

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**DERIVADOS DA GUANINA E A MODULAÇÃO DA
CAPTAÇÃO ASTROCITÁRIA DE GLUTAMATO**

Félix Alexandre Antunes Soares

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

2003

"...o Brasil votou para mudar.

A esperança venceu o medo..."

Luiz Inácio Lula da Silva

" Isto nós sabemos.

Todas as coisas estão ligadas

Como o sangue

Que une uma família...

O Homem não tece a teia da
vida;

Ele é apenas um fio.

Tudo o que faz à teia,

Ele faz a si mesmo."

*Ted Perry - Inspirado no chefe
Seattle*

"No meio de tanta gente eu

encontrei você

Entre Tanta gente chata sem

nenhuma graça

Você veio

E Eu que pensava que não ia me

apaixonar

Nunca mais na vida"

Marisa Monte & Arnaldo Antunes

"Todo fazer é um conhecer e todo conhecer é um fazer."

Maturana & Varela

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. “companheiro” Diogo Onofre Gomes de Souza, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, pela pessoa magnífica que é e ainda por acreditar que um outro mundo é possível.

Aos Professores Doutores João Batista Teixeira da Rocha e Cristina Wayne Nogueira, por terem me aberto as portas de seus laboratórios nos idos de 1997 e mostrado o magnífico mundo da pesquisa em Bioquímica.

Aos Professores Doutores Marcos Frizzo e Marcelo Farina e a André Schmidt, por serem mais que amigos de *trabalho*, por se tornarem irmãos de caminhada.

A todos os amigos que construí nos Lab 26, 27 e 28. A jornada apenas começou ainda temos muito que pesquisar.

Aos Pucnianos Dr. Diogo Lara e Dr. “Roska” pelos inestimáveis auxílios no desenrolar de meu trabalho.

A todos os professores e funcionários deste curso de pós-graduação, que em conjunto constroem a excelência deste curso.

A CAPES por repassar a verba dos impostos dos brasileiros para pesquisa e para bolsas de pós-graduandos como eu.

Aos trabalhadores incansáveis do CEPEA.

A todos os meus Familiares que distantes ou próximos construíram um pouco desse ser que fez essa dissertação.

Aos meus irmãos, Franco, Danielle e Fabrício, por serem a expressão máxima da palavra irmandade.

A meu Pai e minha Mãe que me deram a vida, cuidaram, educaram, financiaram e acham que não fizeram nada demais. Obrigado por me darem a sabedoria de que a vida vale a pena ser vivida quando temos no que acreditar.

A Vanessa minha amiga, companheira, namorada, confidente, professora, psicóloga, amante, psicanalista, dona, psiquiatra, vida, esposa, mulher. Obrigado pela paciência de ter seu marido afastado do seu convívio e ainda sim amar ele cada dia mais. EU TE AMO VIU!

RESUMO

O nucleosídeo Guanosina (GUO) já foi descrito como capaz de estimular a captação de glutamato em cultura de astrócitos. A proposta deste estudo foi determinar o efeito e a especificidade das purinas, derivadas da guanina ou da adenina, na captação de glutamato e GABA em cultura de astrócitos. A estimulação da captação de glutamato foi observada quando usamos GUO, GMP e GTP. Quando utilizamos os derivados de Guanina simultaneamente não observamos efeito aditivo. Nós também investigamos se interconversões entre as purinas derivadas da guanina têm influência no efeito observado. O efeito do GTP foi preliminarmente descartado já que seu análogo GMP-PNP não estimulou a captação de glutamato. Quando utilizamos um inibidor da ecto-5'-nucleotidase, o efeito do GMP na captação de glutamato desaparece e não houve interferência no efeito da GUO. Assim, esses resultados sugerem que a GUO é o derivado da guanina responsável pelo efeito na captação de glutamato. Ao mesmo tempo, os derivados da adenina não são capazes de estimular a captação de glutamato. Além disso, a captação de GABA não foi afetada pela guanosina. Dessa forma, nossos resultados indicam uma especificidade na interação entre GUO e a captação astrocitária de glutamato.

ABREVIATURAS

SNC	Sistema nervoso central
iGluR	Receptores ionotrópicos para glutamato
NMDA	N-metil-D-aspartato
AMPA	α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico
KA	ácido caínico
MK-801	(+)-5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina
mGluR	Receptores metabotrópicos para glutamato
1S,3R-ACPD	1S,3R-aminociclopentano-1,3dicarboxilato
L-AP4	L-2-amino-4-fosfonobutirato
GLAST	Transportador de glutamato e aspartato em ratos
EAAT 1- 5	Transportador de aminoácidos excitatórios 1 até 5
GLT-1	Transportador de glutamato em ratos
GTP	Guanosina trifosfato
GDP	Guanosina difosfato
GMP	Guanosina monofosfato
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
AMP _c	Adenosina monofosfato cíclico
GABA	Ácido gama-aminobutírico

ÍNDICE GERAL

1 – Introdução	2
2 – Objetivos	11
3 – Resultados	12
4 – Conclusões	30
6 – Referências	31

1 – INTRODUÇÃO

O Sistema glutamatérgico.

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, estando presente na maioria das sinapses centrais (Ozawa et al., 1998). O glutamato atua na mais diferentes funções cerebrais, tais como aprendizado, memória, cognição e na formação de redes neurais durante o desenvolvimento e o envelhecimento (Collingridge & Lester, 1989; Izquierdo & Medina 1997; Ozawa et al., 1998; Castellano et al., 2001, Segovia et al., 2001). Além de desempenhar um papel fundamental em vários processos fisiológicos, em algumas situações patológicas existe uma hiper ativação do sistema glutamatérgico que leva à toxicidade celular, chamada de excitotoxicidade (Lipton e Rosemberg, 1994). Lucas e Newhouse em 1957 realizaram os primeiros estudos sobre efeitos tóxicos do glutamato administrando sistemicamente este aminoácido em camundongos, demonstrando danos na retina.

Para realizar as suas ações no SNC, o glutamato se une a uma multiplicidade de proteínas que chamamos receptores. Estes receptores estão divididos em duas classes: ionotrópicos e metabotrópicos (Conn & Pin 1997; Ozawa et al., 1998). Os receptores ionotrópicos (iGluR) são canais que permitem a passagem de um íon específico quando ativados (Ozawa et al., 1998) e foram subdivididos em N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico (AMPA) e ácido caínico (KA), de acordo com

a sensibilidade a agonistas. Os receptores NMDA são canais com grande permeabilidade a Ca^{2+} , baixa permeabilidade a Na^+ e K^+ , e uma cinética da abertura lenta. O complexo do receptor NMDA apresenta diversos sítios de modulação da abertura do canal: um sítio para glutamato ou NMDA, um sítio para o co-agonista glicina (insensível à estricnina), um sítio dentro do canal sensível à união de bloqueadores (MK-801, quetamina), um sítio para poliaminas e sítios para zinco e magnésio (Ozawa et al., 1998). Quando a membrana neuronal está em repouso, o canal do receptor NMDA encontra-se bloqueado por Mg^{2+} . A ativação do receptor NMDA e o influxo de íons só ocorrem se a membrana neuronal for previamente despolarizada, por exemplo, através dos receptores AMPA, permitindo a saída do Mg^{2+} do canal. Os receptores AMPA são canais com alta permeabilidade a Na^+ e K^+ , com menor permeabilidade a Ca^{2+} , enquanto os receptores do tipo KA são bastante permeáveis a Ca^{2+} (Cotman et al., 1995). Os receptores iGluR do tipo AMPA e KA são responsáveis pela ativação rápida da neurotransmissão excitatória no SNC. Os receptores metabotrópicos (mGluR) pertencem a uma família de receptores que interagem com proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas G), que modulam a produção de efetores intracelulares que por sua vez ativam e/ou inibem diversos eventos celulares (Conn & Pin, 1997; Ozawa et al., 1998). Os receptores mGluR podem ser ativados por ibotenato, quisqualato, 1S,3R-ACPD (1S,3R-aminociclopentano-1,3dicarboxilato) e L-AP4 (L-2-amino-4-fosfonobutirato), e estão subdivididos em três subgrupos de acordo com a

semelhança na sua seqüência de aminoácidos (Pin & Duvoisin, 1995) e sua sensibilidade a agonistas e respostas celulares envolvidas.

O armazenamento de glutamato no sistema nervoso central é realizado em vesículas que se encontram nos terminais pré-sinápticos. Quando ocorre a despolarização dos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos, o glutamato que se encontra nas vesículas é liberado para a fenda sináptica, por exocitose dependente da concentração de cálcio citosólico, (Nicholls & Atwell, 1990, Vesce et al., 1999). O glutamato liberado interage com seus receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos que estão localizados nas membranas pré- e pós-sinápticas e também nas membranas gliais (Gallo & Ghiani, 2000; Scannevin & Huganir, 2000). Após a promoção de influxo iônico nestas células e a modulação da produção de segundos mensageiros, o glutamato é removido da fenda sináptica por sistemas de transporte dependentes de sódio, localizados principalmente nas células gliais (Robinson & Downd, 1997; Anderson & Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Amara & Fontana, 2002). Os transportadores de glutamato são os seguintes: GLAST/EAAT1, GLT-1/EAAT2 (transportadores gliais), EAAC1/EAAT3 (transportador neuronal), EAAT4 (transportador predominante em células de Purkinje no cerebelo) e EAAT5 (transportador encontrado na retina) (Kanai & Hediger, 1992; Pines et al., 1992; Storck et al., 1992; Fairman et al., 1995; Arriza et al., 1997; Danbolt, 2001). Devido à ausência de sistemas enzimáticos para metabolizarem o glutamato na fenda sináptica, os sistemas de captação de glutamato são responsáveis pela inativação da ação glutamatérgica. Após a captação astrocitária, o glutamato é transformado pela

glutamina sintetase em glutamina. A glutamina é transportada para os neurônios, convertida pela glutaminase a glutamato, que pode ser captado pelas vesículas sinápticas e liberado novamente, recomeçando o processo (Anderson e Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Amara & Fontana, 2002).

Olney e colaboradores (1970, 1978) observaram que altas doses de glutamato e seus agonistas provocavam dano e até mesmo a morte celular no SNC. Desta forma introduziram na literatura o termo excitotoxicidade para a morte neuronal provocada pela estimulação excessiva provocada pelo glutamato nos seus receptores. A estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos é um dos principais eventos para a neurotoxicidade provocada pelo glutamato. O papel do glutamato como mediador de excitotoxicidade parece estar relacionado ao aumento de Ca^{2+} intracelular causado pela estimulação excessiva de seus receptores ionotrópicos e metabotrópicos e a subsequente perda da homeostase do Ca^{2+} intracelular (Meldrum, 1994, Sattler & Tymianski, 2000). O aumento nos níveis de Ca^{2+} leva ao desencadeamento de uma cascata de eventos intracelulares que incluem um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, maior influxo de cálcio e sódio e aumento do consumo de energia, culminando na morte neuronal (Dawson et al., 1991; Dubinsky & Rothman, 1991; Lei et al., 1992; Lafon-Cazal et al., 1993; Lipton & Rosenberg, 1994; Ozawa et al., 1998, Sattler & Tymianski, 2000). Entretanto, o comprometimento dos transportadores de glutamato gliais GLAST e GLT-1 têm merecido destaque, desde quando experimentos com cultura de células neurais demonstraram que a morte neuronal por glutamato era atenuada quando neurônios eram co-

cultivados com astrócitos (Rosenberg et al., 1992). Atualmente, está bem demonstrado que os transportadores de glutamato, localizados nas células gliais, são os responsáveis pela manutenção da homeostase celular por manterem baixos os níveis extracelulares de glutamato (Anderson & Swanson, 2000; Tanaka, 2000; Gegelashvili et al., 2001; Danbolt, 2001, Amara & Fontana, 2002). Em estudos em que os transportadores GLT-1 e GLAST não são expressos, foi observada uma maior susceptibilidade à epilepsia e neurodegeneração nos camundongos testados (Tanaka et al., 1997; Watase et al., 1998). A não expressão dos transportadores GLAST ou GLT-1 produz uma elevação dos níveis extracelulares de glutamato e neurodegeneração característica de excitotoxicidade (Rothstein et al., 1996). Com todas essas evidências, tem-se estabelecido que os transportadores gliais são de fato os responsáveis pela manutenção dos baixos níveis extracelulares de glutamato e por prevenir uma neurotoxicidade que possa ser causada por este aminoácido, sendo que ao transportador neuronal caberia a função de carrear o glutamato para fins de modulação sináptica e metabolismo (Amara & Fontana, 2002). Acerca de patologias no SNC, as mortes celulares observadas em isquemia cerebral, esclerose lateral amiotrófica, Doença de Alzheimer, trauma cerebral, epilepsia, intoxicações por metais pesados, etc, foram relacionadas a comprometimentos nos transportadores gliais GLAST e GLT-1 (Rothstein et al., 1992; 1995; Tanaka, 1997; Lipton, 1999; Aschner et al., 1995; 2000; Honig et al., 2000; Danbolt, 2001; Maragakis & Rothstein, 2001). Astrócitos em cultura podem expressar ambos transportadores sendo que a captação de glutamato por estas

células pode ser modulada por fatores de crescimento, pelo próprio glutamato, derivados da guanina e também por algumas neurotoxinas (Swanson et al., 1997; Leal, et al., 2000; Danbolt, 2001; Frizzo et al., 2001, 2002; Gegelashvili et al., 2001; Tavares, et al., 2002; Emanuelli et al., 2003). Dessa forma o estudo de um mecanismo de modulação pode ser a chave para prevenção da excitotoxicidade provocada pelo glutamato.

Derivados da guanina e o glutamato.

Os nucleotídeos da guanina são classicamente associados ao sistema de transmissão de sinal transmembrana via proteínas G (Gudermann et al., 1997). A união de neurotransmissores ou agonistas aos seus receptores metabotrópicos, leva à formação de um complexo ativo proteína G/GTP. Quando ativadas por GTP, as proteínas G exercem dois efeitos simultâneos: modulam a atividade de efetores e diminuem a afinidade do agonista unido ao receptor (Morris & Malbon, 1999). Adenilato ciclase, fosfolipase C, canais iônicos estão entre os efetores modulados por neurotransmissores, através de sistemas que operam com proteínas G (Gudermann et al., 1997). No SNC, esta forma de transdução do sinal celular está associada a subtipos de praticamente todos os receptores estudados: dopaminérgicos, glutamatérgicos, serotoninérgicos, purinérgicos, gabaérgicos, entre outros (Morris & Malbon, 1999). Estudos sobre a especificidade dos derivados da guanina mostram que os outros nucleotídeos e derivados da adenina não interagem com proteínas G (Gudermann et al., 1997).

Além da ação intracelular em proteínas G, existem várias evidências que indicam que os derivados da guanina modulam o sistema glutamatérgico atuando do lado externo da membrana plasmática celular, sem o envolvimento de proteínas G.

Estudos sobre os efeitos dos derivados da guanina sobre a união do glutamato e agonistas foram feitos em preparações de membrana plasmática e demonstraram que GTP, GDP e GMP, em alguns casos GMP cíclico, inibiram a união de glutamato, KA, L-AP4 e NMDA a seus receptores (Monahan et al., 1988; Baron et al., 1989; Yoneda et al., 1990; Souza & Ramirez, 1991; Gorodinsky et al., 1993; Migani et al., 1997; Ramos et al., 1997; Rubin et al., 1997A). Esses estudos foram realizados em preparações de membrana onde estavam presentes componentes pré e pós sinápticos bem como células gliais, não sendo possível determinar em quais componentes da sinapse os derivados da guanina estariam inibindo a união de glutamato e seus agonistas. Os derivados da guanina também inibem a união de KA mesmo em condições onde a participação da proteína G pode ser minimizada (Souza & Ramirez, 1991; Barnes et al., 1993; Paz et al., 1994) e ainda inibem a união de antagonistas de glutamato, um efeito que não é modulado pelas proteínas G (Monahan et al., 1988; Baron et al., 1989; Barnes et al., 1993).

Os derivados da guanina também bloqueiam respostas celulares à ação de glutamato ou seus agonistas tais como: inibem a quimioluminescência induzida por glutamato (Regner et al., 1998), bloqueiam o influxo de cálcio induzido por NMDA em retinas de pintos (Burgos et al., 2000), diminuem a

fosforilação de GFAP e o aumento de AMP_C induzido por glutamato em preparações em que nucleotídeos da guanina não penetram no espaço intracelular e proteínas G não interagem diretamente com moléculas pelo lado externo da membrana (Tasca et al., 1995; Tasca & Souza, 2000). No entanto, os efeitos dos nucleotídeos da guanina sobre os receptores glutamatérgicos não são particularmente potentes, ocorrendo geralmente na faixa de 100 µM a 1 mM (Monahan et al., 1988; Baron et al., 1989; Tasca et al., 1995; 1998; Regner et al., 1998; Burgos et al., 1998). Em estudos comportamentais o GMP é capaz de reverter o efeito facilitatório do glutamato na tarefa de esquiva inibitória (Rubin et al., 1996; 1997B).

O nucleosídeo guanosina tem merecido menos atenção por parte dos pesquisadores em geral e dessa forma tem sido bem menos estudado do que os nucleotídeos da guanina e o derivados da adenina. Mesmo assim, alguns trabalhos importantes vêm sendo realizados no sentido de elucidar o papel da guanosina no SNC. Em culturas 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⁺, cainato e ouabaína elevam a concentração de guanosina e adenosina (Dobolyi et al., 2000). Com relação a efeitos fisiológicos,

a guanosina exerce efeitos tróficos e mitóticos em células neurais, na faixa de concentração de 30 a 300 μM (Rathbone et al., 1999). Esses efeitos parecem ser mediados em parte pela adenosina, já que são atenuados por antagonistas de receptores de adenosina do tipo P1 e pela enzima adenosina deaminase (Ciccarelli et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que a guanosina promove a liberação de adenosina de astrócitos (Ciccarelli et al., 2000). Por outro lado, a própria adenosina não é capaz de mimetizar o efeito da guanosina na sua totalidade e parte do efeito da guanosina não é inibido por antagonistas P1 e pela adenosina deaminase (Rathbone et al., 1999; Ciccarelli et al., 2000). Nosso grupo de pesquisa tem apontado, a partir de vários trabalhos, para um possível papel neuroprotetor dos derivados da guanina. O GMP e guanosina são capazes de prevenir convulsões provocadas pelo ácido quinolínico injetado no ventrículo lateral de cérebro de camundongos (Schmidt et al., 2000; Lara et al., 2001) e o GMP protegeu as células de lesão induzida por ácido quinolínico em estriado de ratos (Malcon et al., 1997). Recentes trabalhos demonstraram que a guanosina quando testada na tarefa de esQUIVA inibitória apresentou efeitos amnésicos semelhantes aos antagonistas glutamatérgicos (Roesler et al., 2000), bem como protegeu fatias corticais dos efeitos deletérios da privação de glicose e oxigênio e estimulou a captação de glutamato em culturas de astrócitos (Frizzo et al., 2001; 2002).

Recentemente, foram descritos sítios de união específicos para guanosina em membranas plasmáticas de cérebro de ratos (Traversa et al., 2002).

2 – OBJETIVOS

Determinar os efeitos neuromoduladores dos derivados da guanina na captação de glutamato por astrócitos, bem como a existência ou não de uma especificidade para a ação dos derivados da guanina.

Dessa forma, nesta dissertação apresentam-se resultados e discussão na forma de artigo no próximo segmento.

3 – RESULTADOS

EXTRACELLULAR CONVERSION OF GUANINE-BASED PURINES TO GUANOSINE SPECIFICALLY ENHANCES ASTROCYTE GLUTAMATE UPTAKE

Marcos Emílio dos Santos Frizzo^{1,2}, Félix Alexandre Antunes Soares¹, Leonara Patrícia Dall'Onder¹, Diogo Rizzato Lara³, Raymond A. Swanson⁴, Diogo Onofre Souza¹

1. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2. Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

3. Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

4. Department of Neurology, University of California and Veterans Affairs Medical Center, San Francisco, CA, USA.

Aceito para publicação *Brain Research*. In press

Abstract

Guanosine (GUO) has been shown to stimulate glutamate uptake in primary astrocyte cultures. The purpose of this study was to determine the effect and specificity of guanine- or adenine-based purines on glutamate and GABA uptake in cultured astrocytes. Stimulatory effect on glutamate uptake was observed with GUO, GMP or GTP. Simultaneous exposure with these guanine-based purines did not show an additive effect. We also investigated a possible interconversion of guanine-based purines during incubation time. Action by GTP was excluded since the hydrolysis resistant GTP analog, GMP-PNP did not stimulate glutamate uptake. Addition of an ecto-5'-nucleotidase inhibitor abolished GMP-stimulatory effect on glutamate uptake, without affecting GUO action. Taken together, these results suggest that GUO is the guanine-based purines responsible for glutamate uptake activation. In addition, the stimulatory effect on glutamate uptake was not observed with adenine-based purines. Moreover, GABA uptake was not activated by GUO. These results point to specificity in the interaction between GUO and the astrocyte glutamate uptake system.

Theme: Neurotransmitters, modulators, transporters, and receptors

Topic: Uptake and transporters

Keywords: Adenosine; Astrocyte; Cell culture; Glutamate uptake; Guanosine; Nucleotides

1. Introduction

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system [16], but overstimulation of the glutamatergic system is implicated in the pathogenesis of various acute and chronic brain diseases [12,16]. Hence, modulation of extracellular glutamate determines its physiological or excitotoxic actions. Astrocytic sodium-dependent glutamate transport plays a major role in maintaining extracellular glutamate concentrations below neurotoxic levels [1,5]. It has been recently shown that glutamate uptake can be stimulated by glutamate and analogs [1,7,15] and by synthetic neuroprotective compounds [2,23].

Likewise, we have recently shown that the nucleoside GUO enhances glutamate uptake by rat astrocyte cultures in a concentration-dependent manner [8]. In rat brain slices exposed to GUO, glutamate uptake was significantly stimulated at high (100 μM) but not low (1 μM) concentrations of glutamate [9]. *In vivo*, systemic administration of GUO (and GMP) prevented seizures elicited by the neurotoxins quinolic acid and alpha-dendrotoxin, which overstimulate the glutamatergic system [11,21], further suggesting a neuromodulatory role of GUO on the glutamatergic system.

In the present study we investigated the effect of guanine- and adenine-based purines on astrocytic glutamate and GABA uptake and we found a specific stimulatory effect of GUO on glutamate uptake by rat astrocyte cultures.

2. Materials and methods

Fetal bovine serum (FBS) certified (USA) and Eagle's minimal essential media (MEM Earle's salts) were from Gibco. Other chemicals were purchased from SIGMA (St. Louis, MO) unless otherwise mentioned. Primary astrocyte cultures were prepared as described previously [8] from the cortices of 1-day-old Wistar rats. The plating medium was MEM with 10% FBS plus 10ng/mL EGF (Gibco). Astrocyte cultures were maintained in an incubator at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. When confluence was achieved, the medium was replaced by MEM 5% FBS and 10 microM cytosine arabinoside (Ara-C) was added for 48h to eliminate mitotic cells. The subsequent medium changes were performed in the above medium without Ara-C. Cultures were used at 9-12 days *in vitro* (DIV) with astrocytes showing a confluent monolayer, being >95% of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive cells. The culture media was replaced with fresh media on the evening before glutamate uptake assays.

Uptake assays were initiated by rinsing and pre-incubating the cultures for 15 min in Hank's balanced salt solution (HBSS), pH 7.2 in an incubator at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Different concentrations of guanine- or adenine-based purines were added 6 min before and maintained in the medium during the uptake assay. When used, the ecto-5'-nucleotidase inhibitor α - β methyleneadenosine 5'-diphosphate (AOPCP) was administered at 100 microM during pre-incubation time, 5 min before GMP addition and maintained during the uptake. The uptake was assessed by adding 0.33

microCi/mL L-[2,3-³H] glutamate (Amersham-45Ci/mmol) with 100 microM unlabeled glutamate or 0.67 microCi/mL 4-Amino-n-[2,3-³H] butyric acid – GABA (Amersham-89Ci/mmol) with 1 microM unlabeled GABA to the culture wells. Glutamate incubation was stopped after 7 min (or after variable time for GABA uptake) by two ice-cold washes with 1 mL HBSS followed by immediate lysis during 15 min (0.1N NaOH). Glutamate uptake attained the steady state after 10 min (data not shown) and the experiments were performed in the linear range of time curve (7 min). Aliquots of lysates were taken for scintillation counting. Sodium-independent glutamate uptake of 100 microM glutamate (<2%) was determined by using choline chloride instead of sodium chloride, being subtracted from the total uptake to obtain the specific uptake. The nonspecific uptake of 1 microM GABA (<20%) was determined by incubation at 0-4°C [3], being subtracted from the total uptake to obtain the specific uptake. Protein concentration was measured by the method of Lowry et al. [13] using bovine serum albumin as standard. Experiments were repeated at least three times and each experiment was performed in quadruplicate.

HPLC analyses of purines were performed with aliquots obtained from incubation medium after assay. Separation was carried out with a reverse phase column (Supelcosil LC-18, 25 cm x 4.6 mm, Supelco) in a Shimadzu Instruments liquid chromatograph (100 microL loop valve injection). The elution was carried out applying a linear gradient from 100% of solvent A (60 mM KH₂PO₄ and 5 mM of tetrabutylammonium phosphate, pH 6.0) to 100% of solvent B (70% 100 mM KH₂PO₄ and 5 mM of tetrabutylammonium phosphate, pH 6.0, plus 30%

acetonitrile) over a 40 min period (flow rate at 1.2 mL/min). The amounts of purines were measured on the basis of the absorption at 254 nm. The retention time of standards was used as an identification and quantification parameter.

The statistical analysis was calculated by means of ANOVA for multiple groups comparison, followed by the Duncan test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

In agreement with our previous results [8], GUO stimulated glutamate uptake by primary astrocyte cultures from 1.77 ± 0.12 nmol/mg/min to 2.43 ± 0.07 and 2.56 ± 0.11 at 100 and 300 microM, respectively ($p < 0.01$) (Fig. 1). To determine the specificity of GUO, we studied the effect of other guanine-based purines, GMP and GTP, as well as adenine-based purines on this uptake activity. An equivalent increase was achieved with 100 or 300 microM GMP (2.42 ± 0.12 and 2.40 ± 0.27 , respectively) and 100 or 300 microM GTP, (2.35 ± 0.04 and 2.33 ± 0.04 , respectively); additionally, the combination of 100 microM GUO, GMP and GTP enhanced glutamate uptake up to 2.71 ± 0.24 , without a significant additive effect compared to each compound alone (Fig.1). However, 100 microM GMP-PNP (Sigma), a poor hydrolysable GTP analogue, was ineffective (Fig.1).

Guanine-based purines levels in incubation medium were evaluated by HPLC to verify their possible metabolism by cell cultures during the assay (Fig. 2). When 100 microM GTP was added, its levels were reduced, whereas GDP,

GMP and guanosine levels increased (3-, 19-, and 6-fold, respectively) compared to their levels without cells (Fig.2A). In this condition, the final concentration of GMP was 8.9 ± 0.4 microM, GDP was 20.7 ± 0.9 microM, and GUO was 0.8 ± 0.09 microM.

Cultures exposed to 100 microM GMP, produced 3.9 ± 0.2 microM GUO (an increased of 4-fold) (Fig. 2B). When 100 microM GUO was added, its levels were not altered (Fig 2.C).

To test the hypothesis that the effects of GMP was related to their conversion to GUO we added the ecto-5'-nucleotidase inhibitor AOPCP (100 microM) before the addition of 100 microM GMP. In this condition, the GMP hydrolysis was totally abolished (data not shown) and the stimulatory effect on glutamate uptake was not observed (Fig. 3), indicating that the effect of GMP on glutamate uptake resulted from its conversion into GUO. AOPCP *per se* neither affected basal glutamate uptake nor the stimulatory effect of GUO (Fig. 3).

Previous results have shown that astrocytic glutamate uptake stimulation mediated by GUO was independent of adenosine receptor activation [8]. In order to test a possible action of other adenine-based purines on glutamate uptake, we investigated the effect of 100 microM adenosine, AMP, ADP or ATP. As shown in Table 1, glutamate uptake was not affected by adenine-based purines.

Considering that astrocytes in primary culture also take up GABA through a Na^+ -dependent process [10, 22], we tested whether treatment with GUO could also affect GABA uptake. In astrocyte cultures, 100 microM GUO did not affect 1 microM GABA uptake for 3, 10 or 30 min (Fig.4).

4. Discussion

Investigating the effect of guanine-based purines on glutamate uptake, we found a stimulatory effect with GUO, GMP and GTP, but not with the poor hydrolysable GTP analog, GMP-PNP. The stimulatory effect observed with simultaneous addition of GUO, GMP and GTP was not additive, suggesting a common mechanism for all guanine-based purines tested. The extensive hydrolysis of guanine nucleotides during incubation along with the inhibition of their stimulatory effect on glutamate uptake by the ecto-5'-nucleotidase inhibitor AOPCP strongly indicates that GUO is the common mediator of this effect. Moreover, adenine-based purines had no effect on glutamate uptake and GUO had no effect on GABA uptake, suggesting a specific effect of GUO towards glutamate uptake by astrocytes. Considering that GABA uptake is also sodium dependent, this could indicate that the GUO stimulatory effect probably did not involve mechanisms related to the increase of sodium gradient.

This specificity towards the glutamatergic system is consistent with previous behavioral findings, where GUO administered intraperitoneally [21] or orally [11] was anticonvulsant against overstimulation of the glutamatergic system by quinolinic acid and alpha-dendrotoxin, but not against the GABA-A antagonist picrotoxin [21]. Similarly, the effect of GUO but not adenosine on glutamate uptake is in line with previous studies where the effect of GUO on glutamate uptake [8] and inhibitory avoidance memory [19] were not antagonized by adenosine receptor antagonists, although it has been reported that GUO also induces adenosine release [18]. Finally, the present findings suggest that the role

of GUO in certain *in vivo* and *in vitro* effects caused by administration of guanine nucleotides, such as the anticonvulsant and neuroprotective effects of GMP [14,21] cannot be ruled out. Importantly, a specific and high-affinity ($K_d \sim 200 \text{ nM}$) binding site for GUO was recently characterized in a membrane preparation from rat brain [24]. The effects of low concentrations of GUO (1 μM) on glutamate uptake by astrocyte cultures even in the presence of dipyridamole [8], which blocks GUO cell inflow through nucleoside transporters, could indicate that this binding site is located on the outside of the astrocyte membranes.

The stimulatory effect of GUO on glutamate uptake is of potential pathophysiological relevance, since there are *in vitro* [4] and *in vivo* [6, 25] situations where extracellular glutamate elevations are accompanied by an increase in GUO levels. This increased release of GUO can be coupled to the energy status of the cell. Intracellular basal levels of GUO and adenosine in neural cells are in the nanomolar range, being much higher for ATP (3 mM) and GTP (300 μM) [4]. Similarly to ATP, GTP levels are maintained during normal energy metabolism. In hypoxic conditions, relatively large increases in nucleosides concentration (e.g. ten-fold) are produced from minimal decreases in ATP and GTP concentration (e.g. 0.1 to 1%). Since equilibrate nucleoside transporters mediate exchange between intracellular and extracellular compartments, the release of biologically relevant amounts of both GUO and adenosine may occur in some pathological conditions. In a concerted manner, these nucleosides can decrease glutamate levels both by inhibiting further glutamate release in the case of adenosine [17,20] and by accelerating

glutamate removal by astrocytes in the case of GUO [8]. This effect of GUO is probably of particular relevance in excitotoxic situations, since GUO failed to affect astrocytic uptake of low concentrations of glutamate (1 micromM) [9].

In summary, GUO but not other purine nucleotides and nucleosides seems to exert a modulatory action on glutamate uptake, characterizing a site for innovative therapeutic intervention and reinforcing the notion of a metabolically specific purinergic system involving guanine-based purines.

Acknowledgements

This work was supported by financial grants from PRONEX (#41960904) and CNPq.

References

- [1] C.M. Anderson, R.A. Swanson, Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions, *Glia* 32(1) (2000) 1-14.
- [2] S. Asai, H. Zhao, A. Yamashita, T. Jike, T. Kunimatsu, T. Nagata, T. Kohno and K. Ishikawa, Nicergoline enhances glutamate re-uptake and protects against brain damage in rat global brain ischemia, *Eur. J. Pharmacol.* 383 (1999) 267-274.
- [3] A.S. Bender and M.D. Norenberg, Effect of ammonia on GABA uptake and release in cultured astrocytes, *Neurochem. Int.* 36 (2000) 389-395.
- [4] R. Ciccarelli, P. Di Iorio, P. Giuliani, I. D'Alimonte, P. Ballerini, F. Caciagli, M. Rathbone, Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia, *Glia* 25 (1999) 93-98.

- [5] N.C. Danbolt, Glutamate uptake, *Prog. Neurobiol.* 65 (2001) 1-105.
- [6] Á. Dobolyi, A. Reichart, T. Szikra, G. Nyitrai, K.A. Kékesi, G. Juhász, Sustained depolarization induces changes in the extracellular concentrations of purine and pyrimidine nucleosides in the rat thalamus, *Neurochem. Int.* 37 (2000) 71-79.
- [7] S. Duan, C.M. Anderson, B.A. Stein, R.A. Swanson, Glutamate induces rapid up regulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST, *J. Neurosci.* 19 (23) (1999) 10193-10200.
- [8] M.E. S. Frizzo, D.R. Lara, K.C. Dahm, A.S. Prokopiuk, R.A. Swanson, D.O. Souza, Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures, *Neuroreport* 12 (4) (2001) 879-881.
- [9] M.E. S. Frizzo, D.R. Lara, A.S. Prokopiuk, C.R. Vargas, C. G. Salbego, M. Wajner and D.O. Souza, Guanosine Enhances Glutamate Uptake in Brain Cortical Slices at Normal and Excitotoxic Conditions, *Cell. Mol. Neuro.* 22 (3) (2002) 353-363.
- [10] E. Hansson, P. Eriksson and M. Nilsson, Amino acid and monoamine transport in primary astroglial cultures from defined brain regions, *Neurochem. Res.* 10 (1985) 1335-1341.
- [11] D.R. Lara, A.P. Schmidt, M.E. S. Frizzo, J.S. Burgos, G. Ramirez, D.O. Souza, Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents, *Brain Res.* 912(2) (2001) 176-180.
- [12] S.A. Lipton and P.A. Rosenberg, Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders, *N. Engl. J. Med.* 330 (1994) 613-622.
- [13] O.H. Lowry, N.H. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- [14] C. Malcon, M. Achaval, F. Komlos, W. Partata, M. Sauregg, G. Ramirez and D.O. Souza, GMP protects against quinolinic acid-induced

loss of NADPH-diaphorase-positive cells in the rat striatum, *Neurosci. Lett.* 225 (1997) 145-148.

[15] M. Munir, D.M. Correale and M.B. Robinson, Substrate-induced up-regulation of Na⁺-dependent glutamate transport activity, *Neurochem. Int.* 37 (2000) 147-162.

[16] S. Ozawa, H. Kamiya and K. Tsuzuki, Glutamate receptors in the mammalian central nervous system, *Prog. Neurobiol.* 54 (1998) 581-618.

[17] J. Peris and T.V. Dunwiddie, Inhibitory neuromodulation of release of amino acid neurotransmitters, *Alcohol Drug. Res.* 6 (4) (1985-86) 253-64.

[18] M.P. Rathbone, P.J. Middlemiss, J.W. Gysbers, C. Andrew, M.A.R. Herman, J.K. Reed, R. Ciccarelli, P. Di Iorio, F. Caciagli, Trophic effects of purines in neurons and glial cells, *Prog. Neurobiol.* 59 (1999) 663-690.

[19] R. Roesler, M.R. Vianna, D.R. Lara, I. Izquierdo, A.P. Schmidt and D.O. Souza, Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats, *Neuroreport* 11 (11) (2000) 2537-40.

[20] K.A. Rudolphi, P. Schubert, F.E. Parkinson and B.B. Fredholm, Adenosine and brain ischemia, *Cerebrovasc. Brain. Metab. Rev.* 4 (4) (1992) 346-69.

[21] A.P. Schmidt, D.R. Lara, J.F. Maraschin, A.S. Perla, D.O. Souza, Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice, *Brain Res.* 864 (2000) 40-43.

[22] A. Schousboe and N. Westergaard, Transport of neuroactive amino acids in astrocytes. In: H. Kettenmann and B.R. Ransom (eds.) *Neuroglia*. Oxford University Press: New York; 1995, pp. 246-258.

[23] F. Shimada, Y. Shiga, M. Morikawa, H. Kawazura, O. Morikawa, T. Matsuoka, T. Nishizaki, N. Saito, The neuroprotective agent MS-153 stimulates glutamate uptake, *Eur. J. Pharmacol.* 386 (1999) 263-270.

[24] U. Traversa, G. Bombi, P. Di Iorio, R. Ciccarelli, E.S. Werstiuk and M.P. Rathbone, Specific [(3)H]-guanosine binding sites in rat brain membranes, *Br. J. Pharmacol.* 135 (4) (2002) 969-76.

[25] Y. Uemura, J.M. Miller, W.R. Matson, M.F. Beal, Neurochemical analysis of focal ischemia in rats, *Stroke* 22 (1991) 1548-1553.

Table 1. Effect of adenine-based purines on glutamate uptake

Treatment	Glutamate uptake (nmol/mg/min)
Control	1.64 ± 0.22
Ado	1.58 ± 0.32
AMP	1.63 ± 0.40
ADP	1.68 ± 0.37
ATP	1.67 ± 0.37

Values are mean ± S.E.M. of three separate cultures for each condition, performed in quadruplicate. Adenine-based purines were added at 100 microM.

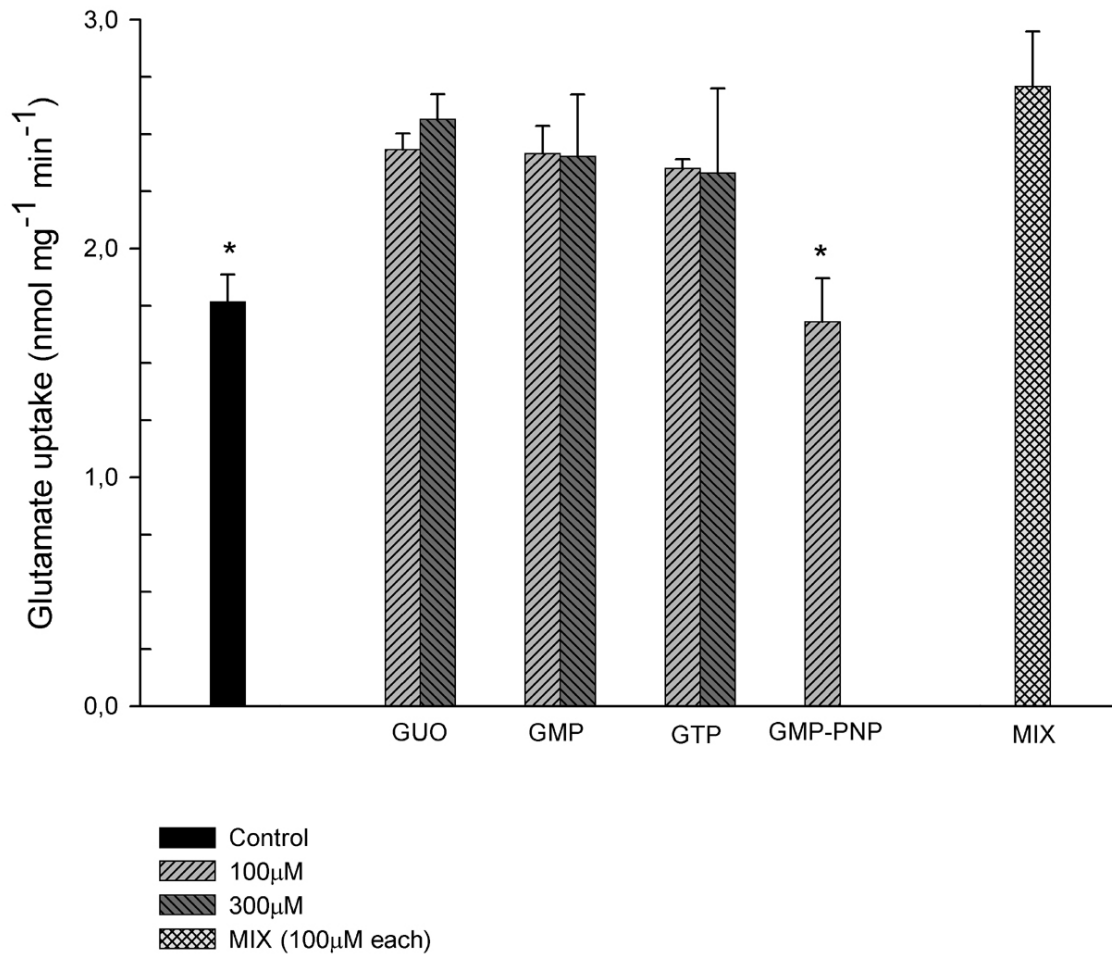


Figure 1 - Guanine-based purines effect on glutamate uptake by astrocyte cultures. Cultures were incubated with 100 or 300 microM of GUO, GMP, GTP or GMP-PNP and with 100 microM of three guanine-based purines together (GUO, GMP, and GTP - MIX). Control sodium-dependent glutamate uptake of 100 microM glutamate was 1.77 ± 0.12 nmol/mg/min. Data are means \pm SEM, $n \geq 3$. * Different from all other groups, at $p < 0.05$.

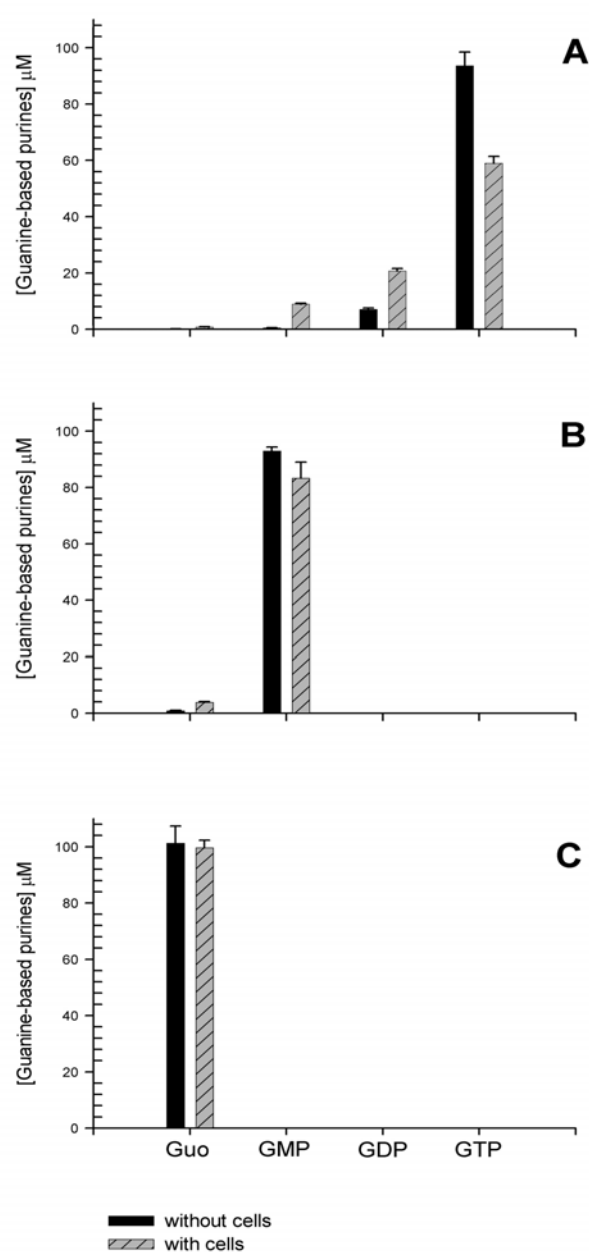


Figure 2 - Guanine-based purines concentrations in the incubation medium. Cultures were incubated with 100 microM GTP (A, n = 5), 100 microM GMP (B, n = 3) or 100 microM GUO (C, n = 6). Guanine-based purines levels were evaluated after 13 min of assay by HPLC analysis. Data are means \pm SEM.

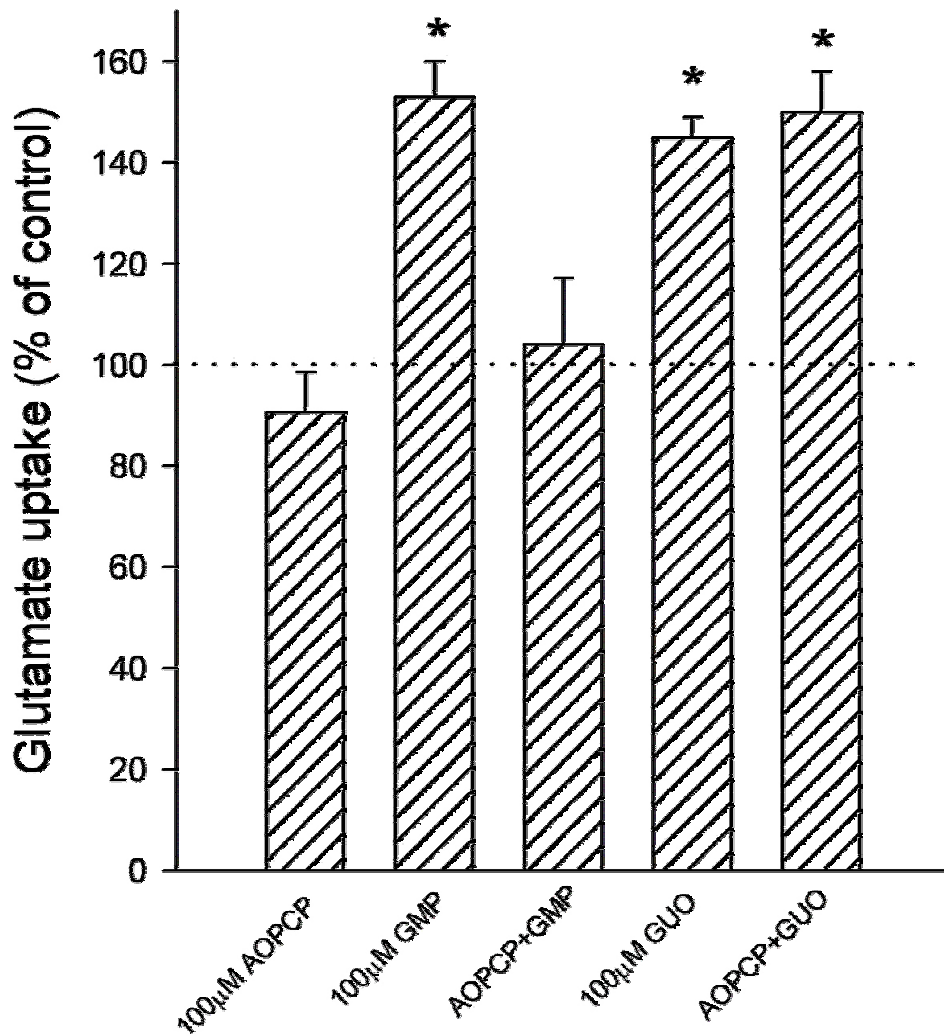


Figure 3 - Effect of AOPCP on GMP and GUO-stimulatory effect on glutamate uptake by astrocyte cultures. Dotted line means control levels (1.79 ± 0.55 nmol/mg/min). Data are means \pm SEM, n = 3. * different from all other groups, at $p < 0.05$.

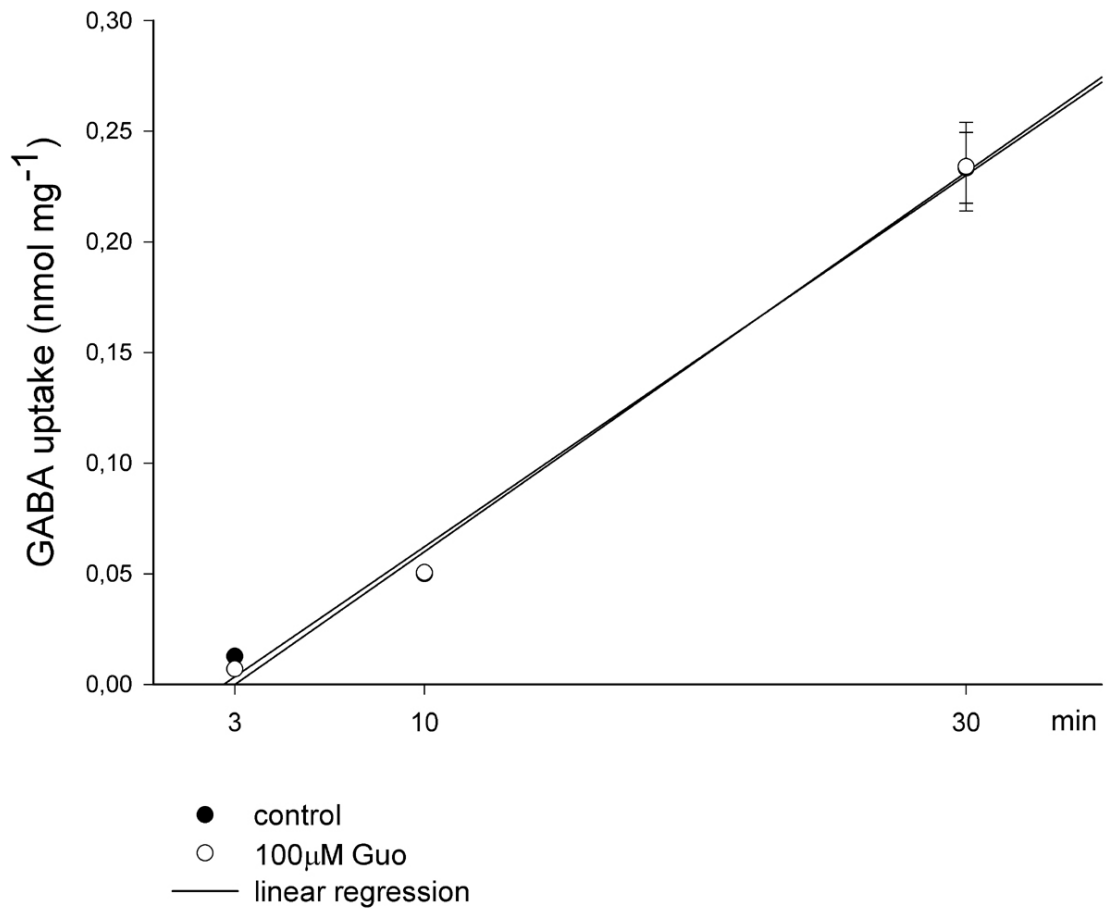


Figure 4 - Effect of GUO on GABA uptake by primary astrocyte cultures. Time course of 1 microM GABA uptake in cultures treated with or without 100 microM GUO. The symbols were partly covered at 10 and 30 minutes. Data are means \pm SEM, n=3.

4 – CONCLUSÕES

Guanosina, GMP e GTP são capazes de estimular a captação de glutamato por astrócitos. Os efeitos não são aditivos, sugerindo um modo único de ação.

Os efeitos cessam quando se impede a conversão dos nucleotídeos a guanosina. Indicando que o real causador do aumento da captação de glutamato em astrócitos seria a guanosina.

Os derivados da adenina utilizados não foram capazes de mimetizar os efeitos produzidos pelos derivados da guanina, demonstrando uma especificidade em relação às purinas quanto ao efeito na estimulação da captação de glutamato.

A guanosina não apresenta efeito na captação de GABA. O que indica que há uma relação específica com o sistema de captação glutamatérgica dos astrócitos.

5 – REFERÊNCIAS

Amara, S. & Fontana, A. (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* 41: 313-318.

Anderson, C. M. & Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions. *Glia* 32: 1-14.

Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P., Amara, S. G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 4155-4160.

Aschner, M., Mullaney, K. J., Fehm, M. N., Wagoner, D. E., Vitarella, D. (1995). Astrocytes as potential modulators of mercuric chloride neurotoxicity. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14: 637-652.

Aschner, M., Yao, C. P., Allen, J. W., Tan, K. H. (2000). Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem. Int.* 37: 199-206.

Barnes, J. M., Murphy, P. A., Kiekahm, D., Henley, J. M. (1993). Interaction of guanine nucleotides with [³H]kainate and 6-[³H] cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione binding in goldfish brain. *J. Neurochem.* 61: 1685-1691.

Baron, B. M., Dudley, M. W., McCarty, 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.

Burgos, J. S., Barat, A., Souza, D. O., Ramirez, G. (1998). Guanine nucleotides protect against toxicity in na ex vivo chick retinal preparation. FEBS Lett. 430: 176-180.

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: 2303-2305S.

Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A. (2001). NMDA receptors and learning and memory processes. Curr. Drug Targets 2: 273-283.

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/hypoglicemia. Glia 25: 93-98.

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

Collingridge, G. L. & Lester, R. A. J. (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. Pharmacol. Rev. 40: 143-210.

Conn, P. J. & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 205-237.

Cotman, C.W., Kahle J.S., Miller, S.E., Ulas, J., Bridges, R.J., (1995). Excitatory aminoacid neurotransmission. In: Psychopharmacology: The fourth generation of progress, Cap. 7, pp 75-85. Eds. Bloom & Kupfer, Raven Press, New York.

Danbolt, N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65: 1-105.

Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E. D., Bredt, D. S., Snyder, S. H. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 6368-6371.

Dobolyi, A., Reichart, A., Szikra, T., Nyitrai, G., Kékesi, K. A., Juhász, G. (2000). Sustained depolarisation induces changes in the intracellular concentrations of purine and pyrimidine nucleosides in the rat thalamus. *Neurochem. Int.* 37: 71-79.

Dubinsky, J. M. & Rothman, S. M. (1991). Intracellular calcium concentrations during "chemical hypoxia" and excitotoxic neuronal injury. *J. Neurosci.* 11: 2545-2551.

Emanuelli, T., Pagel, F. W., Porciúncula, L. O., Souza, D. O. (2003). Effects of 5-aminolevulinic acid on the glutamatergic neurotransmission. *Neurochem. Int.* 42: 115-21.

Fairman, W. A., Vanderberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., Amara, S. G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375: 599-603.

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: 1-3.

Frizzo, M. E. S., Lara, D. R., Prokopiuk, A. S., Vargas, C. R., Salbego, C. 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

Gallo, V. & Ghiani, C. A. (2000). Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 252-258.

Gegelashvili, G., Robinson, M. B., Trotti, D., Rauen, T. (2001). Regulation of glutamate transporters in health and disease. *Prog. Brain Res.* 132: 267-286.

Gorodinsky, A., Paas, Y., Yeichberg, V. I. (1993). A ligand binding study of the interactions of guanine nucleotides with non-NMDA receptors. *Neurochem. Int.* 23: 285-291.

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.

Honig, L. S., Chambliss, D. D., Bigio, E. H., Carroll, S. L., Elliott, J. L. (2000). Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS, but also in AD and controls. *Neurology* 55: 1082-1088.

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. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68: 285-316.

Kanai, Y. & Hediger, M. A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467-471.

Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., Bockaert, J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535-537.

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

Leal, M. B., Emanuelli, T., Porciúncula, L. O., Souza, D. O., Elisabetsky, E. (2001). Ibogaine alters synaptosomal and glial glutamate release and uptake. *Neuroreport* 12: 263-267.

Lei, S. Z., Zhang, D., Abele, A. E., Lipton, S. A. (1992). Blockade of NMDA receptor-mediated mobilization of intracellular Ca^{2+} prevents neurotoxicity. *Brain Res.* 598: 196-202.

Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79: 1431-1568.

Lipton, S. A. & Rosenberg, P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330: 613-622.

Lucas, D. R. & Newhouse, J. P. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* 58: 193-201.

Malcon, C., Achaval, F., Komlos, W., Partata, M., Sauressig, G., 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.

Maragakis, N. J. & Rothstein, J. D. (2001). Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 58: 365-370.

Meldrum, B. S., (1994). The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology*, 44 : S14-23

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.

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.

Morris, A. J. & Malbon, C. G. (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol. Rev.* 79: 1373-1430.

Nicholls, D. G. & Atwell, D. (1990). The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Neurosci.* 21: 53-58.

Olney, J. W. & Ho, O. L. (1970). Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate, or cysteine. *Nature* 227: 609-611.

Olney, J. W. (1978). Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer E. G., Olney, J. W., McGeer, P. L., eds. *Kainic acid as a tool in neurobiology*. New York: Raven Press, 95-121.

Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54: 581-618.

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 Lett.* 355: 295-208.

Pin, J-O. & Duvoisin, R. (1995) Review: Neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol.* 34: 1-26.

Pines, G., Danbolt, N. C., Bjørås, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B. I. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360: 464-467.

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.

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.

Regner, A., Ramirez, G., Bell'o-Klein, A., Souza, D. (1998). Effects of guanine nucleotides on glutamate-induced chemiluminescence of hippocampal slices submitted to hypoxia. *Neurochem. Res.* 23: 519-524.

Robinson, M. B. & Dowd, L. A., (1997). Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Adv. Pharmacol.* 37: 69-115.

Roesler, R., Vianna, M. R. M., Lara, D. R., Izquierdo, I., Schmidt, A., Souza, D. O. (2000). Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. *Neuroreport* 11: 2537-2540.

Rosenberg, P. A., Amin, S., Leitner, M. (1992). Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *J. Neurosci.* 12: 56-61.

Rothstein, J. D., Martin, L. J., Kuncl, R. W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 326: 1464-1468.

Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J., Kuncl, R. W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38: 73-84.

Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686.

Rubin, M. A., Jurach, A., Costa, E. M., Lima, T. T., Jimenez-Bernal, R. E., Begnini, J., Souza, D. O., Melo, C. F. (1996). GMP reverses the facilitatory effect of glutamate on inhibitory avoidance task in rats. *Neuroreport* 7: 2078-2080.

Rubin, M. A., Medeiros, A. C., Rocha, P. C., Livi, C. B., Ramirez, G., Souza, D. O. (1997A). Effect of guanine nucleotides on [³H]glutamate binding and on adenylate cyclase activity in rat brain membranes. *Neurochem Res* 22: 181-187.

Rubin, M. A., Jurach, A., Zanolla, G. R., Boemo, R. L., Souza, D. O., de Mello, C. F. (1997B). Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Neuroreport* 8 : 3713-3716.

Sattler R. & Tymianski M. (2000). Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med.* 78:3-13

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

Scannevin, R. H. & Huganir, R. L. (2000). Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat. Neurosci. Rev.* 1: 133-141.

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.

Souza, D. O. & 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.

Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10955-10959.

Swanson R.A., Liu J., Miller J.W., Rothstein J.D., Farrell K., Stein B.A., Longuemare M.C., (1997). Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J. Neurosci.* 17:932-40

Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276: 1699-1702.

Tanaka, K. (2000). Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci. Res.* 37: 15-19.

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.

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.

Tavares, R. G., Santos, Tasca, C. I., Santos, C. E., Alves, L. B., Porciúncula, L. O., Emanuelli, T., Souza, D. O. (2002). Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem. Int.* 40: 621-627.

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. *Brit. J. Pharmacol.* 135: 969-976.

Uemura, Y., Miller, J. M., Matson, W. R., Beal, M. F. (1991). Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke* 22: 1548-1553.

Vesce S., Bezzi P., Volterra A.(1999).The highly integrated dialogue between neurons and astrocytes in brain function. *Sci Prog.* 82 : 251-70.

Yoneda, Y., Ogita, K., Suzuki, T., Enomoto, R., Pin, Ping Z. (1990). Competitive inhibition of NMDA-mediated responses by guanine nucleotides in brain synaptic membranes treated with Triton X-100. *Neurosci. Res.* 9: 114-125.

Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada

K, Tanaka K. (1998). Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 10: 976-988.