, Hughes DW, Smith RW (1991). Purinergic stimulation of astroblast proliferation: guanosine and its nucleotides stimulate cell division in chick astroblasts. *J. Neurosci. Res.*, 28: 442–455.

Lara DR, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO (2000). Allopurinol for refractory aggression and self-inflicted behaviour. *J Psychopharmacol.*, 14: 81–83.

Lara DR, Schmidt AP, Frizzo ME, Burgos JS, Ramírez G, Souza DO (2001). Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.*, 912(2):176-80.

Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, 399:A7–A14.

LeWitt P, Galloway M, Matson W, Milbury P, McDermott M, Oakes D, Shoulson I (1992). CSF studies in unmedicated Parkinson disease: dopamine metabolism and xanthine. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 18:1248.

Loeffler DA, Lewitt PA, Juneau PL, Camp DM, Demaggio AJ, Milbury P., Matson WR, Rathbone MP (1997). Altered Guanosine and Guanine Concentrations in Rabbit Striatum Following Increased Dopamine Turnover. *Brain Research Bulletin*, 45(3): 297–299.

Loeffler DA, Camp DM, Juneau PL, Harel E, LeWitt PA (2000). Purine-induced alterations of dopamine metabolism in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Brain Research Bulletin*, 52(6): 553–558

Marsden CD, Obeso JA (1994). The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. *Brain*. 117 (4):877-97. Review.

Meghji P, Jeremy B, Rubio R (1989). Adenosine formation and release by embryonic chick neurons and glial in cell culture. *J Neurochem.*, 53: 1852-60.

Meredith GE, Totterdell S, Beales M, Meshul CK (2009). Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.*, 219: 334–340.

Meshul CK, Emre N, Nakamura CM, Allen C, Donohue MK, Buckman JF (1999). Time-dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience*, 88:1–16.

Middlemiss PJ, Rathbone MP, Gysbers JW (1995). Extracellular guanosine and guanosine-5'-triphosphate increase NGF synthesis and release from cultured mouse neopallial astrocytes. *Brain Res.*, 677: 152 ± 156.

Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H (2000). Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods.*, 104(1):99-109.

Mody I, MacDonald JF (1995). NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16: 356–359.

Mogi M, Harada M, Kiuchi K, Kojima K, Kondo T, Narabayashi H, Rausch D, Riederer P, Jellinger K, Nagatsu T (1988). Homospecific activity (activity per enzyme protein) of tyrosine hydroxylase increases in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.*, 72: 77– 81;

Muller CE, Scior T (1993). Adenosine receptors and their modulators. *Pharm Acta Helv.*, 68: 77–111.

Mukhida K, Baker KA, Sadi D, Mendez I (2001). Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J Neurosci.*, 21(10):3521-30.

Novelli A, Rely JA, Lysko PG, Henneberry RC (1988). Glutamate becomes neurotoxic via the NMDA receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.*, 451:205–212.

Olney JW (1990). Excitotoxicity: an overview. *Can Dis Wkly Rep* 16 Suppl 1E, 47–57; discussion 57–48.

Onn SP, West AR, Grace AA (2000). Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions. *Trends Neurosci.*, 23: S48–S56.

Parkinson FE, Xiong W, Zamzow CR (2005). Astrocytes and neurons: different roles in regulating adenosine levels. *Neurol Res.*, 27: 153–160.

Paz MM, 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 Lett.*, 355: 205–208

Peris J, Dunwiddie TV (1985). Inhibitory neuromodulation of release of amino acid neurotransmitters. *Alcohol Drug. Res.*, 6 (4): 253–264.

Porciuncula LO, Vinade L, Wofchuk S, Souza DO (2002). Guanine based purines inhibit [³H]glutamate and [³H]AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats. *Brain Res.*, 928: 106–112.

Purves D. *Neurociência*. 2a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Ramos M, Souza DO, Ramirez G (1997). Specific binding of [3H] GppNHp to extracellular membrane receptors in chick cerebellum: possible involvement of kainic acid receptors. *FEBS Lett.*, 406: 114–118.

Rathbone MP, DeForge S, DeLuca B, Gabel B, Laurensen C, Middlemiss P, Parkinson S (1992a). Purinergic stimulation of cell division and differentiation: mechanisms and pharmacological implications. *Med. Hypotheses*, 37: 213–219.

Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysberg JW, DeForge S, Costello P, Del Maestro RF (1992b). Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 28A: 529–536.

Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbergs JW, Andrew C, Herma MAR, Ree JK et al., (1999). Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol.*, 59: 663–690.

Richardson PJ, Kase H, Jenner PG (1997). Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.*, 18(9):338-44.

Riepe MW, Hori N, Ludolph AC, Carpenter DO (1995). Failure of neuronal ion exchange, not potentiated excitation, causes excitotoxicity after inhibition of oxidative phosphorylation. *Neuroscience*, 64: 91–97.

Rodriguez MC, Obeso JA, Olanow CW (1998). Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann. Neurol.*, 44: S175–188.

Roesler R, Vianna MR, Lara DR, Izquierdo I, Schmidt AP, Souza DO (2000). Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. *NeuroReport.*, 11: 2537–2540

Roettger V, Lipton P (1996). Mechanism of glutamate release from rat hippocampal slices during in vitro ischemia. *Neuroscience*, 75: 677–685.

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. *Neurochem Res* 22, 181–187.

Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB (1992). Adenosine and brain ischemia. *Cerebrov. Brain Metab. Rev.*, 4: 346–369.

Ruiz A, Matute C, Alberdi E (2009). Endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and IP₃ receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell Calcium*, doi:10.1016/j.ceca.2009.08.005

Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferré S (2007). Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol.*, 83(5):277-92.

Schmidt AP, Lara DR, Maraschin JF, Perla AS, Souza DO (2000). Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.*, 864: 40–43.

Schmidt AP, Ávila TT, Souza DO (2005). Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. *Neurochem Res.*,30: 69–73.

Segovia G, Porrás A, Del Arco A, Mora F (2001). Glutamatergic neurotransmission in aging: A critical perspective. *Mech. Ageing Dev.*, 122:1–29.

Silvestrin RB, de Oliveira LF, Batassini C, Oliveira A, Souza TM (2009). The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods.*, 177(2):317-21.

Soares FA, Schmidt AP, Farina M, Frizzo ME, Tavares RG, LV Portela et al. (2004). Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Res.*, 1005: 182–186.

Souza DO, Ramirez G (1991). Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *J Mol Neurosci.*, 3: 39–45.

Stone TW (2001). Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol.*, 64: 185–218.

Stoof JC, Winogrodzka A, van Muiswinkel FL, Wolters EC, Voorn P, Groenewegen HJ, Booij J, Drukarch B (1999). Leads for the development of neuroprotective treatment in Parkinson's disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. *Eur J Pharmacol.*, 375(1-3):75-86. Review.

Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB (1999). Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol.*, 59(4):355-96. Review.

Tasca CI, Wofchuk ST, Souza DO, Ramirez G, Rodnight R (1995). Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. *Neuro. Report.*, 6: 249–252.

Tasca CI, Cardoso LF, Martini LH, Ramirez G, Souza DO (1998). Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptor activation. *Neurochem. Res.*, 23: 183–188.

Tasca CI & Souza DO (2000). Interaction of adenosine and guanine derivatives in the rat hippocampus: effects on cyclic AMP levels and on the binding of adenosine analogues and GMP. *Neurochem Res.*, 25: 181–188.

Tasca CI, Santos TG, Tavares RG, Battastini AM, Rocha JB et al. (2004). Guanine derivatives modulate l-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles. *Neurochem. Int.*, 44: 423–431.

Thomazi AP, Godinho GF, Rodrigues JM, Schwalm FD, Frizzo ME, Moriguchi E et al. (2004). Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech. Ageing Dev.*, 125: 475–481.

Traversa U, Bombi G, Di Iorio P, Ciccarelli R, Werstiuk ES, Rathbone MP (2002). Specific [³H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *Br J Pharmacol.*, 135: 969–976.

Trotti D, Rizzini BL, Rossi D, Haugeto, Racagni G, Anbolt NC, Volterra A (1997). Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur. J. Neurosci.*, 9: 1236–1243.

Vinadé ER, Schmidt AP, Frizzo ME, Izquierdo I, Elisabetsky E, Souza DO (2003). Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Res.*, 977(1):97-102.

Yuan H, Zheng JC, Liu P, Zhang SF, Xu JY, Bai LM (2007). Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. *Neurosci Bull.*, 23(2):125-30. Review.

Watkins, J. C. and Evans, R. H. (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21: 165–204.

Wojcik WJ, Neff NH (1983). Adenosine A1 receptors are associated with cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, 41:759–763.

Zeevalk GD, Nicklas WJ (1990). Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257: 870–878.