



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

MATEUS DOS SANTOS SILVA

**GLUTATIONA MODULA A LIBERAÇÃO DE ADENOSINA EM CULTURA
PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS DE CAMUNDONGO**

BELÉM - PA
2022

MATEUS DOS SANTOS SILVA

**GLUTATIONA MODULA A LIBERAÇÃO DE ADENOSINA EM CULTURA
PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS DE CAMUNDONGO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – Área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

Co-orientador(a): Prof. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira

BELÉM - PA
2022

MATEUS DOS SANTOS SILVA

GLUTATIONA MODULA A LIBERAÇÃO DE ADENOSINA EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS DE CAMUNDONGO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – Área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

Co-orientador(a): Prof. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira

Banca examinadora:

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Pará – Instituto de Ciências Biológicas

Prof. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira (Co-orientadora)
Universidade Federal do Pará – Instituto de Ciências Biológicas

Prof. Dr. Alan Barroso Araújo Grisólia (1º Membro)
Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA)

Prof. Dr. Luís Antônio Loureiro Maués (2º Membro)
Universidade Federal do Pará (Campus Altamira)

Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista (Membro suplente)
Universidade Federal do Pará – Núcleo de Medicina Tropical.

BELÉM - PA
2022

AGRADECIMENTOS

Pessoalmente, os agradecimentos são sempre a parte mais difícil de se escrever. Não pela dificuldade em pensar em algo para ser grato, mas sim pela dificuldade em encontrar as palavras que expressem o tamanho da minha gratidão a várias pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho. Nesse sentido, o meu primeiro agradecimento neste documento será o mais difícil de todos, e eu espero que consiga transmitir a ela ao menos uma fração da minha gratidão.

Agradeço à professora Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira por ter me abraçado como aluno nessa longa jornada que foi o Mestrado. Não sou apenas grato como também já sinto saudade dos nossos cafés, das conversas incansáveis sobre neuroquímica, das discussões calorosas no laboratório que geralmente eram acompanhadas de um ótimo bolo (Todos os quais eu sou imensamente agradecido pela senhora ter comprado) e de tentar - ao menos uma vez - tentar me equiparar na arguição com a senhora. Um dia eu consigo!

Obrigado por me ensinar mais sobre dedicação, sobre rigor científico e sobre compromisso - e por se tornar o meu espelho para tudo isso. O mais poético para mim é que a minha história na neurociência começou, de fato, com um fascínio pela sua história na neuroquímica com o sistema de transporte de glutamato independente de sódio (Ou melhor: Independente de Na!). Então, para sempre, não tem como eu falar da minha história sem mencionar a sua. E esse é o meu agradecimento final: Obrigado por ser uma fonte de inspiração como cientista e como figura humana. Apenas obrigado.

Agradeço também ao meu mestre e orientador, professor Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva, por toda a formação científica, pela paciência e ensinamentos gigantescos acompanhados do nosso café da tarde quase sagrado. Obrigado por ter me dado uma segunda chance e me deixado retornar ao LNE. Eu sempre digo e sempre direi que o senhor mudou a minha vida, muito mais do que pensa que mudou. O laboratório foi um ponto de guinada em vários sentidos para mim e isso só foi possível porque o senhor sempre me deu oportunidades. Existe uma frase proferida pela professora Karen que eu tomo como total verdade, que é que ninguém na Universidade conseguiria me orientar como o senhor me orientou. Eu acho que isso já dá a dimensão da importância que o senhor tem na minha vida. Obrigado por tudo.

Deixo meu agradecimento também à minha grande amiga e parceira de laboratório, Luana Carvalho Martins, por todos os ótimos momentos no LNE e por ter me ensinado muito sobre perseverança e determinação. Com toda certeza eu digo que teria sido muito mais difícil sem você ao meu lado para trabalhar e para rir junto. Ficarei sempre na torcida!

Agradeço também ao Patrick Bruno Cardoso Costa por ser meu incentivador número 1, me apoiar nas coisas certas e saber dar um puxão de orelha nas coisas erradas. Pelos incríveis momentos científicos e não científicos que eu vou carregar para sempre no coração e por ser um exemplo de foco e força de vontade para mim.

Agradeço ao Renato Mateus Santos de Lima pelas inúmeras conversas, risadas e discussões acadêmicas sobre o seu trabalho, que é um dos mais empolgantes do laboratório e que com certeza quero saber o desfecho dessa história! Obrigado pela amizade e inúmeras horas andando pela Universidade.

Agradeço a Caroline Araújo Costa de Lima pelos vários momentos na cultura de células. Eu abro um sorriso só de lembrar na saga para fazer a cultura de retina embrionária. Obrigado por todos os momentos juntos.

Por fim, agradeço à "nova geração" Isabella Barros da Silva, Stella Jasmine Arruda Coelho e Wendell José Costa de Moura. Fico feliz em ter transmitido a vocês um pouco de conhecimento e de paixão pela ciência, e assim como vocês aprenderam comigo, eu aprendi muito com vocês sobre a enorme responsabilidade de formar recurso humano de qualidade. Vocês fizeram parte da minha formação acadêmica e não tinha trio melhor para eu auxiliar na orientação. Obrigado!

Há várias outras pessoas a agradecer também, que por todo o contexto dos últimos dois anos eu tive uma interação limitada, mas quero deixar registrado o meu obrigado.

Agradeço aos meus avós, por sempre terem acreditado em mim.

Agradeço aos professores do LNE, que mantém com muito esforço o laboratório funcionando para as novas gerações.

Agradeço ao Sávio Lima Bastos, que mesmo distante se fazia presente para falarmos sobre a vida e sobre a ciência (Como sempre fizemos!)

Agradeço ao Emerson Feio Pinheiro, pela companhia no laboratório e inúmeros momentos de discussão e descontração. Ficarei na torcida sempre por você!

Aos meus inúmeros amigos, que me acompanharam em diferentes momentos da formação e viram a aventura que foi e que continua sendo: Brenda Lacerda, Caio Dantas, Catarina Torres, Julieny Seixas, Lui Wallacy Morikawa, Maria Clara Barros, Rodrigo Petry, Thony Mota e Yuri Richard.

Agradeço ao meu professor Frederico de Sousa Borba, pelo enorme e essencial incentivo à carreira acadêmica.

Um agradecimento também aos grandes mestres que retornaram à Universidade para implantar a neurociência na Amazônia e que tornaram tudo isso possível: Cristovam Wanderley Picanço Diniz, José Luiz Martins do Nascimento e Luís Carlos de Lima Silveira (*In memoriam*).

A todos, obrigado.

“What is the function of glial cells in neural centers? The answer is still not known, and the problem is even more serious because it may remain unsolved for many years to come until physiologists find direct methods to attack it”

Santiago Ramón-y-Cajal

“As pessoas felizes lembram o passado com gratidão, alegram-se com o presente e encaram o futuro sem medo”

Epícuro

RESUMO

A glutathiona (GSH) é um dos principais antioxidantes no Sistema Nervoso Central (SNC) e um potencial gliotransmissor, induzindo ondas de cálcio no citosol de células gliais. A adenosina (Adn) é um neuromodulador amplamente expresso no SNC e os seus níveis extracelulares são um fator crítico para determinar o seu efeito no tecido nervoso. Sabe-se que vias dependentes de Ca^{2+} regulam a liberação de Adn. Uma vez que a GSH tem a capacidade de induzir ondas de Ca^{2+} no citosol de células gliais, o presente trabalho se propõe a investigar se essa molécula pode regular os níveis extracelulares de Adn. Para avaliar isso, foram utilizadas culturas primárias de astrócitos corticais mantidas em DMEM+10% SBF em estufa de CO_2 (37°C , 95% O_2 /5% CO_2) por 12-15 dias, quando atingiram a confluência. As células foram incubadas com tampão Hank por diferentes intervalos de tempo, após o qual foi realizada a coleta dessa solução e os neurotransmissores ali presentes foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia. Nossos dados mostram que a GSH induz um aumento de 80% nos níveis extracelulares de Adn em dois tempos analisados: 5 e 20 minutos. A remoção da GSH do meio de incubação faz a concentração de Adn retornar aos níveis basais. A remoção de Na^+ ou Ca^{2+} do meio não interferiu no efeito da GSH. O bloqueio dos transportadores equilibrativos de nucleosídeos por dipiridamole ($10 \mu\text{M}$) diminuiu significativamente os níveis de Adn no meio, mas não interferiu na ação da GSH. A fim de avaliar se o efeito da GSH deriva de uma modulação indireta sobre a liberação de glutamato ou GABA (Dois agentes descritos como reguladores da liberação de Adn), foi realizada a quantificação desses transmissores. Ambos foram significativamente aumentados na presença da GSH. No entanto, diferente do que foi observado com a Adn, a remoção de Na^+ do meio de incubação mitigou o efeito da GSH sobre a liberação de glutamato. A incubação dos astrócitos com GABA (50 e $100 \mu\text{M}$) não influenciou na concentração extracelular de Adn em nosso modelo experimental, descartando uma modulação GABAérgica por trás do efeito da GSH. A avaliação de agentes redox demonstrou que compostos tiol reproduzem o efeito da GSH, enquanto o antioxidante não-tiol alfa-tocoferol não regulou os níveis extracelulares de Adn. Desse modo, o presente trabalho conclui que os astrócitos expressam um componente sensível à GSH que pode ser modulado pelo seu grupamento sulfidrila.

ABSTRACT

Glutathione (GSH) is one of the main antioxidants in the Central Nervous System (CNS) and a potential gliotransmitter, inducing calcium waves in the cytosol of glial cells. Adenosine (Adn) is a neuromodulator widely expressed in the CNS and its extracellular levels are a critical factor in determining its effect on nervous tissue. It is known that Ca^{2+} -dependent pathways regulate Adn release. Since GSH has the ability to induce Ca^{2+} waves in the cytosol of glial cells, the present work aims to investigate whether this molecule can regulate extracellular Adn levels. To assess this, we used primary cultures of cortical astrocytes maintained in DMEM+10% SBF in a CO_2 oven (37°C , 95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2) for 12-15 days, when they reached confluence. The cells were incubated with Hank buffer for different time intervals, after which this solution was collected and the neurotransmitters present there were quantified by High Performance Liquid Chromatography. Our data show that GSH induces an 80% increase in extracellular Adn levels at two analyzed times: 5 and 20 minutes. Removal of GSH from the incubation medium returns the Adn concentration to baseline levels. Removal of Na^+ or Ca^{2+} from the medium did not affect the effect of GSH. Blockade of nucleoside equilibrative transporters by dipyridamole ($10\ \mu\text{M}$) significantly decreased the levels of Adn in the medium, but did not interfere with the action of GSH. In order to assess whether the effect of GSH derives from an indirect modulation on the release of glutamate or GABA (two agents described as regulators of Adn release), the quantification of these transmitters was performed. Both were significantly increased in the presence of GSH. However, unlike what was observed with Adn, the removal of Na^+ from the incubation medium mitigated the effect of GSH on glutamate release. The incubation of astrocytes with GABA (50 and $100\ \mu\text{M}$) did not influence the extracellular Adn concentration in our experimental model, ruling out a GABAergic modulation behind the effect of GSH. The evaluation of redox agents showed that thiol compounds reproduce the effect of GSH, while the non-thiol antioxidant alpha-tocopherol did not regulate extracellular Adn levels. Thus, the present work concludes that astrocytes express a GSH-sensitive component that can be modulated by its sulfhydryl group.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 GSH NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	21
1.2 A GSH COMO UM POSSÍVEL GLIOTRANSMISSOR.....	26
1.3 A ADENOSINA E O SEU PAPEL SINALIZADOR.....	27
1.4 .1 ADENOSINA: VIAS DE SÍNTESE, TRANSPORTE E DEGRADAÇÃO EM ASTRÓCITOS.....	28
1.4.2 MODULAÇÃO NEUROQUÍMICA DA LIBERAÇÃO DE ADENOSINA.....	34
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS.....	36
3.2 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GLUTAMATO, GABA E ADENOSINA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA.....	39
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4. RESULTADOS.....	44
4.1 A GSH MODULA OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE ADENOSINA EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS.....	44
4.2 O EFEITO DA GSH NÃO DERIVA DE UMA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE.....	46
4.3 A GSH INDUZ UM AUMENTO NOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE ADN POR UMA VIA INDEPENDENTE DE TRANSPORTADOR.....	48
4.4 O EFEITO MODULADOR DA GSH SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE ADENOSINA É INDEPENDENTE DE Na ⁺ E Ca ²⁺	50
4.5 O EFEITO DA GSH SOBRE A LIBERAÇÃO DE ADN É INDEPENDENTE DE UMA MODULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA OU GABAÉRGICA.....	53
5. DISCUSSÃO.....	56
5.1 O EFEITO DA GSH SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE ADN.....	56
5.2 O EFEITO DA GSH SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GLU.....	64

5.3 O EFEITO DA GSH SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA.....	66
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da GSH.....	16
Figura 2	Esquema ilustrativo da síntese da GSH.....	17
Figura 3	Ilustração das vias de síntese de Adn.....	30
Figura 4	Esquema representando os transportadores equilibrativos e concentrativos de nucleosídeos.....	32
Figura 5	Fotografia do neocórtex e esquema do preparo da cultura de células.....	38
Figura 6	Esquema representando o procedimento de Cromatografia Líquida de Alta Eficácia.....	43
Figura 7	Efeito da GSH sobre os níveis extracelulares de Adn em função do tempo.....	45
Figura 8	Efeito do antioxidante tocoferol e dos tióis cisteína e N-acetilcisteína sobre os níveis extracelulares de Adn.....	47
Figura 9	Avaliação da participação dos transportadores equilibrativos de nucleosídeos sobre o efeito da GSH.....	49
Figura 10	Participação de íons Na^+ sobre o efeito da GSH nos níveis extracelulares de Adn.....	51
Figura 11	Participação de íons Ca^{2+} sobre o efeito da GSH nos níveis extracelulares de Adn.....	52
Figura 12	Efeito da GSH sobre os níveis extracelulares de glutamato.....	54
Figura 13	Efeito da GSH sobre os níveis extracelulares de GABA e modulação GABAérgica sobre os níveis de Adn no meio.....	55
Figura 14	Esquema representativo de um possível mecanismo de ação da GSH sobre os níveis extracelulares de Adn.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição do K_i (nM) da adenosina por cada um de seus receptores.....	27
Tabela 2	Composição dos tampões utilizados no presente trabalho.....	40
Tabela 3	Gradiente de eluição para quantificação de glutamato e GABA por CLAE acoplada ao detector de fluorescência.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-SH	Sulfidrila
[Adn]_e	Concentração extracelular de adenosina
ACh	Acetilcolina
ADA	Adenosina deaminase
Adn	Adenosina
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolepropionico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficácia
CNT	Transportador concentrativo de nucleosídeo
CTRL	Controle
CYS	Cisteína
DIP	Dipiridamole
DTT	Dithiothreitol
ENT	Transportador equilibrativo de nucleosídeo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLAST	Transportador glutamato-aspartato
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GMP	Guanosina monofosfato
GS	Glutaciona sintetase
GSH	Glutaciona
GCS	Gama-glutamilcisteína sintetase
LiCl	Cloreto de lítio
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato

NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NMDA	N-metil-d-aspartato
NO	Óxido nítrico
OPA	O-phtaldeído
PDC	L-trans-pyrrolidine-2, 4-dicarboxylate
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SNC	Sistema Nervoso Central

1. INTRODUÇÃO

A GSH foi descoberta em 1888 por De Rey-Pailhade a partir da descrição de uma substância capaz de reagir com enxofre e gerar sulfato de hidrogênio, sendo inicialmente nomeado como *filotiona* (Do grego para “amor” e “enxofre”) (DE REY-PAILHADE, J. 1888). Posteriormente, Frederick Hopkins caracterizou a estrutura dessa substância e determinou, erroneamente, que se tratava de um dipeptídeo formado por glutamato e cisteína, rebatizando-a como “glutathiona”, um trabalho que garantiu a conquista do Prêmio Nobel de Fisiologia em 1929 (HOPKINS, F. 1929). Estudos posteriores observaram uma inconsistência entre a quantidade teórica e a quantidade obtida que um dipeptídeo de glutamato e cisteína deveria ter de nitrogênio, sugerindo que um terceiro aminoácido constituísse a estrutura da GSH. Ensaio bioquímicos posteriormente ratificaram essa hipótese e demonstraram que, de fato, a GSH é formada por 3 aminoácidos: glutamato, cisteína e glicina (MEISTER, A. 1988) (Figura 1).

Os aminoácidos que formam a GSH são unidos covalentemente a partir da ação de duas enzimas dependentes de ATP. A primeira enzima é a Gama-Glutamilcisteína Sintetase (GCS), responsável por conjugar o glutamato à cisteína e formar o dipeptídeo gama-glutamilcisteína. Em seguida, a Glutathiona Sintetase (GS) conjuga esse dipeptídeo à glicina, formando a GSH. Esse processo de síntese ocorre virtualmente em todos os tecidos de vertebrados e é finamente regulado de modo a manter os níveis intracelulares de GSH (DRINGEN, R. 2000; AOYAMA, K., 2021) (Figura 2).

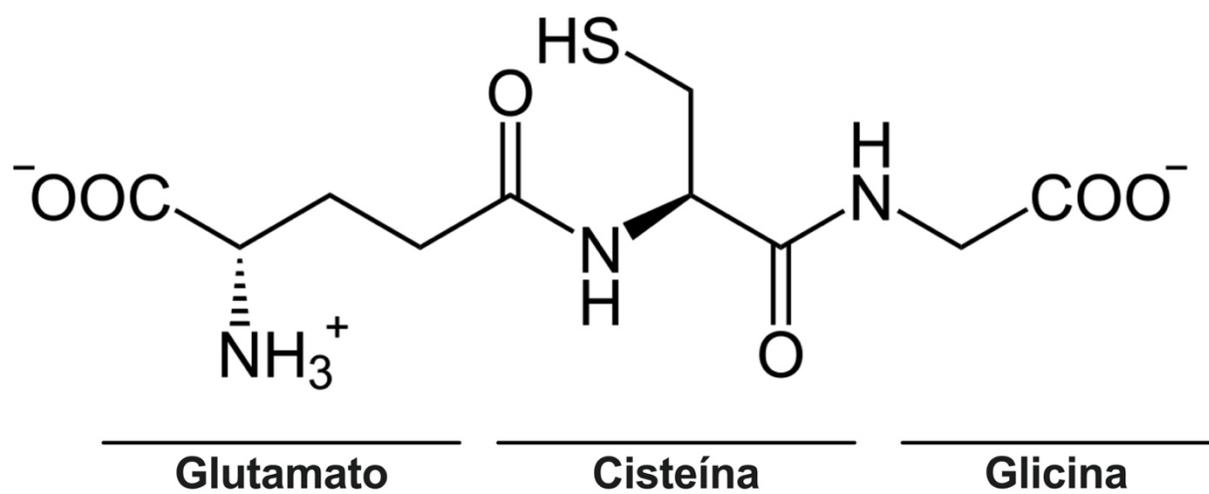


Figura 1. Estrutura química da glutathione (Gama-glutamilcisteinilglicina, GSH). Essa molécula é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. Modificada de: PubChem.com

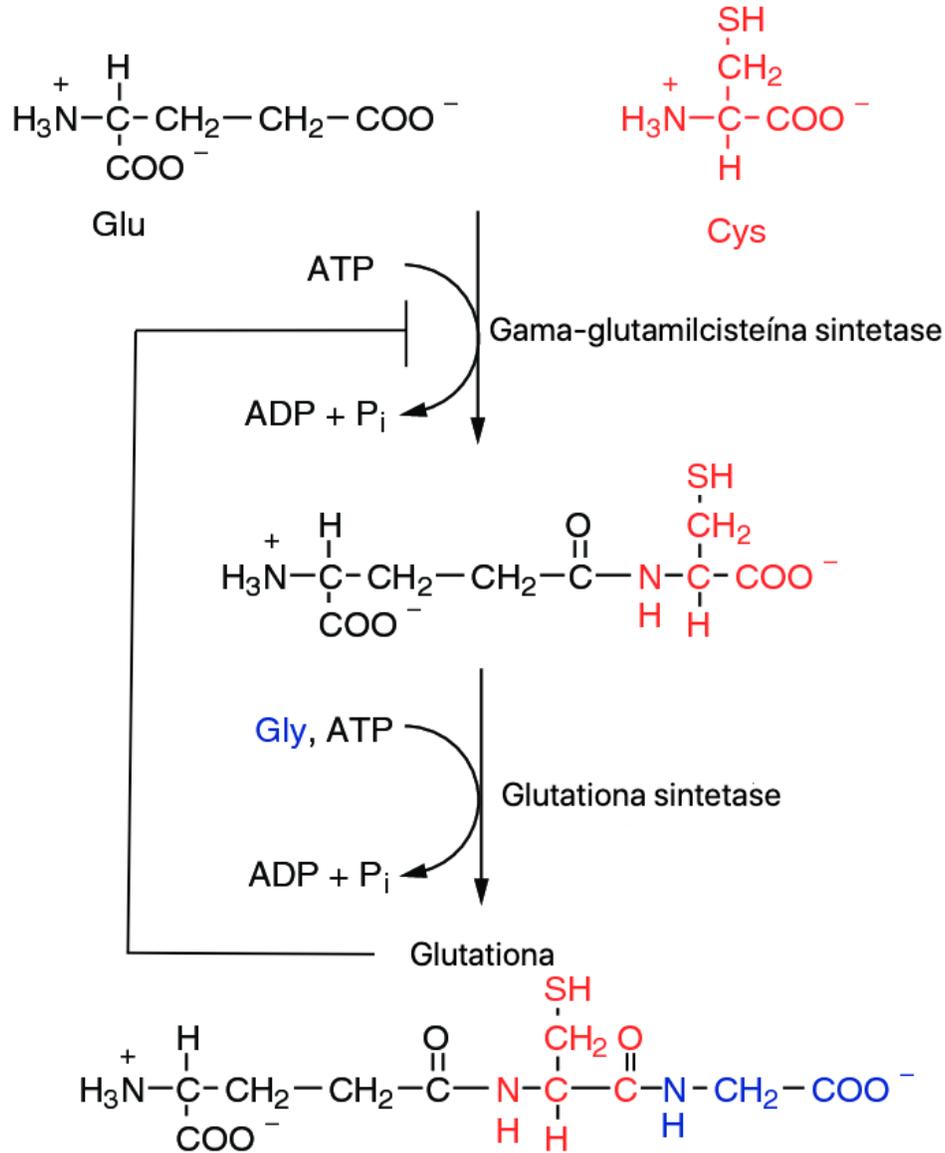


Figura 2. Esquema representativo da síntese de GSH. O processo inicia a partir da conjugação dos aminoácidos glutamato (Glu) e cisteína (Cys) a partir da ação da enzima gama-glutamilcisteína sintetase, gerando como produto a gama-glutamilcisteína. Em seguida, a enzima Glutathiona sintetase adiciona um resíduo de glicina (Gly) ao dipeptídeo, formando assim a glutathiona. A via de produção de GSH pode ser auto-inibida uma vez que a GSH é um regulador alostérico negativo da gama-glutamilcisteína sintetase, representado na figura como uma barra e um traço.

A modulação da síntese de GSH pode ocorrer tanto a nível transcricional, a partir de um aumento na produção da GGS e da GS, quanto a nível cinético, alterando a afinidade dessas proteínas por seus substratos (DRINGEN, R. 2000). A GGS, por exemplo, é composta por duas subunidades denominadas de “catalítica” e “moduladora”. A GGS catalítica possui toda a atividade enzimática e é passível de inibição pela própria GSH, de modo a regular a síntese desse tripeptídeo de acordo com a necessidade da célula (ZHANG E FORMAN, 2021). A GGS moduladora, por sua vez, é enzimaticamente inativa, mas desempenha uma importante função reguladora ao aumentar a afinidade da GGS por glutamato e diminuir a sua inibição por GSH, de modo a acentuar a taxa de produção de gama-glutamilcisteína (ZHANG E FORMAN, 2021). Estudos com *knockout* do gene que codifica a GGS moduladora demonstram que os animais mutantes apresentam uma queda de 80% nos níveis de GSH, apontando que a holoenzima composta pelas duas subunidades de GGS é mais eficiente do que a forma catalítica isolada (KILLOY et al., 2018). Ademais, um dos principais mecanismos de regulação do acoplamento entre as duas subunidades é o próprio estado redox, sendo um ambiente pró-oxidante mais favorável à união e formação da holoenzima em comparação a um ambiente redutor, de modo que condições de estresse oxidativo resultem em uma maior produção de GSH para contrabalancear o aumento na concentração de radicais livres (ZHANG E FORMAN, 2021).

Um segundo mecanismo de regulação da atividade da GGS é a auto-inibição pela própria GSH. Essa enzima possui um sítio alostérico que permite a ligação de GSH, de modo que uma queda no conteúdo intracelular desse tripeptídeo facilita a atividade da

GGS, estimulando a síntese de GSH. Desse modo, essa rota de síntese se ajusta para garantir uma quantidade ideal de GSH à célula (DRINGEN, R. 2000).

Um dos fatores que permitem o acúmulo de GSH a altos níveis dentro da célula é a sua estrutura diferenciada. Classicamente, os aminoácidos são unidos a partir de ligações peptídicas entre a carboxila e o grupamento amina vinculados ao carbono alfa dessas moléculas. Em contrapartida, a GSH possui uma ligação entre o glutamato e a cisteína a partir de uma carboxila gama, de forma que esse tripeptídeo se torna insensível à ação de peptidases intracelulares que prontamente degradam outros peptídeos (AQUILANO et al., 2014).

A degradação da GSH é realizada pela enzima de membrana glutamiltranspeptidase (GGT) que é capaz de clivar a ligação do tipo gama da GSH. Essa proteína cliva o tripeptídeo em um dímero cisteína-glicina e transfere o resíduo glutamyl a um aceptor, geralmente um outro aminoácido como o glutamato, formando um dímero glutamyl-aminoácido. Devido à localização da GGT, a GSH é catabolizada apenas extracelularmente e os produtos de sua degradação podem ser utilizados por outras células (WANG et al., 2001; ZHANG E FORMAN, 2021).

Além de ser um importante antioxidante no SNC, um conjunto de evidências sugerem que a GSH tenha funções como um sinalizador celular no tecido nervoso (JANÁKY et al., 2000). A primeira grande evidência é de caráter evolutivo, no qual a GSH assume-se como um tripeptídeo presente na maioria, se não em todos, os eucariotos, um tipo de conservação que geralmente confere uma versatilidade nos papéis desempenhados por uma dada molécula na fisiologia celular, como pode ser observado em aminoácidos, nucleotídeos e lipídios que, além de sua função clássica estrutural

altamente conservada, também são importantes sinalizadores celulares que fornecem informações à célula sobre o ambiente intra e extracelular (BURKHARDT E JÉKELY, 2021). Essa mesma conservação é observada na GSH, de modo a sugerir que ela tenha funções como um sinalizador. Evidências mais diretas apontam também que a GSH cumpre com diferentes critérios de sinalizadores celulares, dentre eles é a sua capacidade de ser liberada pela célula por um mecanismo que pode ser regulado, como foi demonstrado em cultura primária de astrócitos corticais e de células da retina, onde a GSH é liberada tanto por carreadores como o MRP1 quanto como o GLAST, dois transportadores que são susceptíveis a regulação pela célula e que, dessa forma, permitem o controle de efluxo do tripeptídeo GSH (WANG et al., 2000; FRADE et al., 2008; GARCIA et al., 2011). Além de ser liberada, a GSH também se liga a receptores ionotrópicos de glutamato, como demonstrado em radioimunoensaios, sugerindo um papel ativo na sinalização (JANÁKY et al., 2000). Papel esse demonstrado a partir de estudos com (STEULLET et al., 2008; BELROSE et al., 2012; FREITAS et al., 2016). Por fim, outro critério de sinalizador celular disposto pela GSH é um mecanismo de terminação extracelular que permita à célula utilizar essa molécula de maneira refinada (DRINGEN, R. 2000). Esse conjunto de evidências sugerem que a GSH tem um potencial como sinalizador celular, o que representa uma mudança de paradigma na forma como essa molécula é enquadrada dentro da fisiologia do SNC. Um questionamento em aberto sobre esse possível papel sinalizador é quais os sistemas de sinalização podem ser modulados pela GSH e por qual mecanismo esse processo ocorre, duas informações que agregariam a literatura sobre um papel neuromodulador da GSH.

1.1 – GSH NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A GSH está distribuída em diferentes compartimentos celulares, como a mitocôndria, o retículo endoplasmático e o núcleo, sendo predominante o citosol (ZHANG E FORMAN, 2021). Além dessa compartimentalização intracelular, a GSH é também compartimentalizada intercelularmente, sendo predominante em células astrocíticas em comparação a células neuronais (RICE E MENNA, 1998). Tal distribuição diferenciada é observada em algumas regiões do sistema nervoso, como é o caso do neocórtex e da retina, mas não de outras, a exemplo de regiões mesencefálicas, onde o conteúdo de GSH entre neurônios e glia é igual (RICE E MENNA, 1998). A função por trás desse fenômeno não é estabelecida, mas sugere que em algumas regiões a GSH assume um papel protagonista em células gliais, como é o caso da retina, onde foi demonstrado que esse tripeptídeo ativa a glia de Müller, mas não células neuronais (FREITAS et al., 2016). Essa propriedade gerou a hipótese da GSH ser um gliotransmissor, uma molécula sintetizada e liberada por células gliais capaz de ativar outras glia adjacentes de modo a estimular uma resposta fisiológica.

Dentro dessa hipótese sinalizadora, dois principais aspectos são investigados sobre a GSH. O primeiro é o mecanismo de efluxo desse tripeptídeo, uma vez que mecanismos de liberação constituem uma das principais etapas do processo de comunicação. O segundo é o seu efeito modulador sobre vias intracelulares que vão influenciar na resposta da célula. O estudo ao redor da liberação de GSH demonstrou a existência de dois principais transportadores em astrócitos foram descritos como mediadores da liberação de GSH. O primeiro é o MRP1, uma proteína da família ABC

que acopla o efluxo de GSH à hidrólise de ATP (MINICH et al., 2006). A deleção do gene que codifica o MRP1 ou o bloqueio farmacológico dessa proteína resultam em uma queda de 60% nos níveis extracelulares de GSH, sugerindo que ele possui um papel importante na liberação basal desse tripeptídeo por astrócitos. A caracterização do transporte mediado pelo MRP1 demonstrou também uma alta afinidade por proteínas, peptídeos ou xenobióticos conjugados à GSH. Isso sugere que esse transportador está envolvido com o processo de desintoxicação celular, de modo que componentes potencialmente tóxicos são marcados com GSH, tornando-se assim um substrato para o MRP1, o qual mediará o efluxo desse composto (MINICH et al., 2006; LALSIAMTHARA E ABALLAY, 2022).

O segundo transportador capaz de realizar o efluxo de GSH é o transportador de glutamato-aspartato (GLAST). O GLAST é um dos principais transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs, do inglês *Excitatory amino acid transporters*) de células gliais, captando principalmente glutamato, aspartato ou compostos sulfidríla. Foi demonstrado que o glutamato induz a liberação de GSH por astrócitos primários ou em células da retina embrionária, um efeito reproduzido por substratos dos EAATs e bloqueado por inibidores do GLAST, sugerindo um mecanismo de heterotroca entre o glutamato e a GSH por meio desse carreador. Desse modo, a GSH pode ser liberada por astrócitos a partir de um aumento na concentração extracelular de glutamato (BOUVIER et al., 2006; GARCIA et al., 2011).

Duas visões opostas discorrem sobre o sentido fisiológico de um efluxo de GSH. Alguns trabalhos sustentam que a saída desse tripeptídeo reflete um papel protetor da glia, que libera GSH a fim de prover suporte antioxidante a neurônios adjacentes em

situações alostásicas (FRADE et al., 2008). Em contrapartida, uma outra corrente sugere que a saída de GSH dos astrócitos os torna mais susceptíveis ao dano oxidativo e propicia a ativação da via proteolítica das caspases, culminando em uma morte celular programada (WALLIN et al., 2002). Nessa vertente, já foi demonstrado que o efluxo de GSH precede o processo apoptótico, e que o bloqueio da liberação de GSH previne esse fenômeno, sugerindo que o efluxo desse tripeptídeo está associado à morte celular ao mitigar as defesas antioxidantes da própria glia (FRANCO E CIDLOWSKI, 2012).

Apesar de opostas, essas visões sobre a liberação de GSH não são auto-excludentes e na realidade podem refletir um espectro de efeitos da flutuação nos níveis de GSH no ambiente, que pode ir de um efeito protetor a um efeito citotóxico dependendo da magnitude da variação (FRANCO E CIDLOWSKI, 2012). Isso ocorre devido à importante participação da GSH na manutenção do estado redox -SH tanto no meio intra quanto no extracelular. Várias proteínas precisam de um estado redox apropriado para realizarem as suas funções, de modo alterações nas propriedades redox em decorrência de uma oscilação no conteúdo de GSH resulta em alterações na atividade celular.

Para entender o papel regulador do estado redox nos eventos de transdução de sinal, deve-se primeiro entender os mecanismos por trás desse processo. Aminoácidos como a cisteína, a metionina, o triptofano e a tirosina são propensos à oxidação, de modo que eles oscilam entre um estado reduzido e oxidado que influencia diretamente na estrutura da proteína que eles compõem e, conseqüentemente, na sua função. Os resíduos de cisteína (CYS) recebem grande destaque nesse papel redox devido à sua alta susceptibilidade à oxidação e à existência de proteínas com domínios ricos em CYS que sabidamente afetam a fisiologia celular, como é o caso de proteínas como o fator de

transcrição Nrf2, que participa da transcrição de genes relacionados à defesa antioxidante (BRANDES et al., 2009).

O Nrf2 se conjuga a Keap1, uma proteína repressora que estimula a degradação de Nrf2 a partir da via da ubiquitina-proteassoma. A proteína Keap1 é rica em resíduos de CYS, que quando oxidadas favorecem um desacoplamento entre a Keap1 e o Nrf2, permitindo que esse fator de transcrição se acumule no citosol e se transloque ao núcleo para estimular a transcrição de genes relacionados a antioxidantes. Desse modo, a flutuação no estado redox intracelular atua como um sinalizador que favorece a produção de mais agentes redutores para neutralizar o excesso de radicais livres (MA, Q. 2013).

Inúmeros tipos de proteínas envolvidas na comunicação neural são passíveis de modulação redox, como transportadores, receptores, canais iônicos, cinases, fosfatases e fatores de transcrição. Um exemplo é o carreador de aminoácidos excitatórios 1 (EAAC1, do inglês *excitatory amino acid carrier 1*), que possui resíduos de CYS cuja alternância entre o estado oxidativo/redutor induz rearranjos estruturais que influenciam na sua taxa de transporte (TROTTI et al., 1997). Outra proteína com uma ampla caracterização de modulação redox é o receptor GABA_A, um receptor ionotrópico acoplado a canais iônicos permeáveis a Cl⁻, muito ativos no processo de hiperpolarização celular mediado pelo neurotransmissor GABA. Sabe-se que flutuações redox podem potencializar ou inibir a atividade desse receptor e influenciar diretamente nas correntes inibitórias geradas em neurônios pós-sinápticos. Gravações de célula inteira de patch-clamp em células ganglionares da retina mostraram as respostas do receptor GABA_A foram potencializadas na presença de agentes redutores como a GSH e inibidas

por agentes oxidantes de -SH, como DTNB e GSSG, o que sugere uma modulação redox dessa proteína (SIGEL E STEINMANN, 2012).

O papel da sinalização redox é tão relevante que o Sistema Nervoso dispõe de sistemas de sinalização baseados em radicais livres, como é o caso do óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*). Essa molécula é sintetizada pela NOS a partir da arginina e é capaz de nitrosilar resíduos de cisteína em diversas proteínas, modulando a sua atividade e estimulando um processo de sinalização. O exemplo mais clássico relacionado à sinalização do NO é a ativação da enzima guanilato ciclase, responsável por converter guanosina mono fosfato (GMP) em GMP cíclico, um importante segundo mensageiro que vai dar continuidade à via dentro da célula (KUMAR et al., 2018).

Apesar da relevância da sinalização redox ser reconhecida, pouco se sabe sobre como esses agentes redox podem modular a comunicação celular em astrócitos, no processo de gliotransmissão (JANÁKY et al., 2000). No entanto, a prevalência de sistemas antioxidantes nessas células sugere que elas respondam a variações redox, em especial aquelas relacionadas ao grupamento -SH que são predominantes nesse tipo glial, como será discorrido a seguir.

1.2 – A GSH COMO UM POSSÍVEL GLIOTRANSMISSOR

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC, representando cerca de 20% das células gliais no neocórtex do cérebro humano (PELVIG et al., 2008), formando conexões complexas com neurônios, vasos sanguíneos e outras células da

glia que desempenham um papel importante na preservação das funções cerebrais normais, fornecendo energia, suporte nutricional e antioxidante a esse tecido (SIRACUSA et al., 2019). Essas células participam ativamente da neurotransmissão, expressando receptores funcionais e liberando “gliotransmissores” capazes de modular a atividade sináptica (FARHY-TSELNICKER E ALLEN, 2018).

Gliotransmissores são mediadores químicos sintetizados e liberados pela glia que induzem uma elevação nos níveis de Ca^{2+} intracelular em outras células gliais (FREITAS et al., 2016; MURAT E GARCÍA-CARCERES, 2021). Moléculas como o glutamato, o ATP, o GABA e a adenosina são tidas como gliotransmissores clássicos e modulam processos complexos como a sinaptogênese ou a plasticidade celular (BARRES, B. 2008). Mais recentemente, a GSH foi sugerida como um potencial sinalizador da glia por cumprir com os critérios dessa classe de transmissores, como a indução de ondas de cálcio no citosol de células gliais, além da sua capacidade de modular a liberação de GABA, sugerindo um efeito modulador desse tripeptídeo sobre a comunicação neural (FREITAS et al., 2016). Apesar desse efeito neuromodulador da GSH ser descrito, pouco se sabe sobre quais sistemas de sinalização podem ser afetados por esse tripeptídeo.

Nesse contexto, um potencial sistema que pode ser modulado pela ação da GSH é o sistema adenosinérgico. Esse sistema pode ser modulado por agentes neuroquímicos capazes de regular os níveis intracelulares de Ca^{2+} , como é o caso da GSH. Desse modo, é dedutivo que a GSH possa regular os níveis extracelulares desse nucleosídeo

1.3 – A ADENOSINA E O SEU PAPEL SINALIZADOR

A adenosina é um dos principais neuromoduladores no SNC, atuando via receptores A1, A2a, A2b ou A3 (LATINI E PEDATA, 2001; BOISON et al., 2010; PURNELL et al., 2021). Os receptores A1 e A3 regulam negativamente a atividade da enzima Adenilato ciclase, bloqueando assim a produção de AMP cíclico (AMPc) e facilitando a atividade de canais de K⁺, o que favorece uma hiperpolarização neuronal (BRAGA et al., 2019). Em contrapartida, os receptores A2a e A2b regulam positivamente a Adenilato ciclase, estimulando a produção de AMPc e ativação de cascatas associadas a esse importante segundo mensageiro (PAES-DE-CARVALHO, R. 2002; SOCODATO et al., 2011; BRITO et al., 2012). A tabela abaixo expressa a afinidade da adenosina pelos seus receptores (YAN et al., 2003; FREDHOLM et al., 2011) (Tabela 1).

K_i em nM

	A1	A2a	A2b	A3
<i>Adenosina</i>	100	310	15000	290

Tabela 1. Descrição do K_i (nM) da adenosina por cada um de seus receptores. A afinidade da adenosina por seus receptores segue a seguinte ordem: A1> A3> A2a> A2b. (YAN et al., 2003).

Essa afinidade diferenciada da Adn por seus receptores está por trás de uma das suas principais características, que é o seu efeito bifásico, o qual confere à Adn a capacidade de induzir respostas opostas no mesmo tipo celular a partir de uma estimulação diferenciada de seus receptores. Essa ação pode ser visualizada no efeito da Adn sobre a liberação de acetilcolina (ACh) por neurônios motores, onde a ativação

de receptores A1 diminui a probabilidade de liberação de ACh, enquanto a ativação de receptores A2 aumenta essa probabilidade (DUARTE-ARAÚJO et al., 2004). Desse modo, o efeito bifásico da Adn é um resultado direto da concentração de adenosina utilizada em um certo modelo experimental e da consequente ativação diferenciada de receptores acoplados a vias intracelulares com funções opostas. Por conta disso, compreender a fisiologia purinérgica perpassa entender os mecanismos que regulam os níveis extracelulares de Adn, como será discorrido a seguir.

1.3.1 - ADENOSINA: VIAS DE SÍNTESE, TRANSPORTE E DEGRADAÇÃO EM ASTRÓCITOS.

A Adn é formada intracelularmente a partir de duas principais rotas. A primeira consiste na desfosforilação do AMP em Adn a partir da ação de nucleotidases citosólicas, enquanto a segunda via perpassa a síntese de homocisteína, a qual produz Adn como um intermediário metabólico (Figura 3). Em astrócitos, ambas as vias são ativas, apesar de a via da homocisteína ser considerada pouco relevante fisiologicamente para produção de Adn (LATINI et al., 1996). Além da síntese intracelular, a Adn também pode ser formada extracelularmente por ação de ecto-nucleotidases, capazes de metabolizar em sequência os nucleotídeos ATP, ADP e AMP em Adn (Figura 3) (BOISON et al., 2010). Essa via extracelular é considerada a principal rota de produção de Adn por astrócitos, como pode ser visto por ensaios farmacológicos que bloqueiam as ecto-nucleotidases e resultam em uma queda de 60% nos níveis de Adn no meio (DI IORIO

et al., 2002; MARTIN et al., 2007). Uma vez formada, seja intra- ou extracelularmente, a Adn fica prontamente disponível para ser transportada.

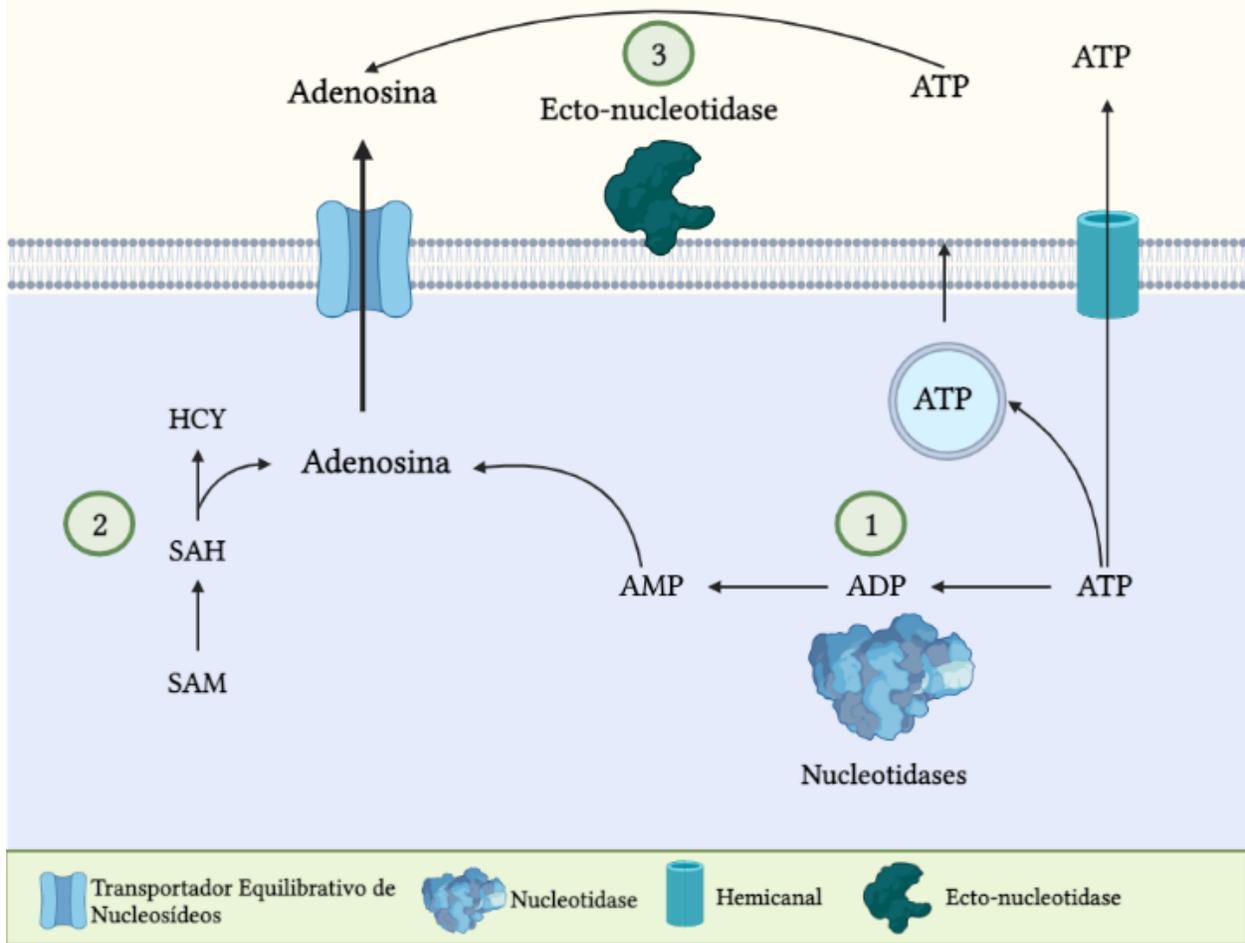


Figura 3. Ilustração representando as vias de síntese da adenosina. 1) Produção de adenosina a partir da degradação de nucleotídeos ATP, ADP e AMP por nucleotidasas citosólicas. 2) Produção de adenosina a partir da via de síntese da homocisteína (HCY). A S-Adenosilhomocisteína (SAH), produzida a partir da S-adenosilmetionina (SAM), é hidrolisada em HCY e Adenosina, que fica disponível para liberação por transportados equilibrativos de nucleosídeos. 3) Degradação extracelular de nucleotídeos a partir de ecto-nucleotidasas localizadas na membrana celular (Dringen et al., 2000).

O sistema de transporte de Adn é dividido em dois subtipos: Os transportadores equilibrativos de nucleosídeos (TENS ou ENTs, do inglês *Equilibrative Nucleoside Transporters*) e os transportadores concentrativos de nucleosídeos (TCN ou CNTs, do inglês *Concentrative nucleoside transportes*) (PAES-DE-CARVALHO et al., 2005; SANTOS-RODRIGUES et al., 2015). Os ENTs são divididos em 4 subtipos (ENTs 1-4) e operam de forma bidirecional de acordo com o gradiente de Adn, podendo liberar ou captar essa molécula, enquanto os CNTs (CNT 1-3) são unidirecionais e trabalham de modo a remover a Adn do ambiente extracelular ao acoplar o seu influxo ao simporte de Na^+ (Figura 4). A caracterização do sistema de transporte de Adn em astrócitos primários demonstrou a presença ENTs 1 e 2 e do CNT 2 (PENG et al., 2005), o que foi confirmado por ensaios farmacológicos com bloqueadores dessas proteínas, como o NBMPR (Bloqueador seletivo do ENT1) e o dipiridamole (DIP; bloqueador dos ENTs 1 e 2) (PARKINSON et al., 2005), que inibiram em 33 e 80% a captação de Adn, respectivamente, sugerindo que o subtipo 2 é o principal ENT expresso por essas células.

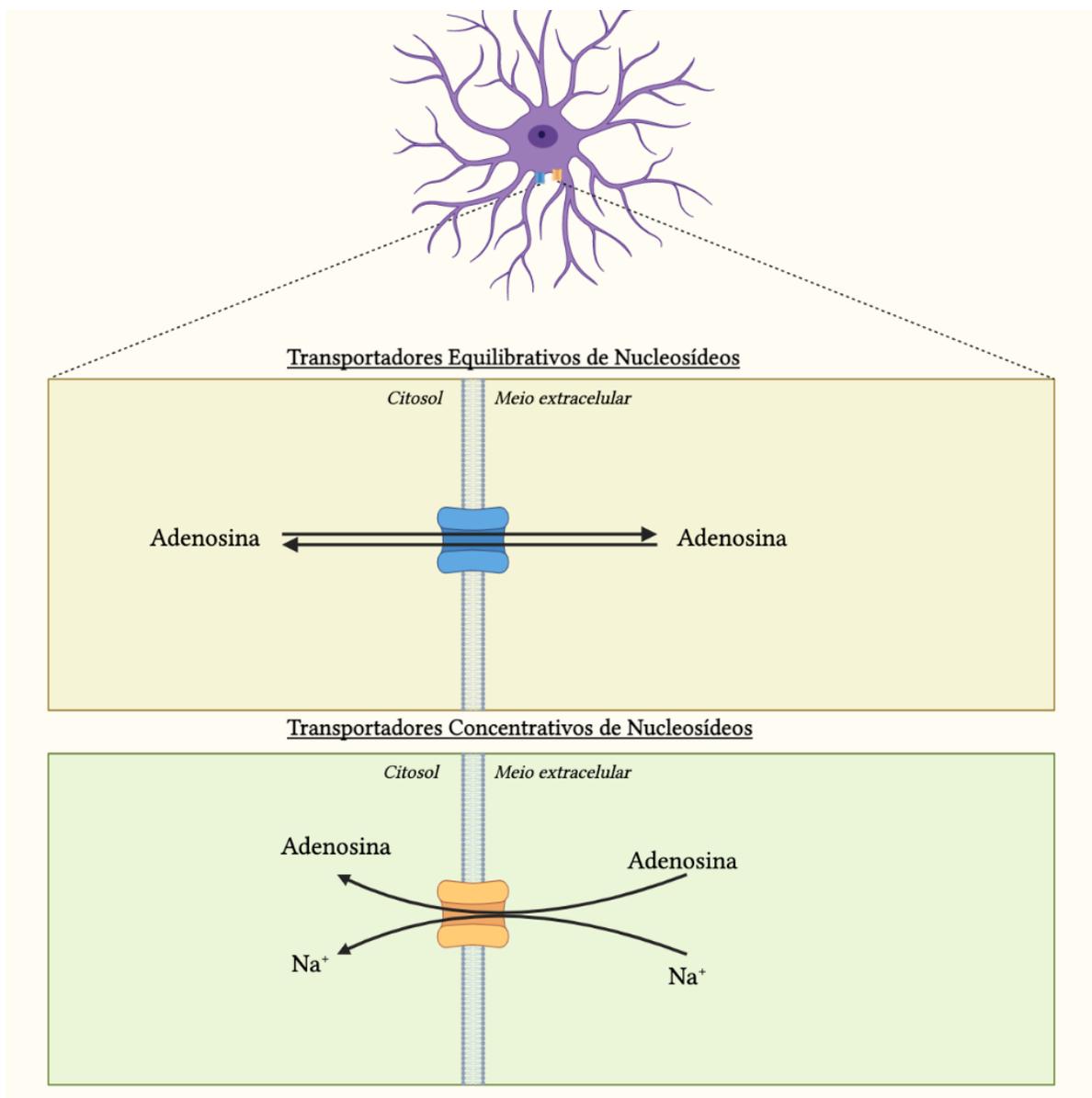


Figura 4. Esquema ilustrativo representando os dois principais sistemas de transporte de adenosina. Os transportadores equilibrativos de nucleosídeos, que transportam Adn de modo bidirecional, podendo liberar ou captar essa molécula. Os transportadores concentrativos de nucleosídeos, por sua vez, operam de forma unidirecional de modo a remover a Adn do meio extracelular a partir de um simporte com íons Na⁺.

Uma terceira via demonstrada na literatura, ainda não totalmente elucidada, é a via regulada negativamente por íons Ca^{2+} . Ensaios em astrócitos corticais primários demonstraram a existência de um efluxo de Adn que é insensível a inibidores farmacológicos de ENTs, de ecto-nucleotidases e de hemicanais, mas que é negativamente regulada por íons Ca^{2+} , isso pode ser observado a partir do aumento nos níveis extracelulares desse cátion (De 2 para 8 mM) ou por meio da incubação com ionomicina ou BAPTA-AM, agentes que respectivamente aumentam ou quelam o Ca^{2+} intracelular (MARTIN et al., 2007). Apesar da relevância fisiológica dessa rota de liberação, ainda não é caracterizado qual o componente celular por trás do mecanismo de efluxo, limitando a sua avaliação à manipulação na concentração de Ca^{2+} intra ou extracelular.

Além dos sistemas de transporte, os níveis extracelulares de Adn também podem ser regulados por enzimas de degradação desse nucleosídeo localizadas fora da célula, como é o caso da Adenosina Deaminase (ADA), a qual realiza a deaminação irreversível de adenosina em inosina (BOISON et al., 2010). O papel modulador da ecto-ADA sobre a concentração extracelular de Adn, no entanto, parece ocorrer apenas em situações patológicas que culminam em um excesso de Adn fora da célula, como é sugerido a partir do K_m da enzima na faixa de $>50 \mu\text{M}$, muito acima da concentração basal de adenosina no espectro do nanomolar (VALE et al., 2005). Desse modo, o controle dos níveis de Adn no meio está mais relacionado à maquinaria de liberação e captação do que aos sistemas de degradação.

1.3.2 - MODULAÇÃO NEUROQUÍMICA DA LIBERAÇÃO DE ADENOSINA

Devido à complexidade do sistema adenosinérgico e às múltiplas origens celulares da Adn, a liberação desse nucleosídeo é geralmente avaliada por métodos *in vitro* que permitem isolar um tipo celular específico e induzir uma resposta controlada a um certo estímulo (LATINI E PEDATA, 2001). Dessa forma, foi demonstrado que purinas como a adenosina podem ser liberadas em cultura primária de astrócitos a partir de estimulação elétrica por uma via independente de Na^+ e sensível a verapamil, um inibidor de canais de cálcio dependente de voltagem do tipo L (CACIAGLI et al., 1988). O glutamato, um outro agente excitatório, também foi demonstrando como capaz de induzir a liberação de Adn a partir da ativação de receptores ionotrópicos permeáveis a íons Na^+ e Ca^{2+} , como AMPA, Kainato e NMDA (CRAIG E WHITE, 1993; NGUYEN et al., 2017).

Ballerini e colaboradores demonstraram que a modulação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} em astrócitos primários é um dos principais, se não o principal, mecanismo de indução de liberação de purinas como ATP e adenosina, sugerindo que sinalizadores capazes de modular esse íon possam regular o transporte de Adn. Sustentando essa hipótese, foi observado que o glutamato é capaz de induzir a liberação de ATP e de adenosina por vias dependentes de Ca^{2+} intra e/ou extracelular (BALLERINI et al., 1992; CRAIG E WHITE; 1993; BALLERINI et al., 1995; QUEIROZ et al., 1997; YAMASHIRO E MORITA, 2017; NGUYEN et al., 2017). Foi demonstrado também que o GABA induz um efluxo de ATP de astrócitos e subsequente formação extracelular de adenosina a partir da ação de ecto-nucleotidases, corroborando um papel modulador GABAérgico sobre a concentração de adenosina no meio. A avaliação do mecanismo de

ação do GABA demonstrou que ele indiretamente promove a ativação do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ em células astrocíticas, o que culmina em um influxo de Ca^{2+} que reverbera na liberação de ATP e adenosina (BODDUM et al., 2016).

A conjectura de dados na literatura sugere que os níveis extracelulares de Adn podem ser modulados por agentes neuroquímicos capazes de controlar os níveis intracelulares de Ca^{2+} em astrócitos, permitindo a dedução de novos sinalizadores capazes de regular a liberação de adenosina por essas células. Ademais, como foi discutido acima, o estado redox é capaz de modular a atividade de proteínas que controlam os níveis extracelulares de Adn, como os hemicanais, de tal forma que agentes redutores e potencialmente sinalizadores como a GSH podem ser possíveis reguladores da liberação de Adn.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial efeito modulador da GSH sobre os níveis extracelulares de adenosina em cultura primária de astrócitos corticais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a incubação de astrócitos primários com GSH é capaz de modular os níveis extracelulares de adenosina.

- Avaliar o efeito de outras moléculas tióis, como cisteína e N-acetilcisteína, e de antioxidantes, como o alfa tocoferol, sobre os níveis extracelulares de adenosina.
- Caracterizar a rota de liberação de adenosina a partir da incubação com bloqueador de transportador equilibrativo de nucleosídeo.
- Avaliar a dependência por Na^+ e Ca^{2+} sobre o possível efeito modulador da GSH nos níveis extracelulares de adenosina.
- Avaliar o efeito da GSH sobre a liberação dos neurotransmissores GABA e glutamato.
- Avaliar se o efeito da GSH sobre a liberação de glutamato depende de uma via Na^+ -dependente.
- Avaliar se o GABA (50 μM e 100 μM) induz a liberação de adenosina por astrócitos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS

Para realização das culturas, foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C entre o 0 e o 3º dia pós-natal (P0-P3), de acordo com o comitê de ética da Universidade Federal do Pará (CEPAE 140-13). O neocórtex dos animais foi dissecado em meio livre de cálcio e magnésio e dissociado mecanicamente com auxílio de um pipetador em DMEM+10% Soro Bovino Fetal. A suspensão de células resultantes desse processo foi utilizada para o plaqueamento em placas de 12 poços (3.5 cm^2) na densidade de 1.5×10^4 células por cm^2 . As células foram então mantidas em DMEM+10% SBF em estufa de CO_2 (37°C – 5% CO_2 /95% O_2). Foi realizada uma primeira troca de meio 24 horas após o plaqueamento, e depois a cada 3-4 dias *in vitro* – como descrito por BRAGA ET AL., (2019). As células atingiram confluência entre 12 e 15 dias *in vitro*, quando foram então

usadas para experimento (Figura 5). Estudos prévios do nosso grupo com imunofluorescência e citometria de fluxo demonstraram que esse método gera culturas com 90% de células positivas para GFAP, confirmando que o nosso procedimento fornece placas enriquecidas em astrócitos.

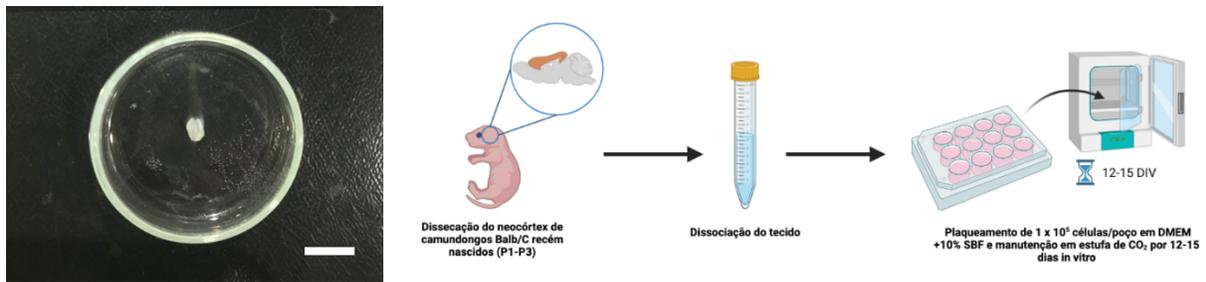


Figura 5. Fotografia do neocórtex de um camundongo neonato, utilizado para o preparo da cultura de células. Barra: 1 cm. Esquema geral do método de preparo das culturas puras de astrócitos. Barra de escala: 1 cm.

3.2 – ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GLUTAMATO E ADENOSINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA

Para quantificar os níveis extracelulares de glutamato, GABA e adenosina, as células foram lavadas 2x com tampão Hank (NaCl 128mM, KCl 6mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM, D-Glicose 12 mM, HEPES 20mM, pH: 7.2-7.4. 300 mOsm/L). As células foram incubadas com 400 µL desse tampão e mantidas em estufa de CO₂ (37°C, 5% CO₂/95% O₂) por diferentes tempos, dependendo do experimento a ser realizado. Finalizado o período de incubação, o tampão foi coletado, armazenado em tubos de plástico e congelado em -20°C para posterior dosagem por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE), como esquematizado na Figura 6.

O preparo de soluções sem sódio foi feito a partir da substituição equimolar de NaCl por LiCl. Experimentos sem cálcio foram realizados a partir da substituição de CaCl₂ por MgCl₂ (3 mM MgCl₂) e a suplementação de cálcio foi realizada a partir da quadruplicação (8 mM) na concentração de CaCl₂ no tampão. A osmolaridade das soluções foi avaliada e não houve alteração significativa entre elas.

Hank Na⁺	Hank Li⁺	Hank sem Ca²⁺	Hank Ca²⁺ 4x
NaCl 128 mM	LiCl 128 mM	NaCl 128 mM	NaCl 128 mM
KCl 4 mM	KCl 4 mM	KCl 4 mM	KCl 4 mM
CaCl ₂ 2 mM	CaCl ₂ 2 mM	- - -	CaCl ₂ 8 mM
MgCl ₂ 1 mM	MgCl ₂ 1 mM	MgCl ₂ 3 mM	MgCl ₂ 1 mM
D-Glicose 12 mM	D-Glicose 12 mM	D-Glicose 12 mM	D-Glicose 12 mM
HEPES 20 mM	HEPES 20 mM	HEPES 20 mM	HEPES 20 mM

Tabela 2. Composição dos diferentes tampões de Hank utilizados neste estudo. Para experimentos buscando avaliar a participação do Na⁺, o NaCl foi substituído de maneira equimolar por LiCl. O preparo de Hank sem Ca²⁺ foi feito a partir da retirada do CaCl₂ e substituição equimolar por MgCl₂. O preparo de Hank Ca²⁺ 4x foi feito a partir da quadruplicação na concentração de CaCl₂ (Tabela 2). A avaliação da osmolaridade não demonstrou alteração significativa.

Ensaio com bloqueadores farmacológicos foram realizados a partir de uma pré-incubação de 10 minutos em estufa de CO₂, seguido de uma lavagem e co-incubação com GSH 5 mM, de modo a avaliar a participação de algum componente celular sobre a ação da GSH.

Para dosagem dos analitos, foi utilizado um equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (Shimadzu, Japão) acoplado a um detector de fluorescência - para dosagem de glutamato - ou a um detector UV/Vis - para dosagem de adenosina. As amostras foram tratadas com ácido tricloroacético 1% para decantação de proteínas e então centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos. 300 µL de sobrenadante foi coletado para análise e 20 µL de Homoserina 100 µM foi adicionado em cada amostra como um padrão interno de controle de qualidade.

Para dosagem de aminoácidos, foi realizada derivatização com o o-ftaldeído (OPA 100 mM) por 5 minutos em tampão borato (pH: 9.5) como descrito anteriormente (MORAES et al., 2012, MORAES et al., 2022). O produto da reação foi injetado em um sistema CLAE, com gradiente para eluição da fase móvel (Tabela 3) composto por fase A tampão acetato de sódio 50 mM, metanol e propanol (95% de tampão acetato com pH 5,67; 5% de metanol e 12 mL de propanol para cada litro de fase A), e fase B metanol 70%, fluxo de 1,0 ml/min, eluição de 25 minutos, detector fluorescência, comprimento de onda de excitação 340 nm e emissão de 460 nm. Antes de cada corrida, uma solução padrão contendo glutamato, GABA e homoserina 100 µM foi injetada no equipamento de modo a determinar o tempo de retenção destes aminoácidos. A concentração de aminoácidos foi determinada a partir de uma curva de concentração previamente realizada.

Tempo (minutos)	Fase A (%)	Fase B (%)
0.01	100	0
10	70	30
20	50	50
25	100	0

Tabela 3. Gradiente de eluição para quantificação de glutamato e GABA por CLAE acoplada ao detector de fluorescência. As colunas representam um intervalo de tempo da corrida e a % de cada fase durante esse intervalo.

Para dosagem de adenosina, as amostras foram injetadas no equipamento e corridas em fluxo isocrático com metanol 70% por 10 minutos, com detecção a 240 nm. Antes de cada corrida, foi realizada a injeção de uma solução padrão contendo adenosina 10 μ M para determinar o tempo de retenção desta molécula. A concentração de adenosina foi determinada a partir de uma curva de concentração previamente realizada.

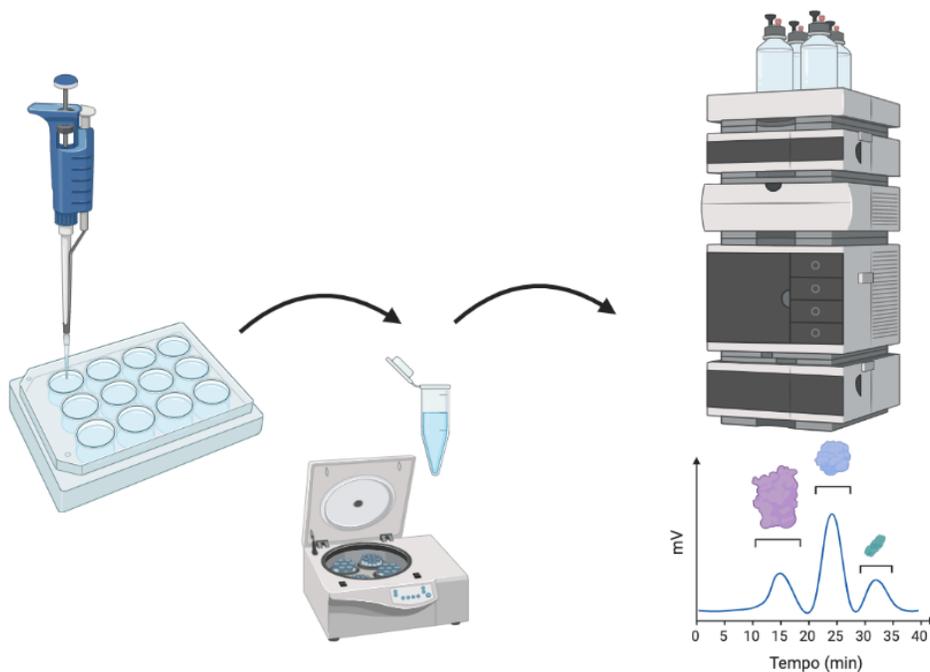


Figura 6. Representação esquemática do procedimento de coleta das amostras e preparo para análise no CLAE. Os tampões condicionados às células foram coletados e armazenados em tubos de plástico. Antes da dosagem, as amostras foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e preparado para injeção no equipamento de cromatografia. A avaliação da concentração das moléculas de interesse foi feita a partir da determinação prévia do tempo de retenção de cada molécula mais uma curva de concentração.

3.3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados durante o presente trabalho foram analisados no software GraphPad Prism 9.0. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo observada uma distribuição normal dos valores coletados. Para comparação entre múltiplos grupos, foi realizado o teste ANOVA de 1 via seguido do pós-teste de Tukey. A comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste T de Student. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando o valor de p foi inferior a 0.05.

4. RESULTADOS

4.1. A GSH MODULA OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE ADENOSINA EM CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS

Nossos dados demonstram que a incubação por 5 ou 20 minutos com GSH 5 mM aumenta os níveis extracelulares de Adn (CTRL: $100 \pm 12\%$ vs GSH 5mM, 5 minutos: 176 ± 18 vs GSH 5 mM, 20 minutos: $196 \pm 12\%$; $p < 0.001$). A retirada da GSH do meio resultou na retomada dos níveis basais de Adn (CTRL: $100 \pm 12\%$ vs GSH 5 mM, 25 minutos: $88 \pm 3\%$) (Figura 7)

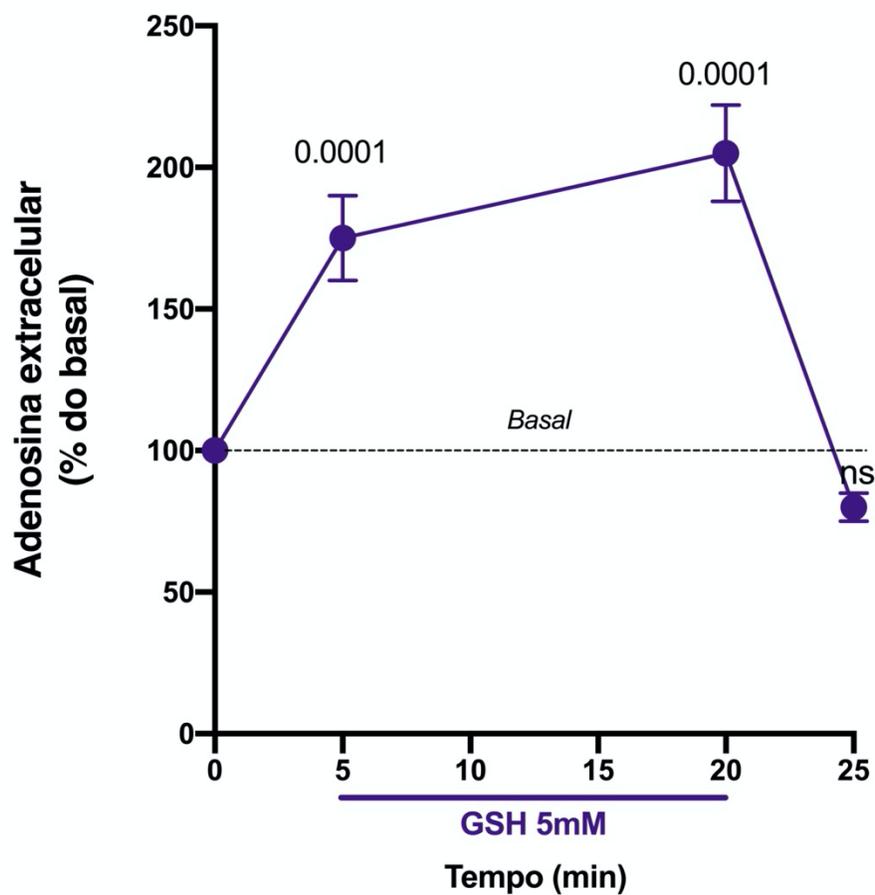


Figura 7. Avaliação temporal do efeito da GSH (5 mM) sobre a concentração extracelular de adenosina. Os astrócitos foram incubados com GSH por 5 minutos, sendo observado um aumento significativo nos níveis de adenosina no meio em relação ao basal. Esse aumento se manteve com 20 minutos de incubação. A remoção da GSH do meio de incubação fez os níveis de Adn retornarem aos valores do controle (ANOVA de 1 via seguido do pós-teste de *Tukey*. Valores acima dos pontos representam o valor de p; ns = não significativo).

4.2. O EFEITO DA GSH NÃO DERIVA DE UMA FUNÇÃO ANTIOXIDANTE GENERALIZADA, MAS DE UM MECANISMO DEPENDENTE DE -SH

Considerando que a GSH possui um grupamento -SH que lhe confere uma propriedade antioxidante, nos questionamos se o aumento na concentração extracelular de Adn decorreria de um efeito redox dependente ou não de -SH, capaz de favorecer um aumento no transporte de Adn para o meio. Para testar essa possibilidade, as células foram incubadas com os tióis cisteína (CYS) ou N-acetilcisteína (NAC) ou com o antioxidante α -tocoferol, todos na mesma concentração da GSH (5 mM). Nossos dados demonstram que o α -tocoferol não exerceu efeito nenhum sobre os níveis extracelulares de Adn (CTRL: $100\pm 6\%$ vs α -tocoferol: $101\pm 3\%$) (Figura 8A), descartando a participação de um efeito redox generalizado. Em contrapartida, tanto a CYS quanto a NAC reproduziram o efeito da GSH, promovendo um aumento no conteúdo de Adn no meio (CTRL: $100\pm 3\%$ vs NAC 5 mM: $147\pm 6\%$ vs CYS 5 mM: $169\pm 17\%$ vs GSH 5 mM: $169\pm 4\%$) (Figura 8B), sugerindo que um mecanismo dependente de -SH regula os níveis extracelulares de Adn.

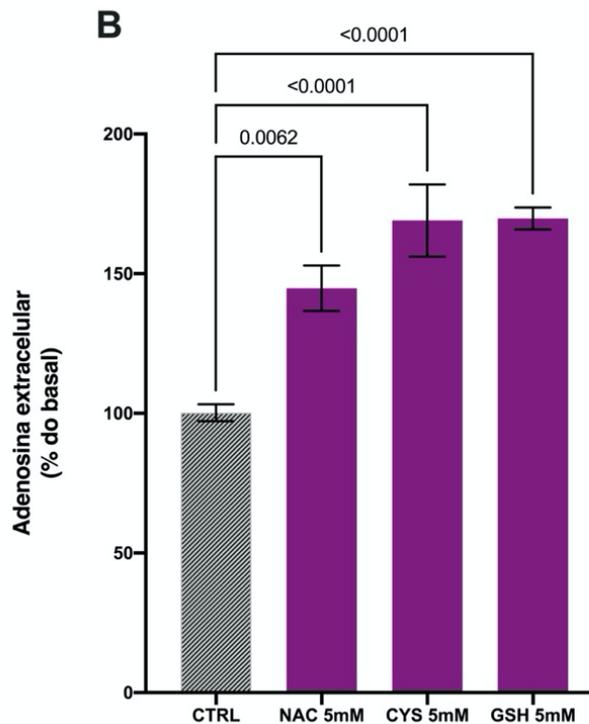
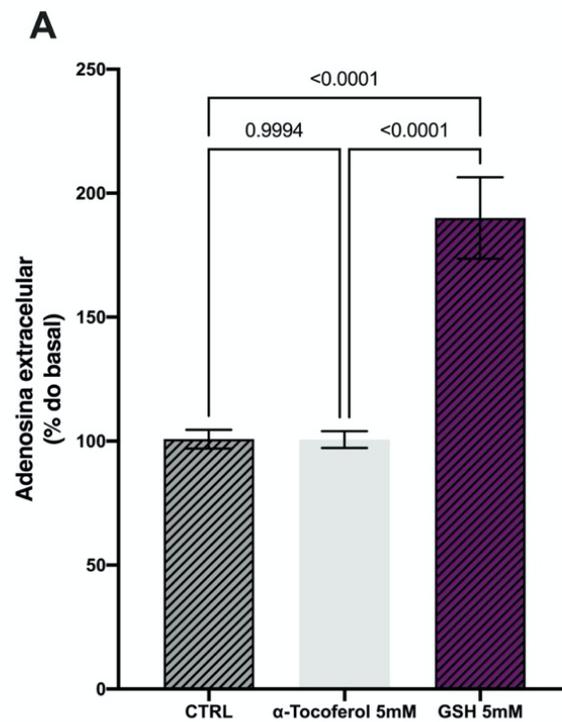


Figura 8. A) Avaliação do efeito do alfa-tocoferol (5 mM) sobre os níveis extracelulares de Adn. O tocoferol não exerceu ação nenhuma sobre a concentração de Adn no meio, já a GSH aumentou significativamente os valores. **B)** Análise do efeito de compostos tióis sobre a concentração extracelular de Adn. A cisteína (CYS, 5 mM) e a N-acetilcisteína (NAC, 5 mM) reproduziram o efeito da GSH, aumentando a concentração extracelular de Adn. (ANOVA de 1 via seguido do pós-teste de Tukey. Valores no gráfico representam o valor de p)

4.3. A GSH INDUZ UM AUMENTO NOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE ADENOSINA POR UMA VIA INDEPENDENTE DE TRANSPORTADORES EQUILIBRATIVOS DE NUCLEOSÍDEOS

A fim de avaliar a participação dos transportadores equilibrativos de Adn sobre o efeito da GSH, as células foram pré-incubadas com dipiridamole (DIP, 10 μ M), um bloqueador dos dois principais subtipos de transportadores equilibrativos de nucleosídeos expressos em astrócitos primários: O subtipo 1 e o subtipo 2. Nossos resultados demonstram que o bloqueio dessas proteínas diminui os níveis extracelulares de Adn (CTRL: 100 \pm 5% vs DIP 10 μ M: 73 \pm 9%) (Figura 9). No entanto, o bloqueio desses carreadores não interferiu no efeito da GSH sobre os níveis extracelulares de Adn, de forma que descartamos uma participação dos ENTs sensíveis a DIP no mecanismo de ação da GSH (CTRL: 100 \pm 5% vs DIP 10 μ M: 73 \pm 9%; GSH 5 mM: 149 \pm 7% vs GSH 5 mM + DIP 10 μ M: 161 \pm 21%) (Figura 9).

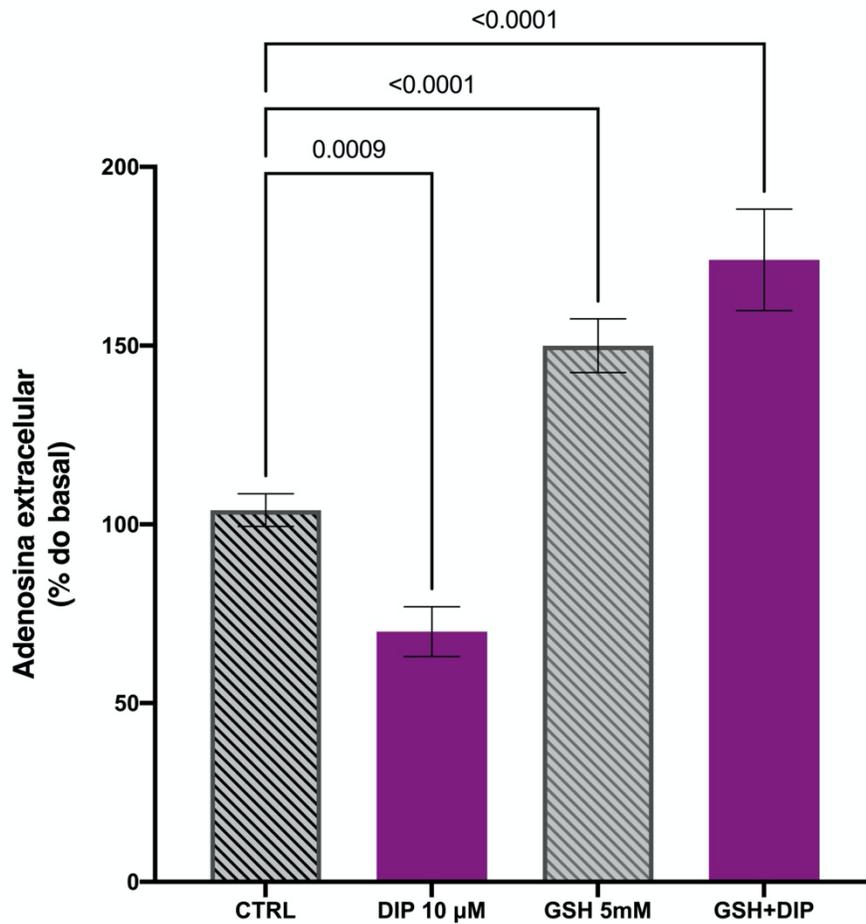


Figura 9. Avaliação do bloqueio dos transportadores equilibrativos de nucleosídeos 1 e 2 por dipiridamol (DIP, 10 μ M) sobre o efeito da GSH (5 mM) nos níveis extracelulares de Adn. O DIP sozinho diminuiu a concentração de Adn no meio, mas não exerceu efeito nenhum sobre a ação da GSH (ANOVA de 1 via seguido do pós-teste de Tukey. Valores acima dos gráficos representam o valor de p).

4.4. O EFEITO MODULADOR DA GSH SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE ADENOSINA É INDEPENDENTE DE Na⁺ E Ca²⁺

Ainda com o objetivo de caracterizar o mecanismo por trás do efeito da GSH, decidimos testar a participação de íons Na⁺ e Ca²⁺ sobre o aumento nos níveis extracelulares de Adn. Nossos dados demonstram que a ausência de Na⁺ no meio não interfere de maneira significativa nos níveis extracelulares de Adn (CTRL COM SÓDIO: 100±8% vs CTRL SEM SÓDIO: 118±13%). Ademais, a omissão de Na⁺ do meio de incubação não bloqueou a ação da GSH sobre a liberação de Adn, descartando uma via Na⁺-dependente (CTRL COM SÓDIO: 100±8% vs CTRL SEM SÓDIO: 118±13% vs GSH 5 mM COM SÓDIO: 181±16% vs GSH 5 mM SEM SÓDIO: 198±24%) (Figura 10).

Para avaliar a participação de uma via dependente de cálcio, as células foram incubadas com solução livre de Ca²⁺ (Figura 11A) ou com tampão contendo quatro vezes a concentração basal desse cátion (8 mM) (Figura 11B). Nenhuma das duas situações experimentais alterou os níveis basais de Adn (CTRL: 100±2% vs GSH 5 mM: 163±18% vs CTRL, MEIO LIVRE DE CÁLCIO: 82±17% vs GSH 5 mM, MEIO LIVRE DE CÁLCIO: 166±12%; CTRL, CÁLCIO 8 mM: 86±11% vs GSH 5 mM, CÁLCIO 8 mM: 154±16%), assim como não influenciaram no efeito da GSH. Desse modo, descartamos que a GSH esteja agindo por um mecanismo dependente desses cátions no meio extracelular.

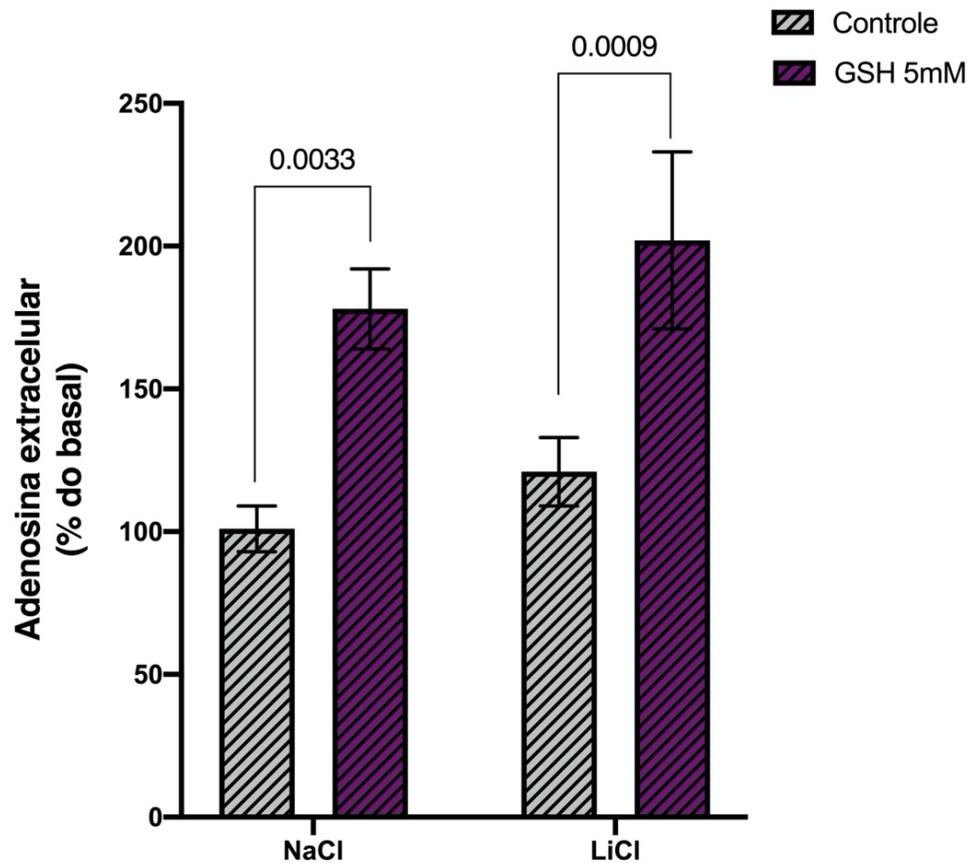


Figura 10. Análise do efeito da GSH em meio com (NaCl) ou sem sódio (LiCl). A remoção do sódio do meio de incubação não influenciou na ação da GSH sobre os níveis extracelulares de Adn, descartando a participação de uma via Na^+ -dependente (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey, Valores no gráfico representam o valor de p).

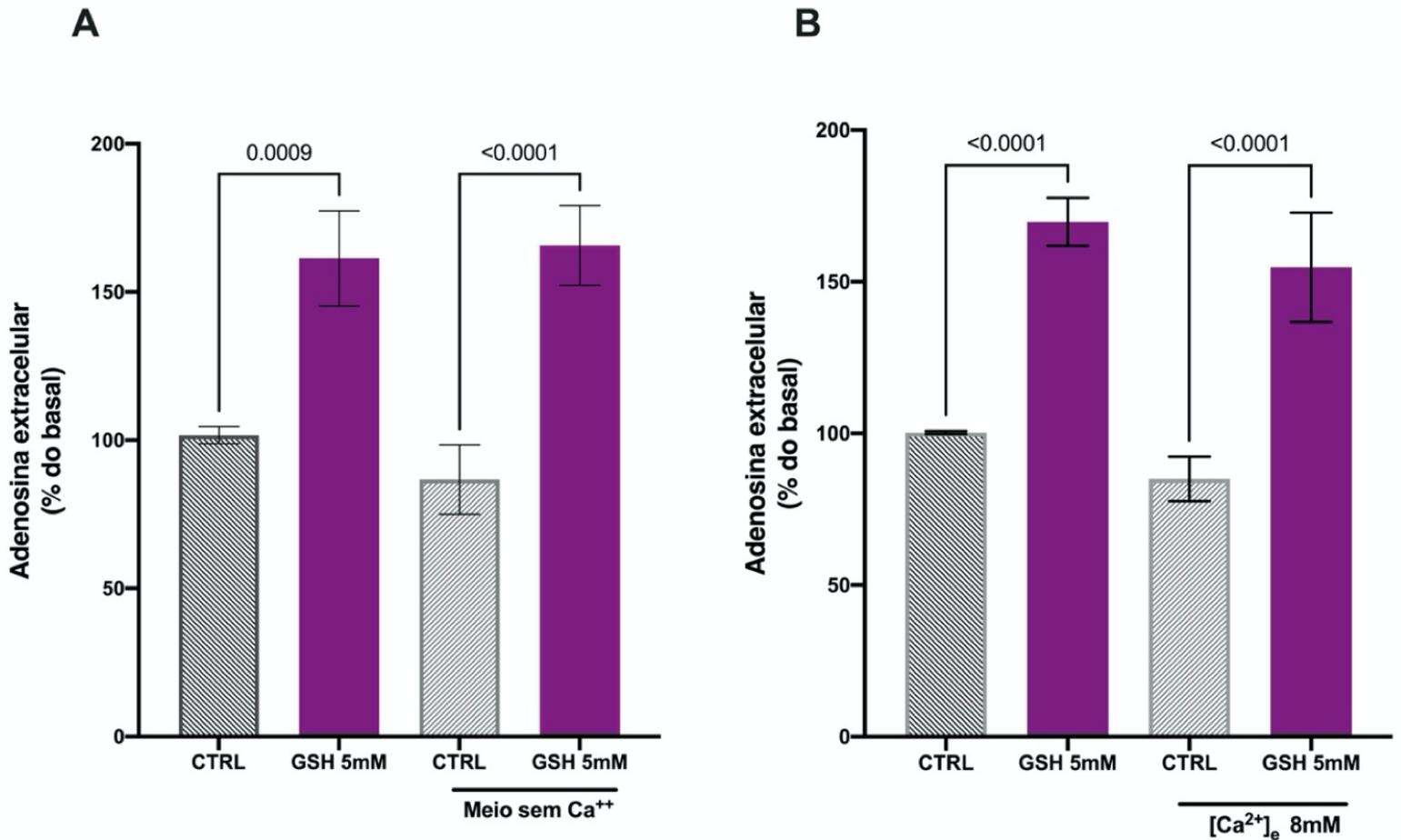


Figura 11. Avaliação da participação do Ca²⁺ extracelular sobre o efeito da GSH nos níveis extracelulares de Adn. **A)** A remoção de Ca²⁺ do meio não influenciou na liberação de Adn evocada por GSH 5 mM. **B)** A suplementação do meio com Ca²⁺ não interferiu no efeito da GSH sobre os níveis extracelulares de Adn. (ANOVA de 1 via, Valores no gráfico representam o valor de p).

4.5. O EFEITO DA GSH SOBRE A LIBERAÇÃO DE ADENOSINA É INDEPENDENTE DE UMA MODULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA OU GABAÉRGICA

Uma vez que já foi descrito um papel modulador do glutamato e do GABA sobre os níveis extracelulares de adenosina, avaliamos se o efeito da GSH poderia derivar de uma ação indireta a partir da liberação desses dois sinalizadores.

Os nossos dados demonstram que a GSH (5 mM) aumenta significativamente o conteúdo de glutamato no meio de incubação (CTRL: $100 \pm 4\%$ vs GSH 5 mM: $978 \pm 131\%$) (Figura 12). No entanto, diferente do que foi observado na resposta adenosinérgica, o efeito da GSH sobre a concentração de glutamato extracelular foi completamente mitigado na ausência de Na^+ , descartando uma correlação entre esse neurotransmissor e a adenosina (CTRL NaCl: $100 \pm 4\%$ vs GSH 5 mM, NaCl: $978 \pm 131\%$ vs CTRL LiCl: $23 \pm 6\%$ vs GSH 5 mM, LiCl: $39 \pm 8\%$) (Figura 12).

Observamos também um aumento significativo nos níveis de GABA a partir da incubação com GSH (CTRL: $100 \pm 24\%$ VS GSH 5 mM: $176 \pm 33\%$) (Figura 13A). Para avaliar se esse neurotransmissor tem o potencial de induzir um efluxo de Adn no nosso modelo experimental, incubamos os astrócitos com GABA (50 e 100 μM) por cinco minutos e quantificamos o conteúdo de Adn no meio de incubação. Observamos que as células incubadas com GABA apresentavam os mesmos níveis extracelulares de Adn em comparação ao grupo controle (CTRL: $100 \pm 27\%$ vs GABA 50 μM : $98 \pm 44\%$ vs GABA 100 μM : $89 \pm 28\%$) (Figura 13B), de modo que descartamos um efeito modulador GABAérgico por trás da ação da GSH.

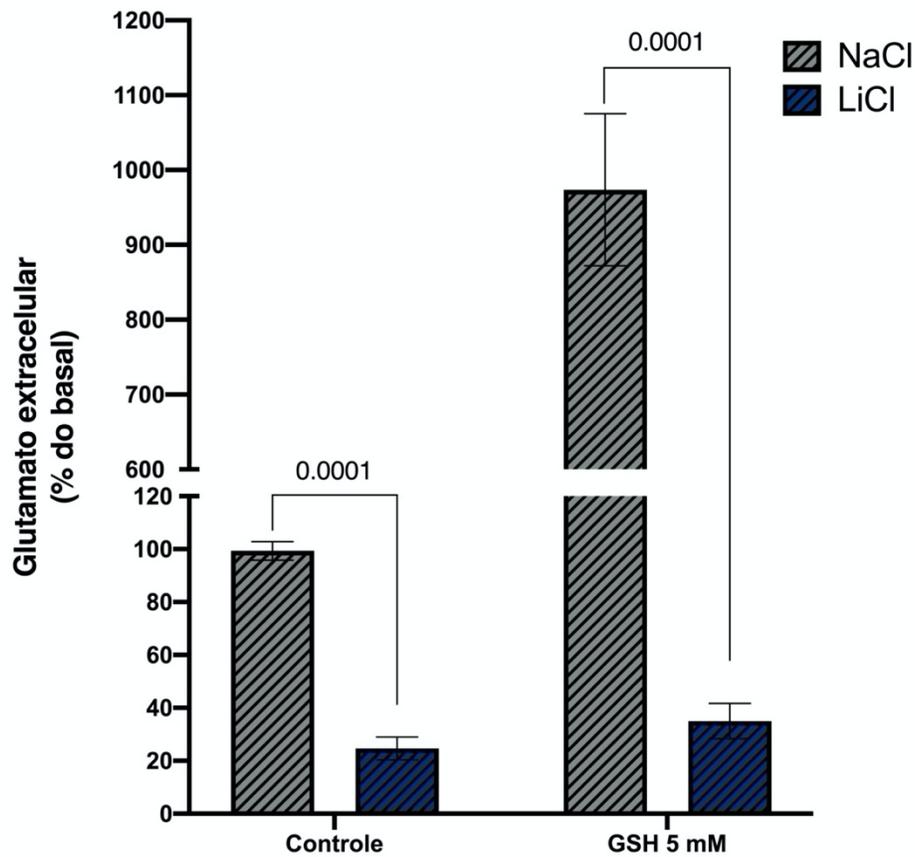


Figura 12. O efeito modulador da GSH sobre os níveis extracelulares de glutamato depende de Na⁺ no meio. Na presença de NaCl, a GSH induz um aumento de mais de 1000% sobre a concentração de glutamato no meio. A remoção do Na⁺ (Substituição por LiCl) mitiga o efeito da GSH (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey, valores no gráfico representam o valor de p).

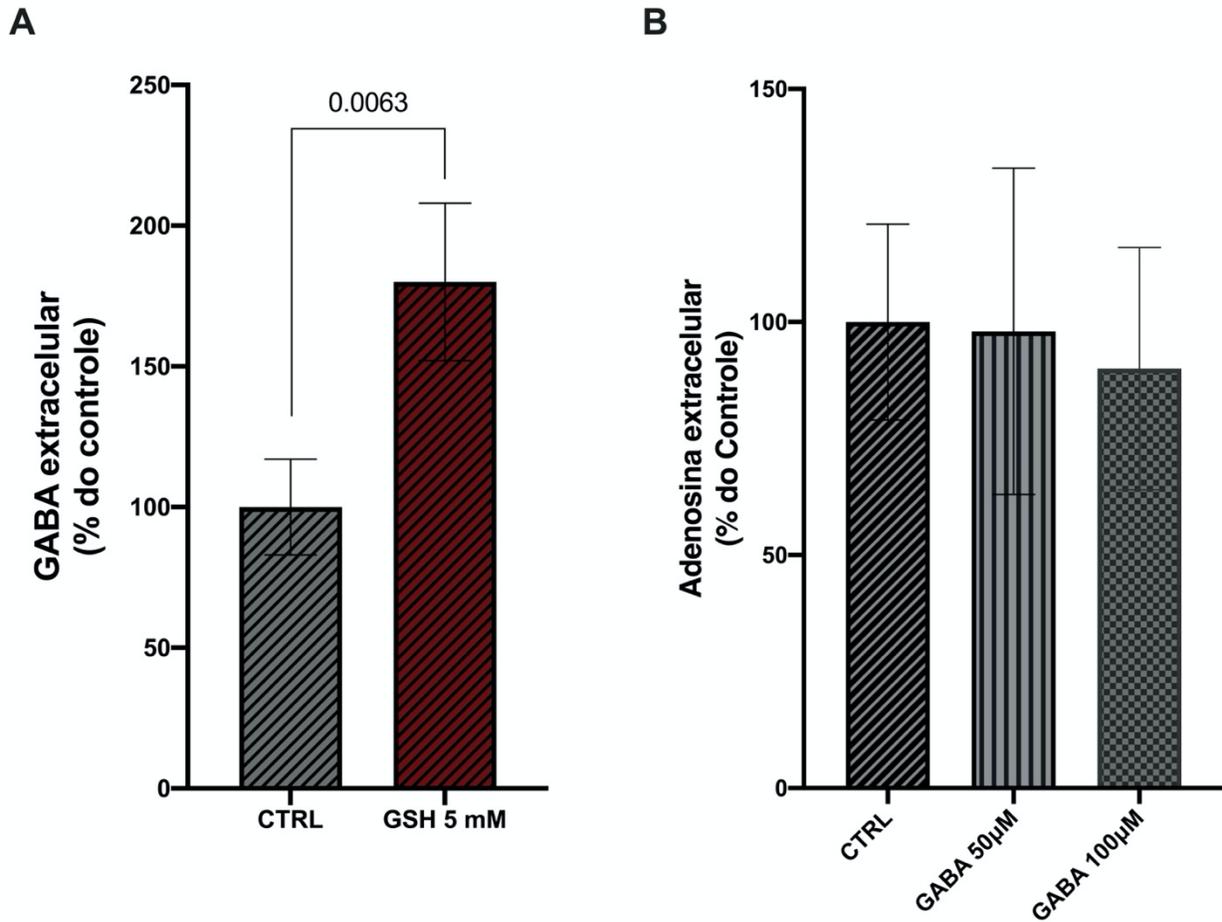


Figura 13. Efeito da GSH sobre a liberação de GABA e avaliação de um papel GABAérgico sobre os níveis extracelulares de Adn. **A)** A GSH (5 mM) induz um aumento nos níveis extracelulares de GABA em cultura primária de astrócitos corticais (Teste T de Student. Valor no gráfico representa o valor de p). **B)** O GABA (50 e 100 µM) não modula os níveis extracelulares de Adn em astrócitos primários corticais (ANOVA de 1 via, seguido do pós-teste de Tukey. Não houve diferença significativa entre os grupos).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou, pela primeira vez, um efeito modulador da GSH sobre os níveis extracelulares de Adn em cultura primária de astrócitos corticais, agregando a literatura sobre a GSH ser um modulador da sinalização celular no SNC. Nesta seção será discutido algumas das implicações que os resultados aqui expostos podem ter para fisiologia da glia e para o entendimento da ação moduladora da glutathiona.

5.1. O EFEITO DA GSH SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE ADENOSINA

A demonstração de que a GSH induz um aumento nos níveis extracelulares de adenosina corrobora que astrócitos primários dispõem de um componente sensível a esse tripeptídeo, o qual responde induzindo a liberação de Adn. Esse achado dá suporte à hipótese de que a GSH é capaz de modular a fisiologia da glia do neocórtex, como já foi descrito em células gliais da retina (FREITAS et al., 2016) e sustenta um papel à GSH na sinalização celular. A caracterização do componente por trás do efeito da GSH sobre a $[Adn]_e$ demonstra que estamos lidando com um mecanismo independente de Na^+ e Ca^{2+} no meio, o que sugere que o fenômeno descrito não deriva da modulação de um canal iônico de membrana capaz de estimular a liberação de Adn, que é o mecanismo de ação de outros moduladores do efluxo de Adn, como o glutamato, determinado a partir de ensaios utilizando agonistas de receptores ionotrópicos NMDA e AMPA (CRAIG E WHITE, 1993).

Uma das principais propriedades da GSH é a sua função antioxidante. Desse modo, o mecanismo de ação desse tripeptídeo poderia perpassar uma ação redox

generalizada que poderia favorecer a liberação de Adn – sendo este portanto um possível mecanismo por trás do efeito descrito no presente trabalho. Para avaliar essa possibilidade, foram realizados ensaios com astrócitos neocorticais na presença do antioxidante lipídico α -tocoferol. A dosagem de Adn no meio não demonstrou diferença entre o grupo α -tocoferol e o grupo controle, rejeitando a hipótese de que uma ação antioxidante generalizada possa estar por trás da regulação da liberação de Adn. Dessa forma, a ação da GSH é diferenciada frente a outros antioxidantes, o que já foi descrito em outras preparações do SNC e sustenta um papel à GSH dissociado de sua função redox (JANÁKY et al., 2000). Nesse mesmo contexto, foi demonstrado que a GSH pode agir por vias dependentes e independentes de seu grupamento sulfidril, a partir da conjugação direta com proteínas de membrana ou a partir da ligação a receptores ionotrópicos glutamatérgicos, respectivamente (OJA, 1998). Dessa forma, avaliamos a participação do grupamento sulfidril no efeito da GSH a partir da incubação dos astrócitos primários com outras duas moléculas da classe dos tióis: A CYS e a NAC. Ambas as moléculas dispõem de um grupamento -SH em sua estrutura e, portanto, partimos do princípio que se o mecanismo por trás da ação da GSH depender do grupo -SH, tanto a CYS quanto a NAC estimulariam a liberação de Adn. Os resultados obtidos demonstraram que a GSH, a NAC e CYS possuem o mesmo efeito sobre os níveis extracelulares de Adn, aumentando o conteúdo desse nucleosídeo no meio, sugerindo uma ação dependente de sulfidril. A partir da literatura, é plausível supor, portanto, que a GSH possa estar modificando estruturalmente proteínas de modo a alterar a sua atividade e, desse modo, estimular o efluxo de Adn. Esse argumento é sustentado por evidências demonstrando que mecanismos dependentes de -SH da GSH modulam a

atividade de canais iônicos, caso do receptor NMDA, que tem a sua atividade potencializada a partir da conjugação da GSH a sítios em seu ionoporo, um efeito reproduzido por outros tióis. Já foi demonstrado também que receptores rianodina localizados no retículo endoplasmático são sensíveis a flutuações nos níveis de tióis dentro da célula, de forma que a incubação de células com moléculas como a GSH, a NAC ou o dithiothreitol (DTT) – todos da mesma classe química – estimula ondas citosólicas de cálcio (THORN et al., 1999; ZABLE et al., 1997; SUN et al., 2008). Todas essas funções dependem de uma interação direta da GSH com uma estrutura proteica, e a partir disso optamos por investigar se o efeito da GSH estaria associado a uma modificação nos transportadores de Adn que favorecesse a cinética de liberação.

Estudos prévios demonstraram que os ENTs podem assumir uma conformação unidirecional que favorece apenas o efluxo de Adn, de modo que o efeito da GSH poderia estar associado a indução dessa conformação e consequente liberação do nucleosídeo (PAES-DE-CARVALHO et al., 2005). Os nossos ensaios utilizando o dipiridamole demonstraram que os ENTs são responsáveis por 20 a 30% dos níveis extracelulares de Adn, um papel relativamente prevalente desse sistema de transporte. O bloqueio prévio dos ENTs, no entanto, não interferiu no efeito da GSH sobre a $[Adn]_e$, sugerindo que esses transportadores não são responsáveis por esse efluxo de Adn. Como hipóteses alternativas para explicar esses dados, é importante considerar que o dipiridamole é um bloqueador seletivo dos ENTs 1 e 2, de modo que o efeito da GSH poderia derivar de uma ação sobre os transportadores 3 e 4, os quais são insensíveis a essa droga. No entanto, nós descartamos essa hipótese pois a caracterização do transporte de Adn em astrócitos primários demonstrou a ausência dos ENTs 3 e 4 nesse modelo, de modo que

o dipiridamole consegue bloquear >80% do transporte de Adn nessas células, sendo os 20% restantes derivado da ação dos CNTs (PENG et al., 2004; PARKINSON et al., 2005).

Outra possibilidade ainda envolvendo os carreadores de nucleosídeos seria um efeito inibitório da GSH sobre os CNTs, diminuindo a captação de Adn e – consequentemente – resultando em um acúmulo dessa molécula no meio extracelular. No entanto, é importante considerar que um eventual bloqueio dos CNTs seria compensado pelos ENTs. Além disso, o bloqueio da atividade dos CNTs a partir da remoção do Na⁺ do meio de incubação demonstrou um aumento não significativo de 20% nos níveis de adenosina extracelular, o que foi sinérgico com o efeito da GSH em meio sem sódio – o qual sofreu um acréscimo de 20%, sugerindo que a GSH opera por uma via independente dos CNTs.

Uma possível alternativa de mecanismo seria a via descrita por Martin e colaboradores (2007) em cultura primária de astrócitos corticais, sensível a um aumento nos níveis extracelulares de Ca²⁺. Nossos dados, no entanto, demonstram que o incremento na concentração desse cátion divalente no tampão de incubação não interferiu no efeito da GSH sobre os níveis de Adn no meio, descartando que esse mecanismo impere no fenômeno observado.

A partir da literatura e considerando uma ausência da participação da via de carreadores e da via dependente de altos níveis de Ca²⁺, nós sugerimos que a GSH esteja modulando os níveis extracelulares de Adn por meio da liberação de nucleotídeos como o ATP, ADP e AMP, e investigações futuras irão focar em avaliar esse possível mecanismo. Sustentando a nossa hipótese, há evidências demonstrando que essa rota

representa a principal via de geração de Adn em astrócitos primários (DI IORI et al., 2002; PARKINSON E XIONG, 2004; MARTIN et al., 2007; BOISON et al., 2010; BODDUM et al., 2016), e os nossos achados suportam que 70% dos níveis extracelulares de Adn derivam do metabolismo de nucleotídeos, como evidenciado pelos dados com dipiridamole, onde há um bloqueio da via dependente de carreadores e permanência apenas da via independente, representada pela liberação de nucleotídeos.

O modelo proposto no presente trabalho é que a GSH estimula a liberação de nucleotídeos adenina, como ATP, ADP e AMP, os quais são convertidos em Adn a partir da ação de ecto-nucleotidases, um mecanismo similar ao que já foi sugerido a outros sinalizadores em regiões do SNC como o hipocampo, a exemplo do GABA, o qual é capaz de induzir a liberação de ATP de astrócitos hipocampais e, a partir disso, induzir um aumento transiente na concentração extracelular de Adn que culmina na ativação de receptores A1 com atividade inibitória (BODDUM et al., 2016). Em consonância com essa hipótese, estudos em preparações de retina embrionária sugeriram um potencial da GSH em induzir a liberação de ATP, o que foi evidenciado a partir de dados demonstrando que a GSH estimula ondas de cálcio em células de Müller em cultura a partir de um mecanismo que perpassa a ativação do receptor P2X7 de ATP (FREITAS et al., 2016). É plausível que uma maquinaria similar exista no neocórtex, de tal forma que a GSH estimule a liberação de ATP e isso culmine no aumento dos níveis de Adn extracelular.

Estudos futuros buscarão evidenciar qual seria o componente sendo modulado pela GSH responsável por induzir a liberação de ATP. Dentre as proteínas propostas, uma das principais são os hemicanais, os quais são proteínas de junção intercelular capazes de liberar uma gama de moléculas – dentre elas o ATP. Ensaios *in vitro*

demonstraram, inclusive, que a liberação desse nucleotídeo por hemicanais é expressiva, de tal forma que a modulação da atividade dessas proteínas pode resultar em uma alteração significativa no conteúdo de Adn no meio. A fundamentação da proposta dos hemicanais é baseada em estudos de cristalografia demonstrando que as conexinas, as quais são hemicanais responsáveis pela liberação de ATP em astrócitos, possuem domínios de cisteína que são sensíveis a variações redox em seus resíduos de sulfidril (RETAMAL et al., 2007; LEÓN-PARAVIC, 2014 ; RETAMAL et al., 2016). Foi demonstrado que compostos tíois redutores como o DTT e a GSH, por exemplo, aumentam a atividade de conexinas ao interagir com as ligações dissulfeto entre as cisteínas dos hemicanais (LEÓN-PARAVIC, 2014 ; RETAMAL et al., 2016), o que indiretamente sugere que modular o estado redox dessas proteínas culmina em uma maior liberação de ATP. Em consonância com isso, nossos dados demonstram que compostos tíois como a cisteína e a N-acetilcisteína induzem o mesmo efeito da GSH sobre a $[Adn]_e$, enquanto o antioxidante α -tocoferol não exerceu ação nenhuma sobre os níveis de Adn no meio, ratificando que estamos lidando com um componente sensível a compostos -SH.

Uma alternativa ao modelo de que a GSH esteja interferindo na maquinaria de liberação de ATP é a de uma modulação positiva das ecto-nucleotidases, as enzimas que catabolizam nucleotídeos em Adn, de modo a aumentar a concentração desse nucleosídeo no ambiente extracelular. No entanto, investigações sobre a ação da GSH em ecto-nucleotidases purificadas do encéfalo de bovinos demonstrou que esse tripeptídeo não influencia na atividade dessa proteína (LIU E SOK, 2000), o que nos faz

sustentar a hipótese de que a GSH regula a liberação e não a metabolização de nucleotídeos. A figura 13 esquematiza o modelo proposto.

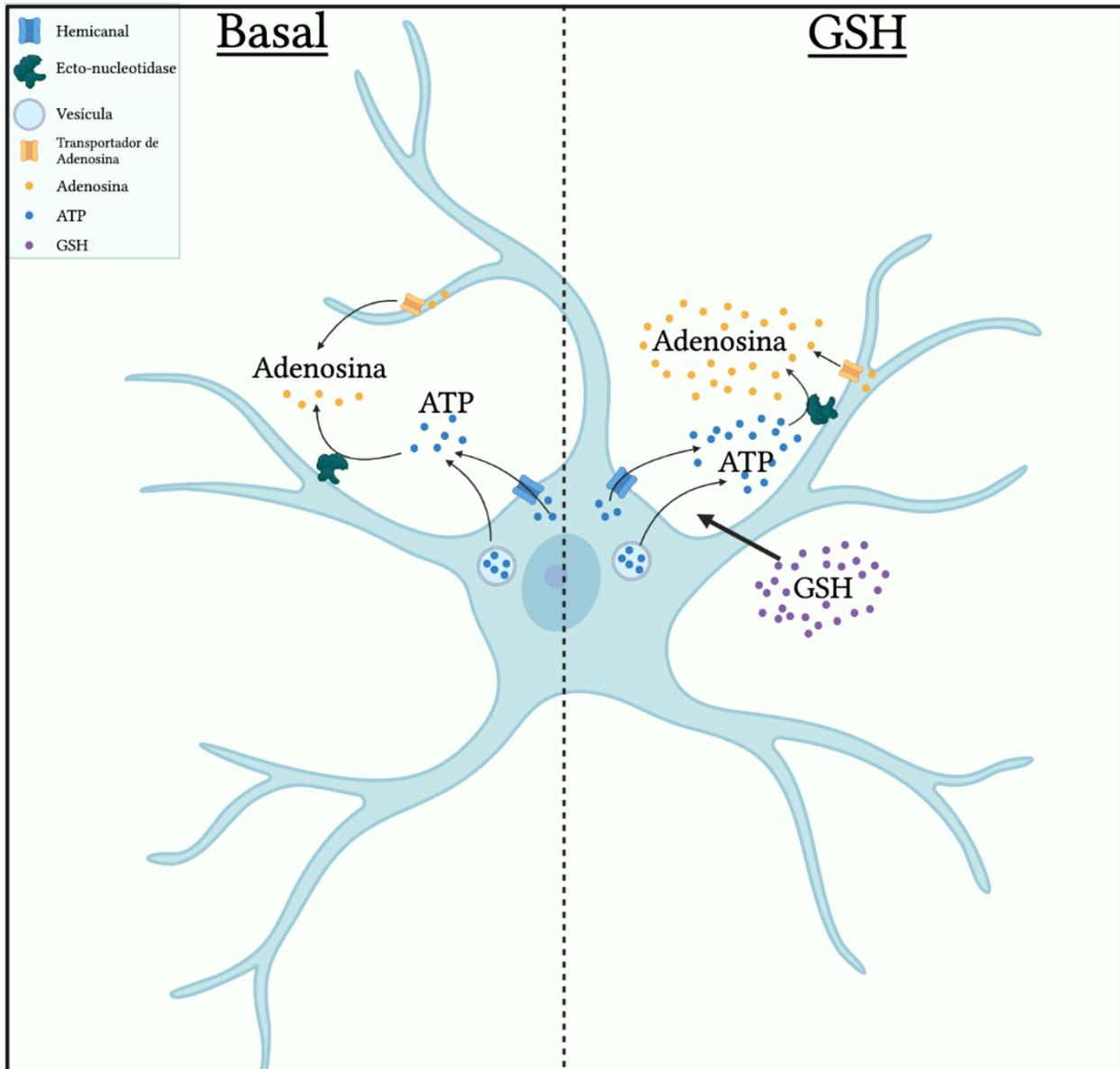


Figura 14. Esquema representativo do modelo proposta para ação da GSH. A adenosina pode ser liberada a partir da ação de transportadores equilibrativos de nucleosídeos ou formada extracelularmente a partir da degradação de ATP por ecto-nucleotidasas. *Esquerda:* Representação dos níveis extracelulares de adenosina de uma condição basal. *Direita:* Representação dos níveis extracelulares de adenosina na presença de um estímulo (GSH 5 mM). A GSH pode modular a liberação de ATP e, dessa forma, resultar em um aumento no conteúdo extracelular de adenosina.

A partir desse modelo, faz-se necessário buscar um sentido fisiológico para esse papel regulador da GSH. Já foi demonstrado que a Adn, a partir da ativação de receptores A1, modula negativamente a excitabilidade neuronal a fim de garantir a transmissão sináptica apropriada e evitar um possível dano excitotóxico (MARTIN et al., 2007; BODDUM et al., 2016; BRAGA et al., 2019). Dessa forma, é plausível supor que um aumento na atividade excitatória pode induzir um efluxo de GSH, que por sua vez promove um aumento na concentração extracelular de Adn para contrabalancear essa hiperexcitabilidade, seja para o ajuste fino da neurotransmissão excitatória seja para proteção contra um possível cenário excitotóxico.

É importante ressaltar, no entanto, que o sistema adenosinérgico é marcado pela ambiguidade, e da mesma forma que ele pode diminuir a liberação de glutamato e a transmissão excitatória, ele também pode facilitar o acúmulo extracelular desse aminoácido e induzir morte celular por apoptose (DI IORIO et al., 2002, MATOS et al., 2012, LOPES et al., 2021), de modo que não é trivial concluir um papel fisiológico a um modulador dos níveis de Adn sem a avaliação de outros parâmetros de resposta celular. De qualquer modo, independente da resposta eliciada pela Adn, o presente trabalho evidencia um papel modulador da GSH que pode ter repercussões na fisiologia ou fisiopatologia do SNC a partir da regulação do sistema adenosinérgico.

5.2 - EFEITO DA GSH SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GLUTAMATO

Os nossos dados demonstram que a GSH modula os níveis extracelulares de glutamato em cultura primária de astrócitos corticais, aumentando em até 10 vezes a

concentração desse aminoácido no meio de incubação. Considerando que o glutamato é um dos principais transmissores no Sistema Nervoso Central, sendo o mais abundante em sinapses excitatórias e um dos principais liberados pela glia, o efeito modulador da GSH sobre o transporte dessa molécula pode ter implicações mais profundas para fisiologia neural. Em astrócitos *in vitro* e *in vivo*, já foi demonstrado que o glutamato (100 μM) é capaz de induzir a ativação astrocítica avaliada por imunomarcação de c-fos e GFAP (EDLING et al., 2007; ROMÃO et al., 2008), dois fenômenos associados à maturação e reatividade astrocitária. Pelos nossos dados, a GSH conseguiu aumentar os níveis de glutamato no meio para $\cong 300 \mu\text{M}$, o que está dentro do espectro de concentrações que tem um efeito sobre a expressão dessas proteínas, gerando o questionamento se a GSH conseguiria modular esses fenômenos de ativação celular.

A liberação de glutamato mediada por GSH também levanta um possível papel para esse tripeptídeo no controle da excitabilidade celular, uma vez que o glutamato induz correntes excitatórias a partir da ativação de receptores ionotrópicos ou favorece a hiperpolarização neuronal por meio de certos subtipos de receptores metabotrópicos (MORAN et al., 2005; MOUSSAWI et al., 2021), sustentando um papel à GSH como um neuromodulador da transmissão sináptica (JANÁKY et al., 2000).

Um dos questionamentos sobre o efeito da GSH é por qual via ela estaria induzindo a liberação de glutamato. Os nossos dados sugerem a existência de um componente dependente de Na^+ que é responsável por $\cong 70\%$ dos níveis extracelulares de glutamato, como pode ser observado nos dados em meio contendo Li^+ . Da mesma forma, a incubação das células com GSH em meio sem Na^+ aboliu significativamente o efeito desse tripeptídeo, sugerindo que a glutatona opera por esse mecanismo Na^+ -

dependente. Um sistema responsável pela liberação de glutamato que bate com a nossa observação experimental é o sistema X_{AG} , o qual possui 5 subtipos: GLAST, GLT-1, EAAC1, EAAT4 e EAAT5, sendo os dois primeiros os predominantes em culturas primárias de astrócitos. Esses transportadores são capazes de realizar trocas entre o glutamato intracelular e um substrato no meio extracelular, fornecendo uma rota de liberação para esse aminoácido. Estudos com o L-trans-pyrrolidone-2, 4-dicarboxylate (PDC), o qual é um substrato do X_{AG} , demonstraram que essa molécula tem a capacidade de induzir a liberação de glutamato por astrócitos primários a partir de uma heterotroca com o glutamato (VOLTERRA et al., 1996). Nesse mesmo racional, foi demonstrado que compostos sulfidrilados podem ser substratos do X_{AG} e seriam capazes de realizar heterotroca com o glutamato, disponibilizando esse aminoácido para o meio (BOUVIER et al., 2007; GARCIA et al., 2011), de modo que a GSH possa estar sendo contratransportada com o glutamato.

Em suma, os nossos achados fornecem uma base para investigar novos mecanismos de ação da GSH na fisiologia astrocítica a partir da modulação glutamatérgica, com um potencial da GSH em regular processos de ativação e excitabilidade celular.

5.3 – O EFEITO DA GSH SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA

O efeito da GSH sobre a liberação de GABA já foi avaliado em outras preparações do sistema nervoso. Ensaios em fatias do hipocampo demonstraram que a GSH modula a liberação de [3 H]-GABA mediada por glutamato a partir de uma modulação redox

dependente de -SH a canais de cálcio sensíveis a verapamil (JANÁKY et al., 1994). Esse efeito modulador também foi observado em cultura mista e cultura purificada de glia da retina, demonstrando que a GSH induz a liberação de GABA endógeno e [³H]-GABA em concentrações no espectro do milimolar por um mecanismo parcialmente dependente de Na⁺. A partir de manipulações farmacológicas, foi demonstrado que o efeito da GSH sobre a liberação de [³H]-GABA depende da ativação de receptores P2X7 de ATP, sugerindo uma relação purinérgica-GABAérgica por trás da ação da GSH (FREITAS et al., 2016; FREITAS E REIS, 2017).

O significado fisiológico do efeito da GSH sobre a liberação de GABA na retina pode estar relacionado a um papel neuroprotetor desse tripeptídeo, característico do sistema GABAérgico contra a excitotoxicidade glutamatérgica (FREITAS et al., 2016). Ademais, a GSH é liberada a partir de *inputs* glutamatérgicos em células primárias da retina, de modo que um aumento na liberação de glutamato pode induzir um efluxo de GSH que estimularia o sistema GABAérgico a contrapor uma excessiva atividade glutamatérgica (GARCIA et al., 2011; FREITAS et al., 2017). Apesar desse modelo ser coerente, mais estudos são necessários para compreender o papel fisiológico da GSH enquanto um modulador da sinalização neural.

6. CONCLUSÕES

Em culturas primárias de astrócitos corticais, a GSH estimula um aumento nos níveis extracelulares de adenosina. A caracterização do possível mecanismo de ação da GSH demonstrou que esse efeito não é compartilhado por outros antioxidantes, como o

α -tocoferol, mas é mimetizado por tióis como a NAC e a CYS, sugerindo que a GSH atua por uma via dependente de seu grupamento sulfidril.

Demonstramos que o componente modulado pela GSH responsável por aumentar os níveis extracelulares de Adn não depende de Na^+ ou Ca^{2+} extracelular, e não perpassa a ativação dos transportadores equilibrativos de nucleosídeo. Ademais, ensaios quantificando os neurotransmissores GABA e glutamato sugerem que a ação da GSH não depende desses dois clássicos estimuladores da liberação de Adn, propondo-se que esse tripeptídeo seja capaz de sinalizar por um mecanismo própria uma via de modulação dos níveis extracelulares de Adn. Dessa forma, o presente trabalho conclui que os astrócitos do neocórtex dispõem de um componente sensível à GSH e sugere que essa molécula seja um sinalizador glial capaz de regular a gliotransmissão entre astrócitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. (2015). Kainic Acid, NMDA and Bicuculline Induce Elevation in Concentrations of Glutathione and Amino Acids in Vivo: Biomarkers for Seizure Predisposition?. **Journal of Behavioral and Brain Science**, 5, 163-172. doi: [10.4236/jbbs.2015.55017](https://doi.org/10.4236/jbbs.2015.55017).

SANTOS-RODRIGUES, A; PEREIRA, R; BRITO; DE OLIVEIRA, N; PAES-DE-CARVALHO, Chapter Fifteen - Adenosine Transporters and Receptors: Key Elements for Retinal Function and Neuroprotection. **Vitamins & Hormones**. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2014.12.014>

AOYAMA K. (2021). Glutathione in the Brain. **International journal of molecular sciences**, 22(9), 5010. <https://doi.org/10.3390/ijms22095010>

AQUILANO, K., BALDELLI, S., & CIRIOLO, M. R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. **Frontiers in pharmacology**, 5, 196. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196>

ARAQUE, A., & PEREA, G. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in culture. **Glia**, 47(3), 241–248. <https://doi.org/10.1002/glia.20026>

ARAQUE, A., PARPURA, V., SANZGIRI, R. P., & HAYDON, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends in neurosciences**, 22(5), 208–215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6)

BALLERINI, P., CICCARELLI, R., DI IORIO, P., GIULIANI, P., & CACIAGLI, F. (1995). Influence of Ca²⁺ channel modulators on [3H]purine release from rat cultured glial cells. **Neurochemical research**, 20(6), 697–704. <https://doi.org/10.1007/BF01705538>

BALLERINI, P., R. CICCARELLI, M. DI NAPOLI, P. DI IORIO, P. GIULIANI, F. CACIAGLI. (1992) Cytosolic calcium influence on purine release from cultured rat astrocytes. **Pharmacological Research** 25, pages 323-324.

BARRES B. A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron**, 60(3), 430–440.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013>

BEZZI, P., CARMIGNOTO, G., PASTI, L., VESCE, S., ROSSI, D., RIZZINI, B. L., POZZAN, T., & VOLTERRA, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. **Nature**, 391(6664), 281–285.
<https://doi.org/10.1038/34651>

BODDUM, K., JENSEN, T. P., MAGLOIRE, V., KRISTIANSEN, U., RUSAKOV, D. A., PAVLOV, I., & WALKER, M. C. (2016). Astrocytic GABA transporter activity modulates excitatory neurotransmission. **Nature communications**, 7, 13572.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13572>

BOISON, D., CHEN, J. F., & FREDHOLM, B. B. (2010). Adenosine signaling and function in glial cells. **Cell death and differentiation**, 17(7), 1071–1082.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2009.131>

BOUVIER, M., MILLER, B. A., SZATKOWSKI, M., & ATTWELL, D. (1991). Electrogenic uptake of sulphur-containing analogues of glutamate and aspartate by Müller cells from the salamander retina. **The Journal of physiology**, 444, 441–457.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018887>

BRAGA, D. V., WANDERLEY PICANÇO-DINIZ, D. L., HERCULANO MATOS OLIVEIRA, K. R., LUZ, W. L., SOARES DE MORAES, S. A., FONSECA PASSOS, A. C., DE JESUS OLIVEIRA BATISTA, E., GRISÓLIA, A., & HERCULANO, A. M. (2019). Adenosine A1 receptors modulate the Na⁺-Hypertonicity induced glutamate release in hypothalamic glial cells. **Neurochemistry international**, 126, 64–68.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.02.013>

BRANDES, N., SCHMITT, S., & JAKOB, U. (2009). Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. **Antioxidants & redox signaling**, 11(5), 997–1014. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2285>

BRITO, R., PEREIRA, M. R., PAES-DE-CARVALHO, R., & CALAZA, K. (2012). Expression of A1 adenosine receptors in the developing avian retina: in vivo modulation by A(2A) receptors and endogenous adenosine. *Journal of neurochemistry*, 123(2), 239–249. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07909.x>

BURKHARDT, P., & JÉKELY, G. (2021). Evolution of synapses and neurotransmitter systems: The divide-and-conquer model for early neural cell-type evolution. **Current opinion in neurobiology**, 71, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.11.002>

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. **Pharmacological research communications**, 20(11), 935–947. [https://doi.org/10.1016/s0031-6989\(88\)80122-x](https://doi.org/10.1016/s0031-6989(88)80122-x)

CORNELL-BELL, A. H., FINKBEINER, S. M., COOPER, M. S., & SMITH, S. J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. **Science (New York, N.Y.)**, 247(4941), 470–473. <https://doi.org/10.1126/science.1967852>. 1990

COVELO, A., & ARAQUE, A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. **eLife**, 7, e32237. <https://doi.org/10.7554/eLife.32237>

CRAIG, C. G., & WHITE, T. D. (1993). N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. **Journal of neurochemistry**, 60(3), 1073–1080. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03256.x>

DE REY-PAILHADE, J. (1888). Sur um corps d'origine d'organique hydrogenant de soufre a Froid. **C. R. Rendus Hebdom. Seances Acad. Sci.** 106, 1683-1684.

DI IORIO, P., KLEYWEGT, S., CICCARELLI, R., TRAVERSA, U., ANDREW, C. M., CROCKER, C. E., WERSTIUK, E. S., & RATHBONE, M. P. (2002). Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleosides in astrocytes. **Glia**, 38(3), 179–190. <https://doi.org/10.1002/glia.10055>

DRINGEN, R., GUTTERER, J. M., & HIRRLINGER, J. (2000). Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **European journal of biochemistry**, 267(16), 4912–4916. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01597.x>

DUARTE-ARAÚJO, M., NASCIMENTO, C., ALEXANDRINA TIMÓTEO, M., MAGALHÃES-CARDOSO, T., & CORREIA-DE-SÁ, P. (2004). Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A(2A) and extrajunctional inhibitory A(1) receptors. **British journal of pharmacology**, 141(6), 925–934. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705697>

EDLING, Y., INGELMAN-SUNDBERG, M., & SIMI, A. (2007). Glutamate activates c-fos in glial cells via a novel mechanism involving the glutamate receptor subtype mGlu5 and the transcriptional repressor DREAM. **Glia**, 55(3), 328–340. <https://doi.org/10.1002/glia.20464>

FOO, L. C., ALLEN, N. J., BUSHONG, E. A., VENTURA, P. B., CHUNG, W. S., ZHOU, L., CAHOY, J. D., DANEMAN, R., ZONG, H., ELLISMAN, M. H., & BARRES, B. A. (2011). Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. **Neuron**, 71(5), 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.022>

FARHY-TSELNICKER, I., & ALLEN, N. J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. **Neural development**, 13(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13064-018-0104-y>

FRADE, J., POPE, S., SCHMIDT, M., DRINGEN, R., BARBOSA, R., POCOCK, J., LARANJINHA, J., & HEALES, S. (2008). Glutamate induces release of glutathione from cultured rat astrocytes--a possible neuroprotective mechanism?. **Journal of neurochemistry**, 105(4), 1144–1152. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05216.x>

FRANCO, R., & CIDLOWSKI, J. A. (2012). Glutathione efflux and cell death. **Antioxidants & redox signaling**, 17(12), 1694–1713. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4553>

FREDHOLM B. B. (2010). Adenosine receptors as drug targets. **Experimental cell research**, 316(8), 1284–1288. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.004>

FREDHOLM, B. B., IJZERMAN, A. P., JACOBSON, K. A., LINDEN, J., & MÜLLER, C. E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. **Pharmacological reviews**, 63(1), 1–34. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003285>

FREITAS, H. R., & REIS, R. A. (2017). GLUTATHIONE INDUCES GABA RELEASE THROUGH P2X₇R ACTIVATION ON MÜLLER GLIA. **NEUROGENESIS** (AUSTIN, TEX.), 4(1), E1283188. [HTTPS://DOI.ORG/10.1080/23262133.2017.1283188](https://doi.org/10.1080/23262133.2017.1283188)

FREITAS, H. R., FERRAZ, G., FERREIRA, G. C., RIBEIRO-RESENDE, V. T., CHIARINI, L. B., DO NASCIMENTO, J. L., MATOS OLIVEIRA, K. R., PEREIRA, T., FERREIRA, L. G., KUBRUSLY, R. C., FARIA, R. X., HERCULANO, A. M., & REIS, R. A. (2016). Glutathione-Induced Calcium Shifts in Chick Retinal Glial Cells. **PloS one**, 11(4), e0153677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153677>

GARCIA, T. B., OLIVEIRA, K. R., DO NASCIMENTO, J. L., CRESPO-LÓPEZ, M. E., PIKANÇO-DINIZ, D. L., MOTA, T. C., & HERCULANO, A. M. (2011). Glutamate induces glutathione efflux mediated by glutamate/aspartate transporter in retinal cell cultures. **Neurochemical research**, 36(3), 412–418. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0356-3>

GOMES, F. C. et al. Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. **Braz.J Med. Biol. Res**, v.34, n.5, p.611-20, 2001 Review.

GUO, N., & SHAW, C. (1992). Characterization and localization of glutathione binding sites on cultured astrocytes. **Brain research. Molecular brain research**, 15(3-4), 207–215. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(92\)90110-w](https://doi.org/10.1016/0169-328x(92)90110-w)

HARADA, K., KAMIYA, T., & TSUBOI, T. (2016). Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. **Frontiers in neuroscience**, 9, 499. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00499>

HIRRLINGER, J., & DRINGEN, R. (2005). Multidrug resistance protein 1-mediated export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. **Methods in enzymology**, 400, 395–409. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00023-6)

HOPKINS, F. On Glutathione: A reinvestigation (1929). **Journal in Biological Chemistry**. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)77062-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)77062-2)

JANÁKY, R., DOHOVICS, R., SARANSAARI, P., & OJA, S. S. (2007). Modulation of [3H]dopamine release by glutathione in mouse striatal slices. **Neurochemical research**, 32(8), 1357–1364. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9315-z>

JANÁKY, R., OGITA, K., PASQUALOTTO, B. A., BAINS, J. S., OJA, S. S., YONEDA, Y., & SHAW, C. A. (1999). Glutathione and signal transduction in the mammalian

CNS. **Journal of neurochemistry**, 73(3), 889–902. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730889.x>

JANÁKY, R., VARGA, V., OJA, S. S., & SARANSAARI, P. (1994). Release of [3H]GABA evoked by glutamate agonists from hippocampal slices: effects of dithiothreitol and glutathione. **Neurochemistry international**, 24(6), 575–582. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0197-0186(94)90010-8)

KALININA, E., & NOVICHKOVA, M. (2021). Glutathione in Protein Redox Modulation through S-Glutathionylation and S-Nitrosylation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 26(2), 435. <https://doi.org/10.3390/molecules26020435>

KILLOY, K. M., HARLAN, B. A., PEHAR, M., HELKE, K. L., JOHNSON, J. A., & VARGAS, M. R. (2018). Decreased glutathione levels cause overt motor neuron degeneration in hSOD1^{WT} over-expressing mice. **Experimental neurology**, 302, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.01.004>

KUMAR, A., YEGLA, B., & FOSTER, T. C. (2018). Redox Signaling in Neurotransmission and Cognition During Aging. **Antioxidants & redox signaling**, 28(18), 1724–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7111>

LATINI, S., & PEDATA, F. (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of neurochemistry**, 79(3), 463–484. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00607.x>

LATINI, S., CORSI, C., PEDATA, F., & PEPEU, G. (1996). The source of brain adenosine outflow during ischemia and electrical stimulation. **Neurochemistry international**, 28(1), 113–118. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(95\)00062-d](https://doi.org/10.1016/0197-0186(95)00062-d)

LALSAMTHARA, J., & ABALLAY, A. (2022). The gut efflux pump MRP-1 exports oxidized glutathione as a danger signal that stimulates behavioral immunity and aversive

learning. **Communications biology**, 5(1), 422. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03381-1>

LEÓN-PARAVIC, C. G., FIGUEROA, V. A., GUZMÁN, D. J., VALDERRAMA, C. F., VALLEJOS, A. A., FIORI, M. C., ALTENBERG, G. A., REUSS, L., & RETAMAL, M. A. (2014). Carbon monoxide (co) is a novel inhibitor of connexin hemichannels. **The journal of biological chemistry**, 289(52), 36150–36157. [HTTPS://DOI.ORG/10.1074/JBC.M114.602243](https://doi.org/10.1074/JBC.M114.602243)

LIU, X. W., & SOK, D. E. (2000). Oxidative inactivation of brain ecto-5'-nucleotidase by thiols/fe²⁺ system. **NEUROCHEMICAL RESEARCH**, 25(11), 1475–1484. [HTTPS://DOI.ORG/10.1023/A:1007624125136](https://doi.org/10.1023/A:1007624125136)

LOPES, C. R., CUNHA, R. A., & AGOSTINHO, P. (2021). Astrocytes and Adenosine A_{2A} Receptors: Active Players in Alzheimer's Disease. **Frontiers in neuroscience**, 15, 666710. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.666710>

MA Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual review of pharmacology and toxicology**, 53, 401–426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>

MAHMOUD, S., GHARAGOZLOO, M., SIMARD, C., & GRIS, D. (2019). Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the cns by controlling the balance between glutamate uptake and release. **CELLS**, 8(2), 184. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/CELLS8020184](https://doi.org/10.3390/CELLS8020184)

MALARKEY, E. B., & PARPURA, V. (2008). Mechanisms of glutamate release from astrocytes. **Neurochemistry international**, 52(1-2), 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.06.005>

MARTÍN, E. D., FERNÁNDEZ, M., PEREA, G., PASCUAL, O., HAYDON, P. G., ARAQUE, A., & CEÑA, V. (2007). Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. **Glia**, 55(1), 36–45. <https://doi.org/10.1002/glia.20431>

MATOS, M., AUGUSTO, E., SANTOS-RODRIGUES, A. D., SCHWARZSCHILD, M. A., CHEN, J. F., CUNHA, R. A., & AGOSTINHO, P. (2012). Adenosine A2A receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. **Glia**, 60(5), 702–716. <https://doi.org/10.1002/glia.22290>

MINICH, T., RIEMER, J., SCHULZ, J. B., WIELINGA, P., WIJNHOLDS, J., & DRINGEN, R. (2006). The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. **Journal of neurochemistry**, 97(2), 373–384. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03737.x>

MORAES, E. R., GRISOLIA, A. B., OLIVEIRA, K. R., PICANÇO-DINIZ, D. L., CRESPO-LÓPEZ, M. E., MAXIMINO, C., BATISTA, E., & HERCULANO, A. M. (2012). Determination of glutamate uptake by high performance liquid chromatography (HPLC) in preparations of retinal tissue. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, 907, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.027>

MORAES, E., SANTOS-SILVA, M., GRISÓLIA, A. A., BRAGA, D. V., REIS LEÃO, L. K., BAHIA, C. P., SOARES DE MORAES, S. A., PASSOS, A. F., DE JESUS OLIVEIRA BATISTA, E., HERCULANO, A. M., & MATOS OLIVEIRA, K. (2022). High performance liquid chromatography-based method to analyze activity of GABA transporters in central nervous system. **Neurochemistry international**, 158, 105359. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105359>

MORAN, M. M., MCFARLAND, K., MELENDEZ, R. I., KALIVAS, P. W., & SEAMANS, J. K. (2005). Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor

presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 25(27), 6389–6393. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1007-05.2005>

MOUSSAWI, K., RIEGEL, A., NAIR, S., & KALIVAS, P. W. (2011). Extracellular glutamate: functional compartments operate in different concentration ranges. **Frontiers in systems neuroscience**, 5, 94. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00094>

MURAT, C. B., & GARCÍA-CÁCERES, C. (2021). Astrocyte Gliotransmission in the Regulation of Systemic Metabolism. **Metabolites**, 11(11), 732. <https://doi.org/10.3390/metabo11110732>

NEDERGAARD M. (1994). Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. **Science (New York, N.Y.)**, 263(5154), 1768–1771. <https://doi.org/10.1126/science.8134839>

NGUYEN, M. D., WANG, Y., GANESANA, M., & VENTON, B. J. (2017). Transient Adenosine Release Is Modulated by NMDA and GABA_B Receptors. **ACS chemical neuroscience**, 8(2), 376–385. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.6b00318>

OJA, S. S., JANÁKY, R., VARGA, V., & SARANSAARI, P. (2000). Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. **Neurochemistry international**, 37(2-3), 299–306. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(00\)00031-0](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(00)00031-0)

PAES-DE-CARVALHO, R. Adenosine as a signaling molecule in the retina: biochemical and developmental aspects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** [online]. 2002, v. 74, n. 3 [Accessed 22 June 2022] , pp. 437-451. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000300007>>. Epub 09 Oct 2002. ISSN 1678-2690. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000300007>.

PAES-DE-CARVALHO, R., DIAS, B. V., MARTINS, R. A., PEREIRA, M. R., PORTUGAL, C. C., & LANFREDI, C. (2005). Activation of glutamate receptors promotes a calcium-dependent and transporter-mediated release of purines in cultured avian retinal cells: possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. **Neurochemistry international**, 46(6), 441–451. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.12.005>

PARKINSON, F. E., & XIONG, W. (2004). STIMULUS- AND CELL-TYPE-SPECIFIC RELEASE OF PURINES IN CULTURED RAT FOREBRAIN ASTROCYTES AND NEURONS. **JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY**, 88(5), 1305–1312. [HTTPS://DOI.ORG/10.1046/J.1471-4159.2003.02266.X](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02266.x)

PARKINSON, F. E., XIONG, W., & ZAMZOW, C. R. (2005). Astrocytes and neurons: different roles in regulating adenosine levels. **Neurological research**, 27(2), 153–160. <https://doi.org/10.1179/016164105X21878>

PARPURA, V., BASARSKY, T. A., LIU, F., JEFTINIJA, K., JEFTINIJA, S., & HAYDON, P. G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**, 369(6483), 744–747. <https://doi.org/10.1038/369744a0>

PASCUAL, O., CASPER, K. B., KUBERA, C., ZHANG, J., REVILLA-SANCHEZ, R., SUL, J. Y., TAKANO, H., MOSS, S. J., MCCARTHY, K., & HAYDON, P. G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. **Science (New York, N.Y.)**, 310(5745), 113–116. <https://doi.org/10.1126/science.1116916>

PENG, L., HUANG, R., YU, A. C., FUNG, K. Y., RATHBONE, M. P., & HERTZ, L. (2005). Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. **Glia**, 52(1), 25–35. <https://doi.org/10.1002/glia.20216>

PURNELL, B., MURUGAN, M., JANI, R., & BOISON, D. (2021). The Good, the Bad, and the Deadly: Adenosinergic Mechanisms Underlying Sudden Unexpected Death in

Epilepsy. **Frontiers** in **neuroscience**, 15, 708304.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.708304>

QUEIROZ, G., GEBICKE-HAERTER, P. J., SCHOBERT, A., STARKE, K., & VON KÜGELGEN, I. (1997). Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. **Neuroscience**, 78(4), 1203–1208. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00637-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00637-9)

RETAMAL, M. A., GARCÍA, I. E., PINTO, B. I., PUPO, A., BÁEZ, D., STEHBERG, J., DEL RIO, R., & GONZÁLEZ, C. (2016). EXTRACELLULAR CYSTEINE IN CONNEXINS: ROLE AS REDOX SENSORS. **FRONTIERS IN PHYSIOLOGY**, 7, 1. [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FPHYS.2016.00001](https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00001)

RICE, M. E., & RUSSO-MENNA, I. (1998). Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. **Neuroscience**, 82(4), 1213–1223. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00347-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00347-3)

ROMÃO, L. F., SOUSA, V., NETO, V. M., & GOMES, F. C. (2008). Glutamate activates GFAP gene promoter from cultured astrocytes through TGF-beta1 pathways. **Journal of neurochemistry**, 106(2), 746–756. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05428.x>

SATARKER, S., BOJJA, S. L., GURRAM, P. C., MUDGAL, J., ARORA, D., & NAMPOOTHIRI, M. (2022). Astrocytic Glutamatergic Transmission and Its Implications in Neurodegenerative Disorders. **Cells**, 11(7), 1139. <https://doi.org/10.3390/cells11071139>

SAVTCHOUK, I., & VOLTERRA, A. (2018). Gliotransmission: Beyond Black-and-White. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 38(1), 14–25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017>

SIGEL, E., & STEINMANN, M. E. (2012). Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. **The Journal of biological chemistry**, 287(48), 40224–40231. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.386664>

SIRACUSA, R., FUSCO, R., & CUZZOCREA, S. (2019). Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. **Frontiers in pharmacology**, 10, 1114. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01114>

STEULLET, P., LAVOIE, S., KRAFTSIK, R., GUIDI, R., GYSIN, R., CUÉNOD, M., & DO, K. Q. (2008). A glutathione deficit alters dopamine modulation of L-type calcium channels via D2 and ryanodine receptors in neurons. **Free radical biology & medicine**, 44(6), 1042–1054. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.006>

SUN, J., YAMAGUCHI, N., XU, L., EU, J. P., STAMLER, J. S., & MEISSNER, G. (2008). Regulation of the cardiac muscle ryanodine receptor by O(2) tension and S-nitrosoglutathione. **Biochemistry**, 47(52), 13985–13990. <https://doi.org/10.1021/bi8012627>

VALE, M. R. et al. Characterization of adenosine deaminase (ADA) in Hemolymph of *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Biology** [online]. 2005, v. 65, n. 2 [Accessed 22 June 2022], pp. 371-376. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S1519-69842005000200022>>. Epub 28 Nov 2005. ISSN 1678-4375. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842005000200022>.

VOLTERRA, A., BEZZI, P., RIZZINI, B. L., TROTTI, D., ULLENSVANG, K., DANBOLT, N. C., & RACAGNI, G. (1996). The competitive transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2, 4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. **The European journal of neuroscience**, 8(9), 2019–2028. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01345.x>

WANG, X. F., & CYNADER, M. S. (2000). Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. **Journal of neurochemistry**, 74(4), 1434–1442. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0741434.x>

WALLIN, C., WEBER, S. G., & SANDBERG, M. (1999). Glutathione efflux induced by NMDA and kainate: implications in neurotoxicity?. **Journal of neurochemistry**, 73(4), 1566–1572. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0731566.x>

YAMASHIRO, K., FUJII, Y., MAEKAWA, S., & MORITA, M. (2017). Multiple pathways for elevating extracellular adenosine in the rat hippocampal CA1 region characterized by adenosine sensor cells. **Journal of neurochemistry**, 140(1), 24–36. <https://doi.org/10.1111/jnc.13888>

YAN, L., BURBIEL, J. C., MAASS, A., & MÜLLER, C. E. (2003). Adenosine receptor agonists: from basic medicinal chemistry to clinical development. **Expert opinion on emerging drugs**, 8(2), 537–576. <https://doi.org/10.1517/14728214.8.2.537>

ZABLE, A. C., FAVERO, T. G., & ABRAMSON, J. J. (1997). Glutathione modulates ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for redox regulation of the Ca²⁺ release mechanism. **The Journal of biological chemistry**, 272(11), 7069–7077. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.7069>

ZHANG, H., & FORMAN, H. J. (2012). Glutathione synthesis and its role in redox signaling. **Seminars in cell & developmental biology**, 23(7), 722–728. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.03.017>