

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ROBSON PACHECO

**PARTICIPAÇÃO DE ADENOSINA NO EFEITO DO NEUROPEPTÍDEO
S (NPS) SOBRE A LOCOMOÇÃO DE CAMUNDONGOS**

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROBSON PACHECO

**PARTICIPAÇÃO DE ADENOSINA NO EFEITO DO NEUROPEPTÍDEO
S (NPS) SOBRE A LOCOMOÇÃO DE CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título do mestre em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dr^a. Carina Rodrigues Boeck

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Elaine Cristina Gavioli

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P116p Pacheco, Robson.

Participação de adenosina no efeito do neuropeptídeo S (NPS) sobre a locomoção de camundongos / Robson Pacheco; orientadora: Carina Rodrigues Boeck. – Criciúma: Ed. do Autor, 2010.

65 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2010.

1. Adenosina. 2. Neuropeptídeos. 3. Atividade motora. I. Título.

CDD. 21^a ed. 616.8

Bibliotecária: Flávia Caroline Cardoso – CRB 14/840

Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a argüição da Dissertação de MESTRADO apresentado pela candidata Robson Pacheco sob o título “Participação de adenosina no efeito do neuropeptídeo S (NPS) sobre a locomoção de camundongos” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido ao candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 15 de janeiro de 2010.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Vanessa Andrade".
Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade
Membro Relator

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pedro Roosevelt Torres Romão".
Profa. Dra. Pedro Roosevelt Torres Romão
Membro Externo

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Patrícia Schuck".
Profa. Dra. Patrícia Fernanda Schuck
Membro Interno

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Carina Rodrigues Boeck".
Profa. Dra. Carina Rodrigues Boeck
Orientador

A handwritten signature in black ink, appearing to read "João Luciano de Quevedo".
Prof. Dr. João Luciano de Quevedo
Coordenador do PPGCS

Dedico este trabalho à minha esposa Andreza, que apesar das dificuldades encontradas durante este período, sempre esteve ao meu lado me apoiando e me mostrando o que de mais importante temos neste mundo: o amor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus. Obrigado Senhor, por me conduzires em um mundo cheio de tribulações, onde as pessoas se esquecem de te agradecer pelo dom mais sublime deste mundo: a vida!

À minha querida mãe, que apesar dos infortúnios da vida, sempre me apoiou e me incentivou a estudar e a me tornar um homem de bem;

À minha orientadora “Cari”, que me ensinou coisas que eu jamais havia estudado, e me fez ver a pesquisa com outros olhos;

À minha co-orientadora Elaine, que me fez entender o que era o NPS e que de forma paciente me orientou nos primeiros meses de curso;

Às meninas do laboratório, “Brunão” (Bruna Pescador), “Bruninha” (Bruna Mendonça), Leandra e Morgana. Meninas, sem vocês este trabalho jamais seria realizado!

Aos professores do PPGCS, vocês são ótimos! Obrigado pela atenção despendida nestes meses e por fazer da pesquisa em saúde algo tão apaixonante.

Às minhas queridas amigas Ivonete, Viviane e Maria Julia, que apesar da distância, tanto me ajudaram e me incentivaram nestes dois anos de estudo.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

“O que habita no esconderijo do Altíssimo e descansa à sombra do Onipotente diz ao Senhor: Meu refúgio e meu baluarte, Deus meu em quem confio”
(Salmos 91: 1 e 2)

RESUMO

A adenosina está presente em todos os tipos celulares e possui uma importante função na homeostase cerebral. No sistema nervoso central e periférico, observa-se seu papel neuromodulador; que ocorre com a ativação de seus receptores específicos, classificados em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. A adenosina extracelular surge de duas formas: (i) pela degradação dos nucleotídeos purinérgicos liberados, através da enzima ecto-5'-nucleotidase; e (ii) pela liberação como tal via transportador bidirecional. Pesquisas demonstram que a ativação de receptores de adenosina influencia a ação de neurotransmissores clássicos, como a dopamina, glutamato, acetilcolina, e de neuromoduladores, como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e o neuropeptídeo S (NPS). Dentre todos os neuropeptídeos já descobertos, o NPS se destaca por ter uma relação direta com o sistema adenosinérgico. De maneira geral, este peptídeo atua no sistema nervoso central como mensageiro e, comumente, modulando, assim como a adenosina, a função de outros neurotransmissores clássicos. Além disso, o NPS está envolvido na regulação da estimulação e resposta do medo, e no ciclo sono/vigília e na locomoção, assim como a adenosina. Por conseguinte, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do NPS sobre a atividade locomotora de camundongos que receberam ou não o inibidor da enzima ecto-5'-nucleotidase, e verificar a atividade de ecto-nucleotidases em estriado e hipocampo de animais tratados ou não com NPS. Para tal, foram utilizados camundongos CF-1, machos adultos, 3 meses de idade, e que tiveram implantada uma cânula guia no ventrículo cerebral lateral direito para infusão intra-cerebroventricular (i.c.v.) de 0,1 nmol de NPS (1µL) com ou sem o pré-tratamento de 1 nmol de α-β-metileno adenosina difosfato (AOPCP, 1µL), inibidor da ecto-5'-nucleotidase, para avaliação da atividade locomotora. Outro grupo de animais experimentais recebeu somente o NPS na dose de 0,1 nmol para posterior avaliação da atividade enzimática em fatias de tecido cerebral. Os animais que constituíram o grupo controle receberam apenas solução salina i.c.v. Os resultados demonstram que o pré-tratamento com AOPCP preveniu o efeito hiperlocomotor induzido por NPS em camundongos, sem apresentar efeito *per se*. O NPS na dose de 0,1 nmol foi eficiente em causar hiperlocomoção durante o período de observação dos animais na caixa de atividade. Quanto à atividade

enzimática, verificou-se que a administração de NPS não causou qualquer modificação significativa na hidrólise dos nucleotídeos ATP e AMP no estriado e hipocampo de camundongos. Assim, concluímos que adenosina que é formada extracelularmente tem função fundamental no efeito hiperlocomotor do NPS. Porém, NPS não altera a atividade das enzimas responsáveis por formar adenosina extracelular. Estes dados sugerem que os dois moduladores do sistema nervoso central, adenosina e NPS, agem de forma cooperativa. Em conclusão, pela primeira vez foi demonstrado que o efeito hiperlocomotor de NPS é dependente da formação extracelular de adenosina.

Palavras – chave: adenosina, neuropeptídeo S, ecto-5'-nucleotidase

ABSTRACT

Adenosine is distributed in almost all cells with important function on cellular homeostasis. In central and peripheric nervous system, adenosine play an important role on neuromodulation through activation of specific receptors classified as A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃. Extracellular adenosine originates from (i) release and extracellular breakdown of nucleotides by ecto-5'-nucleotidase, and (ii) release of intracellular adenosine via bidirectional transporters of nucleosides. Studies showed that activation of adenosine receptors modify the action of classic neurotransmitters, such as dopamine, glutamate, acetylcholine, and the action of others neuromodulators, as vasoactive intestinal peptide (VIP), calcitonin gene-related peptide (CGRP) and neuropeptide S (NPS). Among the neuropeptides already discovered, NPS stands out because its direct relationship with adenosinergic system. NPS acts on central nervous system as messenger and, ordinarily modulating, such as adenosine, the function of other classic neurotransmitters. Furthermore, NPS is involved in the regulation of stimulus and response to fear and arousal, in the same way as adenosine. Thus, the present study aimed to investigate the effect of NPS on locomotor activity of mice treated with the inhibitor of ecto-5'-nucleotidase, and to evaluate the ecto-nucleotidase activities in the striatum and hippocampus from mice treated with NPS. Male adult mice CF-1, 3 months old, received intracerebrocentricularly injection (i.c.v.) of 0.1 nmol NPS (1 μ L) with or without pre-treatment of 1 nmol α,β -methylene adenosine 5'-diphosphate (AOPCP), the selective inhibitor of ecto-5'-nucleotidase, to evaluate the locomotor activity of mice. In another set of experiments, mice received i.c.v. infusion of 0.1 nmol NPS to assay enzymatic activity in brain slices. The control mice received i.c.v. vehicle (saline solution) in a constant volume of 1 μ L. The results demonstrated that the pre-treatment with AOPCP prevented the NPS-induced hyperlocomotion in mice, without any effect *per se*. The dose of 0.1 nmol NPS was efficient to induce hyperlocomotion during the period of observation of animals at activity cage. Regarding enzymatic activity, NPS administration did not induce any significant alterations on ATP and AMP hydrolysis at striatum and hippocampus slices from mice. In addition, NPS did not modify the activity of enzymes responsible for generating extracellular adenosine. The present data suggest that the neuromodulators, adenosine and NPS, act cooperatively. In

conclusion, for the first time our data demonstrated that adenosine formed in the extracellular space plays an important role on the hyperlocomotor effect of NPS.

Keywords: adenosine, neuropeptide S, ecto-5'-nucleotidase

LISTA DE ABREVIATURAS

ADO - adenosina

ADP - adenosina difosfato

AMP - adenosina monofosfato

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

AOPCP - α - β -metileno adenosina difosfato

ATP - adenosina trifosfato

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CMP - citidina monofosfato

E-NTPDase – ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

Gi – proteína G inibitória

Gs – proteína G estimulatória

GMP - guanosina monofosfato

GPI – glicofosfatidil inositol

HEK – células embrionárias de rim humano (sigla do inglês *human embryonic kidney*)

ICV - intracerebroventricular

IMP – inosina monofosfato

mGlu – receptores glutamatérgicos metabotrópicos

MAPk – proteína quinase ativada por mitógeno

NPS – neuropeptídeo S

NPSR – receptor do neuropeptídeo S

SNC - sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1 – Vias de formação da adenosina	18
Figura 2 – Receptores de adenosina e sua função sobre a adenilato ciclase.....	20
Figura 3 – Estrutura peptídica do NPS.....	23
Tabela 1 – NPS x fármacos moduladores da locomoção e ansiedade.....	25

PARTE II

Figura 1 - Effect of the i.c.v. injection of NPS (0.1 nmol; 1 µL) with or without AOPCP (50 nmol; 1 µL) on the spontaneous locomotor activity assessed in infrared beam array cages in mice for 30 min.....	51
Figura 2 – Effect of the i.c.v. injection of NPS (0.1 nmol; 1 µL) on the ecto- nucleotidase activities in slices from hippocampus or striatum following of mice.....	52

SUMÁRIO

PARTE I

INTRODUÇÃO	15
1. Sistema Purinérgico	15
1.1 Funções da adenosina.....	15
1.2.Formação da adenosina.....	16
1.3. Receptores adenosinérgicos.....	19
1.4. Adenosina x neurotransmissores.....	21
2. Sistema peptidérgico do NPS.....	22
2.1. Estrutura e função.....	22
2.2. Modulação adenosinérgica sobre o efeito do NPS.....	25
OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28

PARTE II

ARTIGO: Role of the ecto-nucleotidases in the cooperative effect of adenosine and NPS on locomotor activity in mice.....	29
---	-----------

PARTE III

DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

PARTE I

INTRODUÇÃO

1. SISTEMA PURINÉRGICO

1.1. Funções da adenosina

O nucleosídeo purinérgico adenosina encontra-se presente tanto no meio intra como no meio extracelular e desempenha um papel fundamental como neuromodulador e no controle da homeostase (Cunha, 2001). Normalmente, as concentrações de adenosina são maiores no meio intracelular (0,5 a 4 μ M) do que no meio extracelular (10 a 50nM). O papel dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina na neurotransmissão e neuromodulação do sistema nervoso tem sido bem estabelecido (Cunha, 2001; Dunwiddie e Masino, 2001). O ATP é um importante neurotransmissor excitatório nas sinapses nervosas purinérgicas, podendo ser também co-liberado juntamente com outros neurotransmissores como a acetilcolina e a noradrenalina (Sperlág e Vizi, 1996; Zimmermann, 1996; Illes e Ribeiro, 2004).

A adenosina tem um papel relevante na neuromodulação regulando a liberação de vários neurotransmissores, agindo tanto pré quanto pós-sinapticamente (Cunha, 2001; Dunwiddie e Masino, 2001; Ribeiro et al., 2003). A regulação da liberação de neurotransmissores excitatórios por esta molécula tem se tornado importante em muitos processos patológicos, pois a adenosina pode limitar o dano causado pela excitotoxicidade destes neurotransmissores, exercendo assim uma ação protetora no sistema nervoso (Zimmermann et al., 1998; Dunwiddie e Masino, 2001). A adenosina não corresponde a um neurotransmissor clássico, uma vez que

não existem evidências de um armazenamento vesicular, tampouco de uma liberação dependente de cálcio (Hack e Christie, 2003).

Além das propriedades neurotransmissoras e neuromoduladoras, estudos colocaram em evidência muitas outras ações dos nucleotídeos e do nucleosídeo de adenina no sistema nervoso. Atualmente, estes reconhecidos por terem função participativa na formação e regulação da sinaptogênese, plasticidade neuronal, proliferação de células gliais e na diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos (Cicarelli et al., 2001; Stevens et al., 2002; Wink et al., 2003, Agresti et al., 2005).

1.2 Formação da adenosina

O processo de formação da adenosina no meio intracelular acontece através de duas maneiras distintas: (1) pela clivagem da S-adenosil-homocisteína (Lloyd et al. 1993, Dunwiddie e Masino, 2001), e (2) pela degradação do nucleotídeo monofosfatado (AMP) pela enzima 5'-nucleotidase (Brundage e Dunwiddie, 1997; Zimmermann e Braun, 1999) (Figura 1). O ATP é fonte primária de substrato para que ocorra a formação da adenosina, e é fundamental no meio intracelular como fonte de energia e no meio extracelular como um neurotransmissor de ação excitatória rápida, neuromodulador e fator de crescimento no SNC (Neary et al. 1996, Vizi et al., 1997). A atuação do ATP extracelular na célula ocorre através da ativação dos seus receptores específicos: P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}), que são receptores metabotrópicos; e P2X (P2X₁₋₇), os quais são receptores ionotrópicos (Burnstock, 2004).

Os nucleotídeos de adenina extracelulares são hidrolisados por enzimas conhecidas como ecto-nucleotidases. Dentre estas destaca-se a ecto-nucleosídeo

trifosfato difosfoidrolases (EC 3.6.1.5, E-NTPDase 1, apirase, CD39, ATP difosfoidrolase) e a ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), duas enzimas capazes de controlar a disponibilidade de ligantes como ATP e adenosina a seus receptores específicos na superfície da membrana celular (Zimmermann, 2001) (Figura 1).

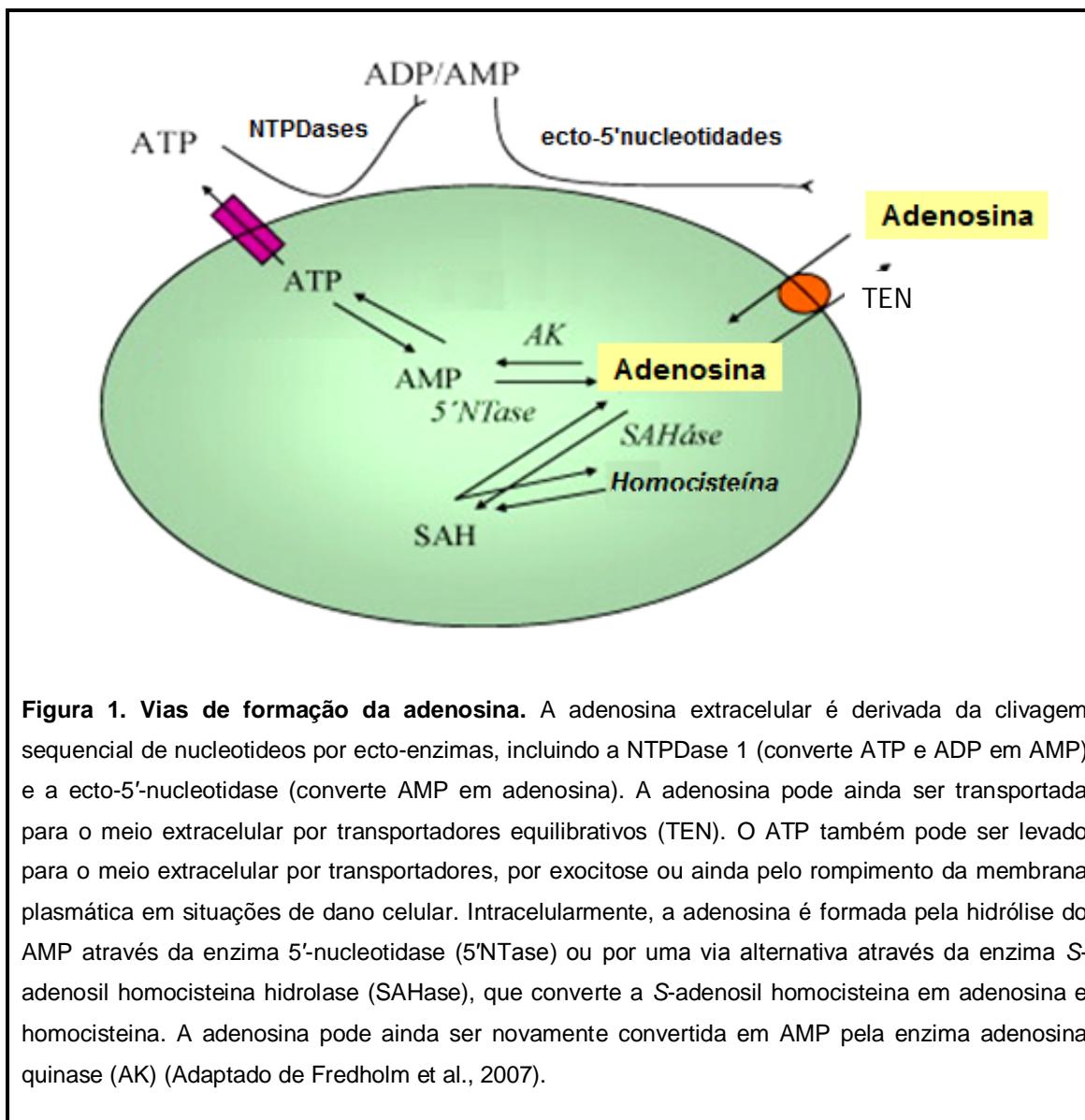
E-NTPDases é o termo genérico para designar uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (Zimmermann, 2001). Oito membros desta família já foram identificados e diferem quanto à especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular (Shi et al., 2001; Zimmermann, 2001; Biogennese et al., 2004). Estas enzimas apresentam um alto grau de similaridade na sua sequência de aminoácidos, particularmente dentro de cinco regiões que são conhecidas como “regiões conservadas da apirase”, as quais são de extrema importância para a atividade catalítica (Zimmermann, 1999).

A NTPDase 1 foi a primeira enzima da família E-NTPDase a ser descrita, e está ancorada na superfície celular através de duas regiões transmembranas próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Zimmermann, 2001). Esta enzima hidrolisa tanto ATP como ADP formando AMP na presença de íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Ziganshin et al., 1994). Esta enzima vem sendo amplamente estudada nos últimos anos tanto em condições patológicas quanto em modelos experimentais (Bonan et al., 2000; Lunkes et al., 2003; Araújo et al., 2005). A função geral da NTPDase 1 tem sido atribuída à hidrólise extracelular dos nucleotídeos ATP e ADP e, portanto, dependendo da localização tecidual a atividade enzimática, possui diferentes papéis fisiológicos (Sarkis et al., 1995; Zimmermann, 1999; Bonan et al., 2001).

A ecto-5'-nucleotidase é uma enzima ancorada a membrana plasmática via uma molécula de glicofosfatidil inositol (GPI) com seu sítio catalítico voltado para o

meio extracelular. Entretanto, formas solúveis e clivadas desta enzima também já foram descritas (Zimmermann, 2001; Hunsucker et al., 2005).

Esta enzima catalisa a desfosforilação de vários nucleotídeos 5'-monofosfatados como CMP, IMP, UMP, GMP e AMP a seus respectivos nucleosídeos (Zimmermann, 1996). No entanto, foi demonstrado que a ecto-5'-nucleotidase hidrolisa mais eficientemente o AMP, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina extracelular (Zimmermann, 1996; Zimmermann et al., 1998; Zimmermann, 2001).



1.3 Receptores adenosinérgicos

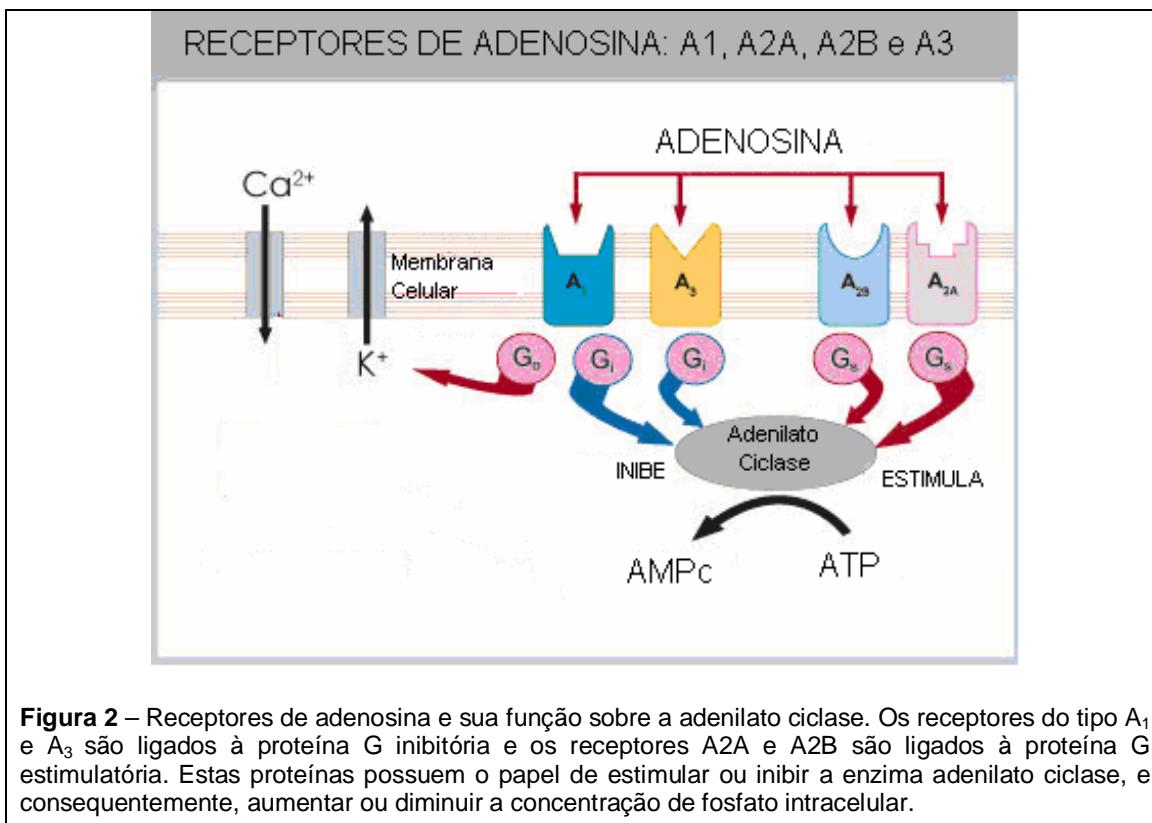
Segundo Burnstock (1972), para que a adenosina execute suas funções, deve ocorrer a ativação de receptores de membrana específicos, denominados receptores purinérgicos P1. Tomando por base características morfológicas, bioquímicas e farmacológicas, os receptores P1 foram divididos em quatro sub-tipos denominados A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Além disso, pode-se classificar estes quatro receptores quanto a afinidade pela adenosina: os receptores A₁ e A_{2A} apresentam alta afinidade, enquanto os receptores A_{2B} e A₃ são de baixa afinidade (Ribeiro et al., 2003) (Figura 2). Outra forma de classificação destes receptores pode ser feita através do tipo de proteína G ao qual são acoplados. Os receptores A₁ e A₃ são acoplados a G_i e os receptores A₂ são acoplados a G_s. Sabe-se que a ativação da proteína G inibitória produz efeitos de inibição na neurotransmissão (principalmente na adenilato ciclase) e que a ativação da proteína G estimulatória produz um efeito estimulatório na neurotransmissão (Figura 2).

Os receptores A₁ são os que possuem a maior concentração no SNC, ocorrendo principalmente no córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, tálamo, tronco cerebral e medula espinhal (Fredholm et al., 2001), e localizando-se celularmente na região pré-sináptica, pós-sináptica e no axônio (Rebola et al., 2003).

Os receptores A_{2A} estão amplamente distribuídos por tecidos periféricos e também no SNC (Lee et al., 2003). Centralmente, estão presentes principalmente no estriado, núcleo acumbente e tubérculo olfatório. No entanto, também estão presentes em outras áreas do encéfalo, incluindo o córtex e o sistema límbico (Cunha et al., 1994; Svensson et al., 1999; Lopes et al., 2002; Rebola et al., 2002; 2003). Celularmente, localizam-se nas regiões pré-sinaptica (hipocampo) e pós-sinaptica (estriado).

Os receptores do tipo A_{2B} possuem baixa expressão no sistema nervoso central, além de ser encontrado em outros órgãos, como hipófise, pulmão, e intestino grosso (Fredholm et al., 2001).

Os receptores A₃ são menos abundantes no SNC e a falta de ligantes seletivos faz com que eles sejam menos estudados (Cunha et al., 2005). São expressos de forma moderada no cerebelo e hipocampo e com baixa expressão no restante do cérebro (Fredholm et al., 2001).



Estudos sugerem que a adenosina intracelular quando liberada para o meio extracelular, age preferencialmente nos receptores A₁, enquanto que a adenosina extracelular formada pela via das ecto-nucleotidases favorece a ativação dos receptores A_{2A} (Cunha et al., 1996).

1.4 Adenosina x neurotransmissores

Pesquisas demonstram que há interação de receptores de adenosina com receptores dopaminérgicos, glutamatérgicos e colinérgicos, e ainda com neuromoduladores como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Cunha-Reis et al., 2008) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Sebastião et al., 2000).

Estudos mostram que existe uma interação entre o sistema adenosinérgico e o neurotransmissor dopamina (Lindkog et al., 2002), pois os receptores A_{2A} são expressos predominantemente nos neurônios do estriado que também expressam receptores de dopamina do tipo D₂. Estes receptores estão co-localizados e interagem antagonicamente na membrana pós-sináptica, de maneira que a estimulação dos receptores de A_{2A} faz com que diminua a afinidade dos receptores D₂ pela dopamina (Ferré et al., 1991). Por conseguinte, antagonistas A_{2A}, como a cafeína, bloqueiam a atividade da adenosina endógena, aumentando a afinidade dos receptores D₂ pela dopamina (Lara & Souza, 2001). Assim provocando aumento da atividade motora pela interação destes receptores (Fisone et al., 2004).

Por outro lado, evidências da interação entre receptores adenosinérgicos e glutamatérgicos resultam da potencialização dos níveis de AMPc induzidos por agonistas dos receptores adenosinérgicos A_{2A}, após a ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu) (Cartmell et al., 1994). Os receptores glutamatérgicos do tipo mGlu_{1α} possuem um papel controverso em neuroproteção/neurodegeneração, o qual parece estar relacionado com a interação entre os receptores glutamatérgicos e adenosinérgicos (Ciruela et al., 2003). Os efeitos inibitórios da adenosina são também atribuídos à redução do influxo dos íons Ca²⁺ na pré-sinapse (Vacas et al., 2003), promovendo assim uma redução na liberação de

neurotransmissores, entre eles o glutamato (Poli et al., 1991). Altos níveis de adenosina são observados no espaço extracelular em situações de lesão ao tecido cerebral, assim como quando os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA são ativados (Hoehn & White, 1990; Craig & White, 1993).

A modulação purinérgica sobre a liberação de acetilcolina é bem estabelecida na junção neuromuscular, mas existem evidências desta modulação também no SNC como em neurônios colinérgicos ascendentes, que se projetam sobre o córtex e o tálamo (Acquas et al., 2002).

A partir das modulações adenosinérgicas citadas, sugere-se que a adenosina atue no SNC promovendo uma ação reguladora fina sobre o funcionamento sináptico e esta modulação tanto pode ocorrer sobre neurotransmissores clássicos quanto sobre outros moduladores de função neuronal, como é o caso dos neuropeptídeos VIP e CGPR, e recentemente sobre a ação do neuropeptídeo S (NPS) (Xu et al., 2004; Boeck et al., 2010).

2. SISTEMA PEPTIDÉRGICO DO NPS

2.1 Estrutura e função

Há mais de 30 anos se descobriu que os peptídeos atuam no SNC como mensageiros e que comumente ocorrem modulando a função de outros neurotransmissores clássicos. Devido a estas características, os sistemas peptidérgicos têm sido considerados alvos farmacológicos atrativos para o tratamento de diversos transtornos psiquiátricos, pois abrem novas possibilidades de descoberta de fármacos com mecanismos de ação inovadores comparados aos fármacos disponíveis no mercado (Hokfelt et al., 2003). Atualmente, são conhecidos

mais de 50 peptídeos endógenos, sendo que muitos destes possuem função biológica ainda pouco elucidada.

O NPS é um peptídeo composto por 20 resíduos de aminoácidos. Este peptídeo foi recentemente reconhecido como o ligante endógeno de um receptor acoplado à proteína G, denominado de receptor NPS (NPSR), que anteriormente era conhecido como receptor órfão GPR154 (Sato et al., 2002). O NPS é expresso por muitas espécies de mamíferos (homem, chimpanzé, cachorro, rato, camundongo) e também por espécies de aves (galinha), apresentando homologia estrutura elevada entre as diferentes espécies animais avaliadas (Xu et al., 2004; Reinscheid, 2007) (Figura 3).

S F R N G V G T G M K K T S F Q R A K S	humano
S F R N G V G T G M K K T S F R R A K S	chimpanzé
S F R N G V G T G M K N T S F R R A K S	macaco
S F R N G V G T G M K K T S F R R A K S	canino
S F R N G V G T G M K K T S F R R A K S	bovino
S F R N G V G S G V K K T S F R R A K Q	rato
S F R N G V G S G A K K T S F R R A K Q	camundongo
S F R N G V G S G I K K T S F R R A K S	galinha

Figura 3 – Estrutura peptídica do NPS em várias espécies animais (adaptado de Xu et al., 2004)

Com o uso da técnica de RT-PCR e hibridização *in situ* foram reconhecidos os locais de expressão do NPS e do seu receptor NPSR no cérebro e nos tecidos periféricos de ratos (Xu et al., 2004). O RNAm do NPSR se expressa principalmente em áreas do sistema límbico envolvidas com a modulação da ansiedade (complexo amigdalóide e hipotálamo), sono (tálamo, hipotálamo e núcleo pré-optico), memória (em regiões parahipocampais e córtex entorrinal) e em menor intensidade em áreas envolvidas no controle motor (gânglios da base) (Xu, et al., 2007). Já o precursor do

peptídeo NPS encontra-se expresso no SNC em uma área mais restrita comparado ao seu receptor NPSR, limitando-se praticamente ao lócus ceruleus, hipotálamo e amigdala (Reinscheid et al., 2005; Xu et al., 2007). Nos tecidos periféricos, tanto o NPS quanto o seu receptor NPSR encontram-se expressos principalmente nas glândulas tireóide, mamária, salivares e nos testículos (Xu et al., 2004).

Apesar de o NPS ter sido descoberto em 2002 (Sato et al., 2002), somente em 2004 foi publicado o primeiro estudo que avaliou as respostas farmacológicas e fisiológicas produzidas por este peptídeo (Xu et al., 2004). Estudos farmacológicos demonstraram que o NPS aumenta a mobilização de Ca^{+2} em células HEK (células embrionárias de rim humano – *human embryonic kidney*), que expressam o receptor NPSR humano, além de produzir aumento dos níveis intracelulares de AMPc e estimular a fosforilação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPk) (Xu et al., 2004; Reinscheid et al., 2005).

Fisiologicamente, em modelos animais a administração intracerebroventricular aguda de NPS causa redução do tempo de sono e aumento do tempo de vigília. Além disso, possui um efeito do tipo ansiolítico em doses nanomolares quando injetado em camundongos submetidos a diversos testes comportamentais, tais como caixa claro-escuro, labirinto em cruz elevado (Xu et al., 2004). Todavia, além do efeito do tipo ansiolítico, o NPS promove hiperlocomoção nos camundongos, sendo que estes efeitos farmacológicos foram obtidos com o NPS administrado na faixa de nanomoles (Xu et al., 2004).

COMPARAÇÃO DO NPS COM OUTROS FÁRMACOS QUE MODULAM A LOCOMOÇÃO E A ANSIEDADE

FÁRMACO	LOCOMOÇÃO	ANSIEDADE
PSICOESTIMULANTES	AUMENTA	ANSIÓGENICO
HIPOCRETIN/OREXIN	AUMENTA	SEM EFEITO
MODAFINIL	AUMENTA	SEM EFEITO
BENZODIAZEPÍNICOS	SEM EFEITO/ DIMINUI	ANSIOLÍTICO
<i>NEUROPEPTÍDEOS</i>	<i>AUMENTA</i>	<i>ANSIOLÍTICO</i>

(adaptado de Xu et al., 2005).

Alterações no comportamento alimentar também foram observadas em ratos tratados com NPS. Um efeito do tipo anorexígeno foi observado em ratos e galinhas tratadas com NPS (Beck et al., 2005; Cline et al., 2007). No entanto, o efeito oposto, ou seja, aumento da ingestão de alimentos, também foi relatado para ratos saciados após a administração i.c.v. de NPS (Niimi, 2006).

2.2 Modulação adenossinérgica sobre o efeito do NPS

Em estudos recentes do nosso grupo observou-se que o efeito hiperlocomotor induzido por NPS é bloqueado por antagonistas de receptores de adenossina, como a cafeína (dados não publicados).

A cafeína é a droga psico-estimulante mais utilizada no mundo. Em concentrações não tóxicas, o seu único alvo molecular conhecido é o antagonismo de receptores de adenossina inibitórios A₁ e facilitatórios A_{2A}, ambos ativados pela adenossina endógena (Fredholm et al., 1995).

Uma das complicações associadas à compreensão dos efeitos centrais da cafeína é a observação que alguns dos efeitos agudos dessensibilizam enquanto outros são revertidos após exposição crônica à cafeína. Isto está ligado à capacidade da cafeína modificar os níveis de adenosina e suas respostas obtidas através dos receptores A₁ e A_{2A}, cuja densidade varia de modo diferente em diferentes situações fisiopatológicas. Não se sabe ao certo como é que o consumo crónico de cafeína modifica o sistema de neuromodulação adenosinérgico.

Em 2006, Lage e colaboradores demonstraram haver alteração da expressão do NPS e do NPSR em ratos expostos aguda e repetidamente (duas exposições) à cafeína. Agudamente, os autores demonstraram que a exposição à cafeína diminuiu a expressão de RNAm para o NPS no tronco cerebral, enquanto ela induziu aumento na expressão de RNAm para o NPSR no tronco cerebral de ratos. Em doses repetidas, a cafeína induziu aumento na expressão de RNAm para o NPSR no hipotálamo de ratos, mas não foram observadas alterações na expressão de RNAm para o NPSR e para o NPS no tronco cerebral. Já em 2007, o mesmo grupo de pesquisadores verificou que estas alterações ocorrem não somente com a cafeína, mas também com a nicotina (Lage et al., 2007).

Estes estudos sugerem que o NPS poderia modular algumas das ações comportamentais induzidas pela cafeína e/ou pela nicotina. Além disso, parece haver uma relação entre o sistema peptidérgico do NPS e o sistema adenosinérgico constituído pelos receptores A₁ e A_{2A}, principalmente porque a cafeína atua como antagonista não seletivo destes receptores.

Cabe salientar que, de maneira geral, alguns dos efeitos comportamentais produzidos pela administração de NPS são comparáveis com as alterações observadas em pacientes que sofrem de transtorno bipolar e também aos efeitos da

anfetamina, cuja administração em animais é considerada um modelo animal de mania (Einat, 2007). De fato, estudos realizados com ratos tratados com anfetamina demonstraram que a administração desta droga produz hiperlocomoção, alteração das fases do sono e anorexia, assemelhando-se particularmente às manifestações clínicas da mania (Einat, 2007) e do NPS (Xu et al., 2004). Desde modo, observou-se que o tratamento com fármacos estabilizadores do humor, tais como lítio, reverteram a hiperlocomoção induzida tanto pela anfetamina (Frey et al., 2006) como pelo NPS (Castro et al., 2009).

Consequentemente, de acordo com o que foi exposto acima, o presente estudo teve por objetivo investigar a interação existente entre o sistema adenosinérgico e o sistema peptidérgico do NPS através da atividade de ectonucleotidases na degradação do ATP e do AMP extracelular. Para alcançar tal objetivo, o estudo foi divido em duas etapas: em uma verificou-se a participação das enzimas na hiperlocomoção induzida por NPS, e na outra a atividade enzimática foi avaliada em estriado e hipocampo de camundongos.

OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar a participação da formação de adenosina extracelular pelas ecto-nucleotidases no efeito do neuropeptídeo S na locomoção de camundongos.

3.2 ESPECÍFICOS

- 3.2.1) Avaliar o efeito do inibidor seletivo da ecto-5'-nucleotidase, AOPCP, na hiperlocomoção induzida por NPS em camundongos;
- 3.2.2) Verificar a atividade de ecto-nucleotidases no estriado e hipocampo de camundongos tratados com NPS.

PARTE II

ARTIGO (submetido ao periódico *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*)

Role of the ecto-nucleotidases in the cooperative effect of adenosine and neuropeptide-S on locomotor activity in mice

Robson Pacheco¹, Bruna Bardini Pescador¹, Bruna Pescador Mendonça¹, Saulo Fábio Ramos², Remo Guerrini³, Girolamo Calo⁴, Vanessa Moraes de Andrade², Elaine Cristina Gavioli⁵, Carina Rodrigues Boeck¹

¹Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

²Laboratório de Imunologia e Mutagênese, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

³Department of Pharmaceutical Sciences, and Biotechnology Center, University of Ferrara, Ferrara, Italy

⁴Department of Experimental and Clinical Medicine, Section of Pharmacology and National Institute of Neuroscience, University of Ferrara, Ferrara, Italy

⁵Departamento de Biofísica e Farmacologia Centro de Biociências, Campus Universitário, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

Correspondent Authors:

Elaine Cristina Gavioli, M.SC, Ph.D.

Departamento de Biofísica e Farmacologia Centro de Biociências,
Campus Universitário,
Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
59072-970, Natal, RN, Brazil

E-mail: egavioli@hotmail.com

Carina Rodrigues Boeck, M.SC, Ph.D.

Laboratório de Neurociências – PPGCS - UNASAU
Universidade do Extremo Sul Catarinense
88806-000, Criciúma, SC, Brazil
Phone: + 55 48 3431 2757

E-mail: cariboeck@hotmail.com

Abstract

Activation of adenosine receptors modify the action of classic neurotransmitters (i.e. dopamine, glutamate and acetylcholine) and the others neuromodulators, as vasoactive intestinal peptide (VIP), calcitonin gene-related peptide (CGRP) and neuropeptide S (NPS). NPS is involved in the regulation of stimulus and response to fear and arousal, as adenosine. Thus, the present study aims to investigate the effect of NPS on locomotor activity at mice treated with or without the inhibitor of ecto-5'-nucleotidase, and to evaluate the ecto-nucleotidase activities at the brain of mice treated with or without NPS. Male adult mice CF-1 received i.c.v. injection of 0.1 nmol NPS with or without pre-treatment of 1 nmol α,β -methylene adenosine 5'-diphosphate (AOPCP), the selective inhibitor of ecto-5'-nucleotidase, to evaluate the locomotor activity of mice. Other set of experiments, mice received i.c.v. infusion of 0.1 nmol NPS to assay enzymatic activity at cerebral slices. The results demonstrated that the pre-treatment with AOPCP prevented the NPS-induced hyperlocomotion in mice, without any effect *per se*. The dose of 0.1 nmol NPS was efficient to induce hyperlocomotion during the period of observation of animals at activity cage. Regarding enzymatic activity, i.c.v. injection of NPS did not induce any significant alterations at the ATP and AMP hydrolysis at striatum and hippocampus slices from brain of the mice. The present data showed for the first time that the hyperlocomotor effect of NPS is dependent on the extracellular generation of adenosine.

1. Introduction

Neuropeptide S (NPS) is a 20-amino acid peptide recently identified in the brain and peripheral tissues of distinct species of vertebrates (Xu et al., 2004). In cells expressing the recombinant NPS receptor, NPS increases Ca^{2+} mobilization, intracellular cAMP formation and phosphorylation of extracellular signal regulated-kinase (ERK1/2) (Xu et al., 2004; Reinscheid et al., 2005). The NPSR is widely expressed in the discrete regions of mammalian brain, and higher levels were found in cortex, hypothalamus, amygdala, endopiriform nucleus, subiculum, and nuclei of the thalamic midline, while low levels were found in basal ganglia (Xu et al., 2007). In contrast, NPS precursor mRNA is found highly expressed only in a cluster of neurons located between the locus coeruleus and Barrington's nucleus (Xu et al., 2004).

The neuroanatomical expression of NPS and its receptor NPSR supports the role played by this peptidergic system in physiological functions such as anxiety (Xu et al., 2004; Jungling et al., 2008; Leonard et al., 2008; Rizzi et al., 2008; Vitale et al., 2008), arousal (Xu et al., 2004; Rizzi et al., 2008), food intake (Beck et al., 2005; Smith et al., 2006), locomotion (Xu et al., 2004; Roth et al., 2006; Smith et al., 2006; Leonard et al., 2008; Okamura et al., 2008; Rizzi et al., 2008; Castro et al., 2009), nociception (Li et al., 2009), memory (Han et al., 2009; Jungling et al., 2009) and drug addiction (Cannella et al., 2009, Pañeda et al., 2009).

Recently, studies demonstrated that the effects evoked by NPS are similar those observed with caffeine in mouse locomotion (Rizzi et al., 2008; Boeck et al., 2010). Also, NPS and caffeine act in the regulation of wakefulness states (Xu et al., 2004; Rizzi et al., 2008), and food intake (Beck et al., 2005). Probably, there are an interaction between the adenosinergic and NPS - NPSR receptor systems because

was suggested that the inhibitory effects of caffeine on sleep and feeding have contribution of NPS signaling in the rat brain (Lage et al., 2006). Adenosine, operating via inhibitory adenosine A₁ receptors or excitatory adenosine A₂ receptors, which has widespread modulatory actions in the nervous system and may interfere with the action of other neuromodulator/neurotransmitter substances (Ribeiro, 1999). Extracellular adenosine comes from the release via bi-directional nucleoside transporter and/or from adenine nucleotides released, whose are degraded by a chain of ecto-nucleotidases (E-NTPDases) (Hoehn and White, 1990; Craig and White, 1993; Cunha et al., 1996). The most relevant ecto-enzymes involved in this chain are the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases family (E-NTPDases, including ATP-diphosphohydrolase), which hydrolyze nucleoside tri- and di-phosphates, and the ecto-5'-nucleotidase that hydrolyzes nucleoside monophosphates (Fredholm et al., 2005; Zimmermann, 2006; Robson et al., 2006). Ecto-5'-nucleotidase activity is a pivotal step in extracellular adenosine production from the enzymatic chain (James and Richardson, 1993). It is suggested that adenosine released leads to preferential A₁ receptor activation, whilst adenosine formed from the ecto-nucleotidases pathway leads to favored adenosine A_{2A} receptor activation (Cunha et al., 1996; Boeck et al., 2005). In this context, recently our group demonstrated the inhibitory effect induced by caffeine or selective A_{2A} receptor antagonist, ZM 241385, on hyperlocomotion induced by NPS in mice (Boeck et al., 2010). Thus, the present study aimed to investigate if the involvement of adenosine on hyperlocomotor effect of NPS is due its production via ecto-nucleotidases pathway. To test our hypothesis we applied the specific inhibitor of the ecto-5'-nucleotidase, α,β-methylene-adenosine 5'-diphosphate (AOPCP), in mice treated

intracerebroventricularly (i.c.v.) with NPS. We also investigate if NPS modify E-NTPDase activities in hippocampus and striatal slices from brain of the mice.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Adenosine 5'-triphosphate (ATP), adenosine 5'-monophosphate (AMP) and α,β-methylene adenosine 5'-diphosphate (AOPCP), were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). The human NPS was synthesized by Dr R. Guerrini, Department of Pharmaceutical Science and Biotechnology Center, University of Ferrara, according to published methods (Roth et al., 2006). NPS was dissolved in saline solution (NaCl 0.9 g%, w/v) to inject i.c.v. in mice. AOPCP had its pH adjusted with NaOH 0,1 M e was diluted in saline solution. All other chemicals were of analytical reagent grade and purchased from local suppliers.

2.2 Animals

Male albino CF-1 mice (2-3 months, 30-35 g) were obtained from our breeding colony (UNESC). The animals were housed six to cage with food and water freely available and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the National Institute of Heath's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the recommendations of the Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) for animal care, designed to minimize suffering and limit the

number of animals used. To avoid circadian variations all experiments were carried out between 8:00 a.m. and 1:00 p.m. This study was approved by the local ethics committee (Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense, nº 045/2009).

2.3 Surgical procedure

Surgery and i.c.v. infusion techniques were according to Schmidt et al. (2000). Naïve mice were anesthetized with 7% chloral hydrate (w/v, 10 mL/kg body weight, i.p.). In a stereotaxic apparatus, the skin of the skull of mouse was removed and a i.c.v. guide cannula (27-gauge) was unilaterally implanted at 1.0 mm posterior to bregma, 1.0 mm right from the midline and 1.0 mm above the right lateral brain ventricle. The guide cannula was implanted 1.5 mm ventral to the superior surface of the skull and fixed with jeweler's acrylic cement. In the experiments, performed 48 h after surgery, we used for i.c.v. infusion a 30-gauge cannula that was fitted into the implanted guide cannula and connected by a polyethylene tube to a Hamilton micro syringe. The tip of the infusion cannula protruded 1 mm beyond the guide cannula, aiming the lateral brain ventricle. After experiments, methylene blue (4 µL) was injected through the cannula and animals without dye in the lateral brain ventricle were discarded.

2.4 Treatments

Mice received ic.v. injection of AOPCP (50 nmol; 1 µL) or vehicle (saline solution; 1 µL) just before testing locomotor activity in the infrared beam array cage.

Five min following AOPCP mice received i.c.v. injection of NPS (0.1 nmol; 1 µL) or vehicle and their locomotor activity was evaluated during more 25 min. Previous study in our laboratory showed that this dose of NPS produce higher stimulatory effect on locomotion (Boeck et al., 2010). The dose of AOPCP employed in the present study was selected based on previous studies (Soares et al., 2004).

In other set of experiments, mice received NPS (0.1 nmol) or vehicle into the lateral ventricle in a constant volume of 1 µL, 5 min before enzymatic assay.

2.5 Locomotor activity assay

An infrared beam array cage (Insight Equipments, Ribeirão Preto, Brazil) connected to a PC was used for assessing locomotor activity in mice. The infrared beam array cage consists of a cubicle made of clear Perspex (48 x 50 cm) surrounded by 50 cm-high walls. Two facing blocks containing an infrared array record the horizontal activity, and a similar system assesses the vertical activity. Just after AOPCP or vehicle i.c.v. injection non-habituated animals were gently placed on the centre of the arena and they were allowed to explore the apparatus individually during a period of 5 min. Mice were gently retired from cage and they received ic.v. injection of NPS or vehicle and returned to explore the apparatus for more 25 min (total of 30 min of observation). All behavioral experiments were conduct in an illuminated (300 lx) and quiet room in the absence of experimenter. After the behavioral evaluation of each mouse, the arena was cleaned with 10% ethanol solution. Each mouse was evaluated for the first time to locomotor activity, individually during a 30-min period. The total distance travelled (in centimeters) by each animal was accumulated over consecutive 5 min time.

2.6 Nucleotides hydrolyses assay

Five min after i.c.v. injection of NPS the mice were killed by decapitation and the brains were rapidly removed into a pre-warmed HEPES-buffered salt solution with the following composition: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂ and 10 mM glucose (pH 7.4) and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ mixture (incubation medium). The brains were cut longitudinally, their hippocampi and striatum dissected and sliced transversely cut to 400 µm thick on a McIlwain tissue chopper. Two slices per tube (approx. 0.15 mg protein) were preincubated for 10 min at 37 °C with 400 µL of the incubation medium (described above). To measure the ATP and AMP hydrolyses the slices were incubated with ATP or AMP (1 mM, final concentration) during 20 min at 37 °C. Following incubation, an aliquot of assay medium was removed and mixed with trichloroacetic (TCA) to a final concentration of 5%. A sample of the supernatant was taken for the assay of inorganic phosphate (Pi) release by colorimetric determination (Chan et al., 1986). Non-enzymatic Pi released from nucleotide in the assay medium without cells and Pi released from cells incubated without nucleotide were subtracted from the total Pi released during nucleotide hydrolysis, giving values for enzymatic activity (nmol Pi/mg protein per min). All conditions of this assay were investigated previously in order to ensure the linearity of enzymatic reaction and preservation of cellular viability until the end of the experiment (data not show). Protein was determined using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

2.7 Statistical analysis

Behavioral data are presented as mean values \pm S.E.M. (standard error of the mean) and each value reflects the mean of 10–14 animals per group. The effects of the combined administration of NPS and AOPCP were statistically analyzed by employing two-way ANOVA with NPS and AOPCP as main factors, followed by the Tukey's post hoc test. Enzymatic data are presented as mean values \pm S.D. (standard deviation) and each value reflects the mean of samples at triplicate from 9–12 animals per group. The effect of the NPS was statistically analyzed by employing Student's t-test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Results were analyzed by STATISTICA® software version 7.0 (StatSoft, Inc., USA).

3. Results

Figure 1 shows the effect of pre-treatment of ecto-5'-nucleotidase inhibitor AOPCP on NPS-induced hyperlocomotion. Non-habituated mice treated with AOPCP did not show any changes in locomotor activity when compared to saline treated mice during first 5-min block on arena or during all period (Fig 1A). Mice treated with NPS displayed increase on locomotion activity, with significant effect began at 10 min following the NPS injection ($F(1,41) = 7.277$; $P = 0.01$) (Fig 1A). However, mice pre-treated with AOPCP before NPS administration did not displayed the NPS-induced hyperlocomotion, an effect statistically dependent on interaction of AOPCP and NPS for all period blocks (20 min - $F(1,41) = 5.771$; $P = 0.02$; 30 min – $F(1,41) = 7.839$; $P = 0.008$). When the activity of mice was evaluated as accumulative distance traveled during 30 min, AOPCP was effective to induce prevention on NPS-induced hyperlocomotion ($F(1,41) = 7.189$; $P = 0.015$) reaching basal values (Fig 1B).

The measurement of ecto-NTPDase activities was evaluated in slices from cerebral areas following NPS injection on mice (Fig 2). ATP or AMP hydrolysis at striatum (Fig 2A) or hippocampus (Fig 2B) was not altered by NPS ($P > 0.05$ for all nucleotides at each cerebral area).

4. Discussion

In the present study, we used the combination of NPS and a selective inhibitor of the ecto-5'-nucleotidase, responsible to inhibit extracellular adenosine production from nucleotides released, to investigate the origin of adenosine that contribute to NPS-induced hyperlocomotion in mice. The i.c.v. injection of NPS 0.1 nmol increased substantially the mouse spontaneous locomotion. The present data are in line with our previous findings, thus showing robust and consistent hyperlocomotor effects of NPS in rodents that can be blunted by adenosine A_{2A} receptor antagonists (Boeck et al., 2010).

Ecto-nucleotidases break down the adenine nucleotides in stages to produce free extracellular adenosine at the terminal step (Zimmermann, 2000). For example, the extrasynaptic enzyme ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (EC 3.6.1.5; E-NTPDase1; previously identified as ecto-ATPDase, ecto-apyrase or CD39) converts ATP and adenosine diphosphate (ADP) to adenosine monophosphate (AMP) in cultured hippocampal neurons (Boeck et al., 2002). The final and critical step of conversion of AMP to adenosine is carried out by ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann, 2006). To fully define the roles that individual species play in purinergic signalling, it would be useful to prevent the extracellular metabolism of purines such as AMP. AOPCP treatment has been used to affect *in vivo* behavioral

responses to guanine-based purines (Soares et al., 2004), which reinforces the relevance of AOPCP in studies involving purine nucleotides and nucleosides *in vivo*.

In the present study, we also investigated the participation of adenosine produced by ecto-5'-nucleotidase during the stimulatory effects of NPS in brain of mice. Our findings demonstrated for first time that the administration of AOPCP did not alter *per se* the mouse locomotor activity in a significant manner. However, the injection of AOPCP combined with NPS blocked the increased distance moved locomotion induced by the neuropeptide (Fig 1).

Regarding adenosine receptors activation, the ecto-5'-nucleotidase activity is critical. It has been proposed that one way for extracellular adenosine to preferentially activate either inhibitory or facilitatory receptors would depend on the manner in which extracellular adenosine was generated: release of adenosine, as such, through bidirectional non-concentrative adenosine transporters would favour adenosine A₁ receptor-mediated inhibition, whereas formation of adenosine from the extracellular catabolism of ATP would favour adenosine A_{2A} receptor-mediated facilitation (Cunha et al., 1996), which may be due to the proximal brain distribution of ecto-5'-nucleotidase and adenosine A_{2A} receptors. Thus, we have previously demonstrated that the stimulatory effect of NPS on locomotion is dependent on activation of adenosine A_{2A} receptor (Boeck et al., 2010), that could be formed by extracellular catabolism of nucleotides, such as proposed by the present results.

Even so we did not observe a significant modification on ecto-nucleotidase activities following NPS administration (Fig 2), the participation of this cascade pathway on the adenosine effect upon NPS can not be excluded. The protocol used in the present study has the limitation that the assessment of enzyme activities in the cerebral tissue slices had to be performed at the early period of NPS effect. However,

it is interesting to note that the AOPCP effect is clear, thus our results demonstrate that the adenosine conversion is also necessary for the *in vivo* model of hyperlocomotion induced by NPS.

A recent study verified that NPS suppressed the increase of extracellular acetylcholine levels induced by MK-801 (NMDA receptor antagonist) in the retrosplenial cortex (Okamura et al., 2010). Also, adenosine modulates extracellular acetylcholine levels, because adenosine A_{2A} receptors have been shown to facilitate the release of most neurotransmitter types, including acetylcholine, in different extra-striatal brain regions (Jin and Fredholm, 1997). Thus, probably the NPS modulation is dependent on the activation of adenosine A_{2A} receptors. Further study has extended this idea, where the peptidergic modulation of excitatory synaptic transmission in the hippocampus by G-protein coupled receptors, operated by calcitonin gene-related peptide (CGRP) and vasoactive intestinal peptide (VIP), is strictly dependent on the activation of A_{2A} receptors (Sebastião et al., 2000; Cunha-Reis et al., 2000).

Thus, adenosine would be fulfilling a role in accordance with the physiological needs, i.e. to contribute for facilitation of synaptic transmission, possibly through an A_{2A} receptor-induced A₁ receptor desensitisation (Lopes et al., 1999), probably contributing to the effect of NPS locomotor activity. We hypothesized that the modulatory effect of adenosine receptors under NPS-induced stimulation could be due to a common protein-G signaling pathway shared by both systems, since both adenosine A_{2A} and NPSR receptors are positively coupled to adenylate cyclase. However, the interaction of adenosine and NPS in the stress, anxiety, arousal and sleep, and food intake also modulated by NPS should be investigated.

In conclusion, the present results demonstrated for first time, the NPS-induced hyperlocomotion in mice is strictly associated to endogenous adenosine via

adenosine A_{2A} receptors activation. Our findings showed that the pharmacological inhibition of extracellular adenosine conversion attenuated NPS-induced hyperlocomotion. Even though, NPS did not affect ecto-nucleotidase activities, probably the adenosinergic tonus via each other receptors is essential for locomotor activity enhanced by NPS that has been observed by our group.

Acknowledgments

This work was supported by funds from International Brain Research Organization-IBRO (Return Home Fellowship to ECG), the Brazilian National Council Research (CNPq grants, no. 478249/2006-3 to CRB and 479760/2007 to ECG) and UNESC.

References

- Beck B, Fernette B, Stricker-Krongrad A. Peptide S is a novel potent inhibitor of voluntary and fast-induced food intake in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332:859-865.
- Boeck CR, Sarkis JJF, Vendite D. Kinetic characterization and immunodetection of ecto-ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int* 2002; 40:449-453.
- Boeck CR, Kroth EH, Bronzatto MJ, Vendite D. Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. *Neuropharmacol* 2005; 49:17–24.
- Boeck CR, Martinello C, de Castro AA, Moretti M, dos Santos Casagrande T, Guerrini R, Calo' G, Gavioli EC. Blockade of adenosine A_{2A} receptor counteracts neuropeptide-S-induced hyperlocomotion in mice. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 2010, 381:153-160.
- Camarda V, Rizzi A, Ruzza C, Zucchini S, Marzola G, Marzola E. In vitro and in vivo pharmacological characterization of the neuropeptide S receptor antagonist [D-Cys(tBu)5]neuropeptide S. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328(2):549–55.
- Cannella N, Economidou D, Kallupi M, Stopponi S, Heilig M, Massi M, Ciccocioppo R. Persistent increase of alcohol-seeking evoked by neuropeptide s: an effect mediated

by the hypothalamic hypocretin system. *Neuropsychopharmacol* 2009; 34(9):2125–2134

Castro AA, Moretti M, Casagrande TS, Martinello C, Petronilho F, Steckert AV, et al. Neuropeptide S produces hyperlocomotion and prevents oxidative stress damage in the mouse brain: a comparative study with amphetamine and diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 91(4):636–42.

Chan KM, Defert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157:375-380.

Craig CG, White TD. N-Methyl-D-aspartate and non-Nmethyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J of Neurochem* 1993; 60:1073-1080.

Cunha RA, Correia-De-Sá P, Sebastião AM, Ribeiro JA. Preferential activation of excitatory adenosine receptors at hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol* 1996; 119 (2): 253-260.

Cunha-Reis D, Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine modulation and transduction mechanisms involved in the action of VIP on [^3H]-GABA release from hippocampal synaptosomes. *Drug Dev Res* 2000; 50: 83.

Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svensson P, Vaugeois JM. Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol* 2005; 63: 191–270.

Guerrini R, Camarda V, Trapella C, Calo G, Rizzi A, Ruzza C, et al. Synthesis and biological activity of human neuropeptide S analogues modified in position 5: identification of potent and pure NPS receptor antagonists. *J Med Chem* 2009; 52(2):524-529.

Guerrini R, Salvadori S, Rizzi A, Regoli D, Calo' G. Neurobiology, pharmacology, and medicinal chemistry of neuropeptide S and its receptor. *Med Res Rev* 2009; 2010, DOI number: 10.1002/med.20180.

Haley TJ, McCormick WG. Pharmacologic effects of intracerebral injection of drugs in conscious mouse. *Br J of Pharmacol* 1957; 12: 12–15.

Han RW, Yin XQ, Chang M, Peng YL, Li W, Wang R. Neuropeptide S facilitates spatial memory and mitigates spatial memory impairment induced by N-methyl-d-aspartate receptor antagonist in mice. *Neurosci Lett* 2009; 455(1): 74-77.

Hoehn K, White TD. Role of excitatory amino acid receptors in KC- and glutamate-evoked release of endogenous adenosine from rat cortical slices. *J Neurochem* 1990; 54: 256 e 265.

James S, Richardson PJ. Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J Neurochem* 1993; 60:219-227.

Jin S, Fredholm BB. Adenosine A_{2A} receptor stimulation increases release of acetylcholine from rat hippocampus but not striatum, and does not affect catecholamine release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; 355: 48Y56.

Jungling K, Seidenbecher T, Sosulina L, Lesting J, Sangha S, Clark SD. Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron* 2008; 59(2):298-310.

Lage R, Dieguez C, Lopez M. Caffeine treatment regulates neuropeptide S system expression in the rat brain. *Neurosci Lett* 2006; 410:47–51.

Leonard SK, Dwyer JM, Sukoff Rizzo SJ, Platt B, Logue SF, Neal SJ, et al. Pharmacology of neuropeptide S in mice: therapeutic relevance to anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 197(4):601–11.

Lopes LV, Cunha RA, Ribeiro JA. Crosstalk between A₁ and A_{2A} adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. *J. Neurophysiol.* 1999; 82:3196–3203.

Okamura N, Reinscheid RK, Ohgake S, Iyo M, Hashimoto K. Neuropeptide S attenuates neuropathological, neurochemical and behavioral changes induced by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Neuropharmacology*. 2010; 58(1):166-72.

Pañeda C, Huitron-Resendiz S, Frago LM, Chown JA, Picetti R, de Lecea L, et al. Neuropeptide S reinstates cocaine-seeking behavior and increases locomotor activity

through corticotropin-releasing factor receptor 1 in mice. *J Neurosci* 2009; 29(13):4155-4161.

Raiteri L, Luccini E, Romei C, Salvadori S, Calò G. Neuropeptide S selectively inhibits the release of 5-HT and noradrenaline from mouse frontal cortex nerve endings. *Br J Pharmacol* 2009; 157(3):474-481.

Reinscheid RK, Xu YL, Okamura N, Zeng J, Chung S, Pai R, et al. Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide s receptor variants. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315:1338–1345.

Ribeiro JA. Adenosine A_{2A} receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. *Eur. J. Pharmacol* 1999; 375:101-113.

Rizzi A, Vergura R, Marzola G, Ruzza C, Guerrini R, Salvadori S, et al. Neuropeptide S is a stimulatory anxiolytic agent: a behavioural study in mice. *Br J Pharmacol* 2008; 154:471-479.

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure, function, relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006; 2:409–430.

Roth AL, Marzola E, Rizzi A, Arduin M, Trapella C, Corti C, et al. Structure–activity studies on neuropeptide S: identification of the amino acid residues crucial for receptor activation. *J Biol Chem* 2006; 281:20809–20816.

Sebastião AM, Macedo MP, Ribeiro JA. Tonic activation of A2A adenosine receptors unmasks, and of A1 receptors prevents, a facilitatory action of calcitonin gene-related peptide in the rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 374-380.

Schmidt AP, Lara DR, de Faria Maraschin J, da Silveira Perla A, Onofre Souza D. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res* 2000; 864: 40-43.

Smith KL, Patterson M, Dhillo WS, Patel SR, Semjonous NM, Gardiner JV, et al. Neuropeptide S stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. *Endocrinology* 2006; 147(7):3510–3518.

Soares FA, Schmidt AP, Farina M, Frizzo MES, Tavares RG, Portela LVC, et al. Anticonvulsant effects of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Research* 2004; 1005:182–186.

Vitale G, Filaferro M, Ruggieri V, Pennella S, Frigeri C, Rizzi A, et al. Anxiolytic-like effect of neuropeptide S in the rat defensive burying. *Peptides* 2008; 29:2286-2291.

Xu YL, Reinscheid RK, Huitron-Resendiz S, Clark SD, Wang Z, Lin SH, et al. Neuropeptide S: a neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* 2004; 43:487–497.

Xu YL, Gall CM, Jackson VR, Civelli O, Reinscheid RK. Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 2007; 500:84-102.

Zimmermann H. Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp* 2006; 276:113-128.

Legends

Figure 1 – Effect of the i.c.v. injection of NPS (0.1 nmol; 1 µL) with or without AOPCP (50 nmol; 1 µL) on the spontaneous locomotor activity assessed in infrared beam array cages in mice for 30 min. After 5 min of saline or AOPCP administration, mice were treated with saline or NPS and (A) the locomotor activity was recorded for 25 min (B) to evaluated accumulative activity of mice. Data are shown as mean ± S.E.M. (10-14 mice/group). *P<0.05 vs. control group and #P<0.05 vs. NPS group, according to two-way ANOVA followed by the Tukey's test.

Figure 2 – Effect of the i.c.v. injection of NPS (0.1 nmol; 1 µL) on the ecto-nucleotidase activities in slices from hippocampus or striatum of mice. Enzymatic data are presented as mean values ± S.D. and each value reflects the mean of samples at triplicate from 9-12 animals per group. The effect of the NPS was statistically analyzed by employing Student's *t*-test.

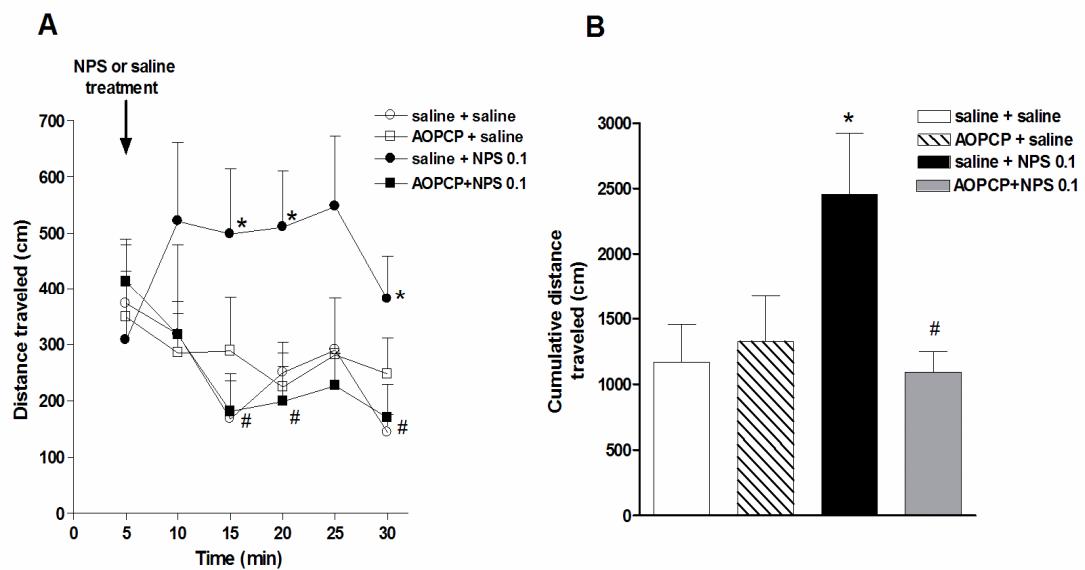
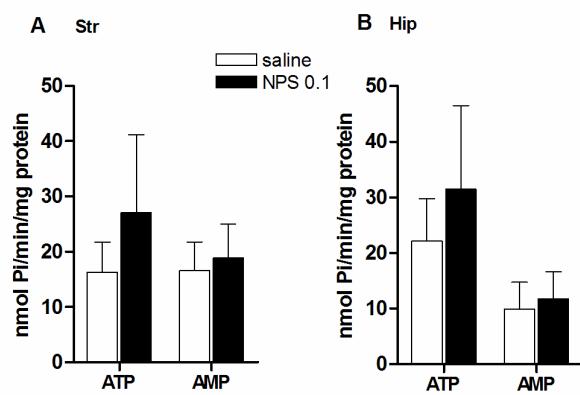
Figure 1

Figure 2

PARTE III

DISCUSSÃO

Considerando que o neuropeptídeo S é um peptídeo recentemente descoberto (Xu et al., 2004) e que possui um papel fundamental na regulação e modulação de algumas atividades comportamentais, tais como ciclo sono/vigília, hiperlocomoção, ansiedade, medo, entre outros; e que o sistema adenosinérgico também atua de forma direta na modulação de várias atividades neurológicas; o presente estudo tem como objetivo avaliar a interação entre o NPS e a adenosina sobre a atividade locomotora em camundongos.

Sabe-se que a adenosina produz seus efeitos através da ativação de seus receptores de membrana específicos, denominados receptores purinérgicos P1, divididos em quatro subtipos denominados A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Burnstock, 1972), sendo que os receptores A₁ e A_{2A} possuem suas funções mais bem elucidadas pela literatura. Recentemente foi demonstrado que a adenosina, através da inibição de A₁ e excitação de A_{2A} é essencial para a vasoativação do peptídeo VIP (Cunha-Reis et al., 2008).

Os receptores A₁ e A_{2A} são expressos em áreas estriatais. Porém, os receptores A₁ são encontrados em menor quantidade nos ganglios basais, na maioria pré-sinápticos (Rivkees et al., 1995), exercendo um controle inibitório na liberação de neurotransmissores, como a dopamina, o glutamato e a acetilcolina (Sebastião e Ribeiro, 2000). Já os receptores A_{2A} são altamente expressos em regiões dopaminérgicas, tais como o estriado e tubérculo olfatório (Jarvis e Williams, 1989), exercendo um papel de regulação na liberação de dopamina.

Os receptores de adenosina são ativados após a liberação de adenosina para o meio extracelular, que se dá de duas formas: ou através da degradação do ATP extracelular pela NTPDase 1 (converte ATP e ADP em AMP) e a ecto-5'-nucleotidase (converte AMP em adenosina) ou através do transporte como tal para o meio extracelular por meio de transportadores equilibrativos. Segundo Cunha (2001), a adenosina formada extracelularmente atua preferencialmente nos receptores A_{2A}, enquanto que a adenosina formada intracelularmente e liberada para o meio extracelular atua preferencialmente nos receptores A₁. Estes dois receptores possuem um antagonista não seletivo bastante conhecido em toda a literatura: a cafeína. Seus efeitos no ciclo sono/vigília são bem conhecidos (Radulovacki, 1985; Marks et al., 2003), assim como na atividade locomotora (Karcz-Kubicha et al., 2003; Kuzmin et al., 2006).

Da mesma forma que a adenosina, o neuropeptídeo S possui um papel fundamental na atividade locomotora. Alterações significativas na atividade locomotora dos animais foram percebidas a partir do quinto minuto da administração i.c.v. de NPS. Achados da literatura que mostram que o NPS promove hiperlocomoção em camundongos (Xu et al., 2004; Roth et al., 2006; Leonard et al., 2008; Rizzi et al., 2008) e ratos (Smith et al., 2006). De fato, em 2004, Xu e colaboradores publicaram, pela primeira vez, que o NPS causava aumento na atividade locomotora em camundongos da linhagem C57Bl/6. Neste estudo, as doses de NPS 0,01 e 0,1 nmol promoveram efeito hiperlocomotor em camundongos submetidos a um ambiente não-familiar, sendo que este efeito mantido por até 1 hora após a administração do peptídeo. Em outro estudo, Leonard e colaboradores (2008) demonstraram que o NPS na dose de 0,2 e 2 µg (cerca de 0,1 e 1 nmol) causou efeito hiperlocomotor em camundongos C57Bl/6 avaliados por 70 minutos na

caixa de monitoramento da atividade locomotora. No entanto, recentemente, Rizzi e colaboradores (2008) observaram que o NPS atenuou o efeito hipolocomotor causado pela administração prévia de diazepam em camundongos, sugerindo que o NPS produz um efeito psicoestimulante genuíno por promover aumento da locomoção em animais sedados.

Novos estudos sugerem que os receptores A₁ e A_{2A} de adenosina desempenham efeitos opostos sobre a hiperlocomoção induzida pelo NPS; ou seja, o receptor A₁ atenua o efeito hiperlocomotor, enquanto que o receptor A_{2A} contribui para o efeito hiperlocomotor do NPS (Boeck et al., 2010). Por conseguinte, no presente estudo avaliamos, através da administração de AOPCP (α - β -metileno ADP), que é um inibidor seletivo da ecto 5'-nucleotidase, o efeito hiperlocomotor exercido pelo NPS.

Sabe-se que a ecto-5'-nucleotidase é a enzima marca-passo na formação extracelular de adenosina, através da degradação do AMP. Por isso, a administração de AOPCP diminui a formação de adenosina e, provavelmente diminui a sua ação nos receptores A_{2A}.

Os nossos resultados demonstram que o NPS administrado sem a adição de AOPCP provocou o aumento esperado na locomoção de camundongos. Entretanto, quando administrado juntamente com o inibidor da enzima ecto-5'-nucleotidase, o NPS perdeu seu efeito, o que demonstra que a adenosina formada extracelularmente provavelmente atua nos receptores A_{2A} e que estes receptores potencializam o efeito obtido pelo NPS. Consequentemente, observa-se que o sistema adenosinérgico contribui para o efeito hiperlocomotor causado pelo NPS.

Entretanto, ao analisarmos a atividade enzimática em hipocampo e em estriado de camundongos, percebemos que não houve uma variação significativa da

produção final de fosfatos proveniente da degradação de nucleotídeos do grupo de animais que recebeu NPS quando comparado ao grupo que não recebeu. Isto nos leva a pensar que este recém descoberto neuromodulador NPS não influência na hidrólise do AMP para seu respectivo nucleosídeo.

CONCLUSÃO

Por fim, concluímos que a adenosina formada extracelularmente possui, através dos receptores A_{2A}, um papel importante no observado efeito hiperlocomotor oriundo do NPS, conforme previamente descrito pelo nosso grupo (Boeck et al., 2010). Entretanto, este peptídeo não tem influência direta sobre a enzima responsável pela formação extracelular de adenosina, o que nos leva a sugerir que estes dois neuromoduladores atuam de forma conjunta neste parâmetro comportamental

REFERÊNCIAS

- ACQUAS, E.; TANDA, G; Di CHIARA, G. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-preteated rats. **Neuropsychopharmacology**. 27: 182-193, 2002.
- ADAMI, M.; BERTORELLI, R.; FERRI, N.; FODDI, M.C.; ONGINI, E. Effects of repeated administration of selective adenosine A1 and A2A receptor agonists on pentylenetetrazoleinduced convulsions in the rat. **European Journal Pharmacology.**, 294:383-389, 1995.
- AGRESTI, C.; MEOMARTINI, M.E.; AMADIO, S.; AMBROSINI, E.; VOLONTÉ, C.; ALOISI, F.; VISENTIN, S. ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. **Brain Research Reviews**, 48: 157-165, 2005.
- ARAÚJO, M.C.; ROCHA, J.B.T.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESS, R.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M. R. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochemistry and Biophysical Acta**, 1740: 421-426, 2005.
- BIGONNESSE, F; LÉVESQUE, S.A.; LULKUSKI F.; LECKA, J.; ROBSON, S.C.; FERNANDES, M.J.; SEVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase 8. **Biochemistry**, 43: 5511-5519, 2004.
- BECK, B.; FERNETTE, B.; STRICKER-KRONGRAD, A. Peptide S is a novel potent inhibitor of voluntary and fast-induced food intake in rats. **Biochemistry Biophysical Research Community**, 332: 859-865, 2005.
- BOECK, C. R; KROTH, E. H; BRONZATTO, M. J; VENDITE, D. Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. **Neuropharmacology**. 49: 17-24, 2005.

BOECK, C.R.; MARTINELLO, C; DE CASTRO, A.A.; MORETTI, M.; DOS SANTOS CASAGRANDE, T.; GUERRINI, R.; CALO', G.; GAVIOLI, E.C. Blockade of adenosine A_{2A} receptor counteracts neuropeptide-S-induced hyperlocomotion in mice. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 2009; 2010, DOI number: 10.1007/s00210-009-0480-2.

BONAN, C.D.; SCHETINGER, M.R.C.; BATTASTINI, A.M.O.; SARKIS, J.J.F. Ectonucleotidases and Synaptic Plasticity: implications in physiological and pathological conditions. **Drug Development Research**, 52: 57-65, 2001.

BONAN, C.D.; WALZ, R.; PEREIRA, G.S.; WORM, P.V.; BATTASTINI, A.; CAVALLHEIRO, E.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J. J. Changes in synaptosomal ectonucleotidases activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, 39: 229-238, 2000.

BRADFORD, M.M.A. rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry** 72: 248-254, 1976.

BRUNDEGE, J.M; DUNWIDDIE, T.V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. **Advancement Pharmacology**. 39: 353-391, 1997.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacology**. Rev. 24: 509-581, 1972.

BURNSTOCK, G. Introduction: P2 Receptors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 4: 793-803, 2004

CARTMELL, J.; KEMP, J.A.; ALEXANDER, S.P.; SHINOZAKI, H; KENDALL, D.A. Modulation of cyclic AMP formation by putative metabotropic receptor agonists. **British Journal of Pharmacology**. 111: 364-369, 1994.

CASTRO, A.A.; CASAGRANDE, T.S.; MORETTI, M.; CONSTANTINO, L.; PETRONILHO, F.; GUERRA, G.C.B.; CALO', G.; GUERRINI, R.; DAL-PIZZOL,

F.; QUEVEDO, J.; GAVIOLI, E.C. Lithium attenuates behavioral and biochemical effects of neuropeptide S in mice. **Peptides** 30: 1914-1920, 2009.

CICARRELLI, R.; BALLERINI, P.; SABATINO, G.; RATHBONE, M.; D'ONOFRIO, M.; CACIAGLI, F.; DI IORIO, P. Involvement of astrocytes in purine - mediated reparative processes in the brain. **International Journal of Development Neuroscience**, 19: 395-414, 2001.

CIRUELA, F.; ESCRICHE, M.; SOLOVIEV, M.M.; CANELA, E.I.; BURGEÑO, J.; MALLOL, J.; CHAN, W.; LLUIS, C.; MCILHINNEY, R.A.J.; FRANCO, R. Adenosine-glutamate receptor-receptor interactions in the central nervous system. **Drug Development Research**. 52: 316-322, 2001.

CLINE, M.A.; GODLOVE, D.C.; NANDAR, W.; BOWDEN, C.N.; PRALL, B.C. Anorexigenic effects of central neuropeptide S involve the hypothalamus in chicks (*Gallus gallus*). **Component Biochemistry Physiological: A Molecular Integrants Physiology**., 2007.

CRAIG, C.G.; WHITE, T.D. N-Methyl-D-aspartate and non-Nmethyl- D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. **Journal of Neurochemistry**, 60: 1073 e1080, 1993.

CUNHA, R.A.; JOHANSSON, B.; VAN DER PLOEG, I. Evidence for functionally important adenosine A2A receptors in the rat hippocampus. **Brain Research**, 649: 208-216, 1994.

CUNHA, R.A.; CONSTANTINO, M.D.; SEBASTIAO, A.M.; RIBEIRO, J.A. Modification of A1 and A2a adenosine receptor binding in aged striatum, hippocampus and cortex of the rat. **Neuroreport**, 6: 1583-1588, 1995.

CUNHA, R.A.; CORREIA-DE-SÁ, P.; SEBASTIÃO, A.M.; RIBEIRO, J. A. Preferencial activation of excitatory adenosine receptors at hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. **British Journal Pharmacology** 119: 253-260, 1996.

CUNHA, R.A.; RIBEIRO, J.A. ATP as a presynaptic modulator. **Life Sciences**, 68: 119-137, 2000.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International** 38: 107-125, 2001.

CUNHA-REIS, D.; RIBEIRO, J.A.; SEBASTIÃO, A.M. A1 and A2A receptor activation by endogenous adenosine is required for VIP enhancement of K+-evoked [³H]-GABA release from rat hippocampal nerve terminals. **Neuroscience Letters**, 430: 207-212, 2008.

DOMENICI, M.R.; PEPPONI, R.; MARTIRE, A.; TEBANO, M.T.; POTENZA, R.L.; POPOLI, P. Permissive role of adenosine A_{2A} receptors on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) – mediated effects in the striatum. **Journal Neurochemistry**, 90: 1276-1279, 2004.

DUNWIDDIE, T.V.; MASINO, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous. **Annual Review** 24: 31-55, 2001.

EINAT, H. Establishment of a battery of simple models for facets of bipolar disorder: a practical approach to achieve increased validity, better screening and possible insights into endophenotypes of disease. **Behavior genetics**, 37: 244-255, 2007.

FERRÉ, S.; EULLER, G.V.; JOHANSSON, B.; FREDHOLM, B.B.; FUXE, K. Stimulation of High-Affinity Adenosine A₂ Receptors Decreases the Affinity of Dopamine D₂ Receptors in Rat Striatal Membranes. **Proceedings. Academy of Natural Sciences of Philadelphia**. 88:7238- 7241,1991.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism o action. **Cellular and molecular life sciences** : CMLS.61: 857 – 872, 2004.

FREDHOLM, B.B.; ALTIOK, N. Adenosine A_{2B} receptor signaling is altered by stimulation of bradykinin or interleukin receptors in astrogloma cells. **Neurochemistry International** 25: 99-102, 1994.

FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A.P.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classifications of adenosine receptors. **Pharmacology Review** 53: 527-552, 2001.

FREDHOLM, B.B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death Difference**, 14: 1315-1323, 2007.

FREY, B.N.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; MARTINS, M.R.; PETRONILHO, F.C.; BARDINI, K.; DAL-PIZZOL, F; KAPCZINSKI, F; QUEVEDO, J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induce oxidative stress generation in an animal model of mania. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, 31: 326-332, 2006.

HACK, S.P.; CHRISTIE, M.J. Adaptations in adenosine signaling in drug dependence: therapeutic implications. **Critical Review Neurobiological**, 15: 235-274, 2003.

HOEHN, K.; WHITE, T.D. Role of excitatory amino acid receptors in KC- and glutamate-evoked release of endogenous adenosine from rat cortical slices. **Journal of Neurochemistry**, 54: 256 – 265, 1990.

HOKFELT, T.; BARTFAI, T.; BLOOM, F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. **Lancet Neurological**: 2: 463-472, 2003.

HUNSUCKER, S.; MITCHELL, B.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidase as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacology and Therapeutic**, 107: 1-30, 2005.

ILLES, P.; RIBEIRO, A. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. **European Journal of Pharmacology**, 483: 5-17, 2004.

JACOBSON, K.A.; VON LUBITZ, D.K.; DALYM, J.W.; FREDHOLMM B.B. Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. **Trends Pharmacology Science**, 17: 108-113, 1996.

LAGE R.; DIEGUEZ C.; LOPEZ M. Caffeine treatment regulates neuropeptide S system expression in the rat brain. **Neuroscience Letters**, 410: 47-51, 2006.

LARA, D.R.; SOUZA, D. O. Modelo de hipofunção adenossinérgica para a esquizofrenia: interação entre sistemas purinérgicos, glutaminérgico e dopaminérgico. **Revista de Psiquiatria Clínica**. 28: 12-13, 2001

LEE, Y.C.; CHIEN, C.L.; SUN, C.N.; HUANG, C.L.; HUANG, N.K.; CHIANG, M.C.; LAI, H. L.; LIN, Y.S.; CHOU, S.Y.; WANG, C.K.; TAI, M.H.; LIAO, W.L.; LIN, T.N.; LIU, F.C.; CHERN, Y. Characterization of the rat A2A adenosine receptor gene: a 4.8-kb promoter-proximal DNA fragment confers selective expression in the central nervous system. **European Journal Neuroscience**, 18: 1786-1796, 2003.

LINDSKOG, M.; SVENNINGSSON, P.; POZZI, L.; KIM, Y.; FIENBERG, A.A.; BIBB, J.A.; FREDHOLM BB; NAIRN AC; GREENGARD P; FISONE G.. Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine, **Nature**, 418: 774–778, 2002.

LLOYD, H.G., SCHRADER, J. Adenosine metabolism in the guinea pig heart: the role of cytosolic S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, 5'-nucleotidase and adenosine kinase. **European Heart Journal**, 14:27-33, 1993.

LOPES, L.V.; CUNHA, R.A.; KULL, B. Adenosine A2A receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on the tonic A1 receptor inhibition. **Neuroscience**, 112:319-329, 2002.

LUNKES, G.I.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSCH, A.; MORSCH, V.; MAZZANTI, C.M.; SCHETINGER, M. R. Enzymes that hydrolyze adenine

nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Trombosis Research**, 109: 189-194, 2003

MEGSON, A.C.; DICKENSON, J.M.; TOWNSEND-NICHONSON, A.; HILL, S. Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A₁-receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells. **British Journal Pharmacology** 115: 1415-1424, 1995.

NEARY, J.T.; RATHBONE, M.P.; CATTABENI, F. Trophic actions os extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. **Tins**. 19: 13-18, 1996.

NIIMI, M. Centrally administered neuropeptide S activates orexin-containing neurons in the hypothalamus and stimulates feeding in rats. **Endocrine**, 30: 75-79, 2006.

OKAMURA, N.; REINSCHEID, R.K.; OHGAKE, S.; IYO, M.; HASHIMOTO, K. Neuropeptide S attenuates neuropathological, neurochemical and behavioral changes induced by the NMDA receptor antagonist MK-801. **Neuropharmacology** 58: 166-172, 2010.

ONGINI, E.; FREDHOLM, B.B. Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors. **Trends Pharmacology Science** 17: 364-372, 1996.

OSLEY, J. W. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. **Annual Review Pharmacological Toxicology**, 30: 40-71, 1990.

POLI, A.; LUCCHI, R.; VIBIO, M.; BARNABEI, O. Adenosine and glutamate modulate each other's release from rat hippocampal synaptosomes. **Journal of Neurochemistry**, 57: 298 – 306, 1991.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Review**, 50: 413-492, 1998.

RAMKUMAR, V.; STILES, G.L.; BEAVEN, M.A.; ALI, H. The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. **Journal Biological Chemistry** 268: 16887-16890, 1993.

REBOLA, N.; OLIVEIRA, C.R.; CUNHA, R.A. Transducing system operated by adenosine A2A receptors to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. **European Journal Pharmacology**, 454: 31-38, 2002.

REBOLA, N.; COELHO, J.E.; COSTENLA, A.R.; LOPES, L.V.; PARADA, A.; OLIVEIRA, C.R.; SOARES DA SILVA, P.; DE MENDONÇA, A.; CUNHA, R.A. Decrease of adenosine A1 receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats. **European Journal Neuroscience**. 18: 820-828, 2003.

REBOLA, N.; CANAS, P.M.; OLIVEIRA, C.R.; CUNHA, R.A. Different synaptic and subsynaptic localization os adenosine A2A 2005 receptors in the hippocampus and striatum of the rat. **Neuroscience**, 132: 893-903, 2005.

REINSCHEID, R.K. Phylogenetic appearance of neuropeptide S precursor proteins in tetrapods. **Peptides**, 28: 830-837, 2007.

REINSCHEID, R.K.; XU, Y.L.; OKAMURA, N.; ZENG, J.; CHUNG, S.; PAI, R.; WANG, Z.; CIVELLI,O. Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide S receptor variants. **Journal Pharmacological Therapy**, 315: 1338-1345, 2005.

RIBEIRO, J.A.; SEBASTIÃO, A.M.; DE MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Progress Neurobiology** 68; 377-392, 2003.

SARKIS, J.; BATTASTINI, A.; OLIVEIRA, E.; FRASSETTO, S.; DIAS, F. ATP diphosphohydrolases: and overview. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**,43: 131-136, 1995.

SATO, S.; SHINTANI, Y.; MIYAJIMA,N.; YOSHIMURA, K. Novel G protein-coupled receptor protein and DNA thereof, **World Patent Application**, WO 02/31145 A1, 2002.

SCHMITD, A.P.; BOHMEN, A.E.; LEKE, R.; SCHALLENBERGER, C.; ANTUNES, C., PERERIRA, M.S.L.; WOFCHUK, S.T.; ELISABETSKY, E.; SOUZA, D.O. Antinociceptive effects of intracerebroventricular administration of guanine-based purines in mice: evidences for the mechanism of action. **Brain Research**. 1234: 50-58, 2008.

SEBASTIÃO, A.M.; CUNHA, R.A.; DE MENDOÇA, A.; RIBEIRO, J.A. Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. **British Journal Pharmacology**, 131: 1629 – 1634, 2000.

SEBASTIÃO, A.M.; MACEDO, M.P.; RIBEIRO, J.A. Tonic activation of A2A adenosine receptors unmasks, ando f A1 receptors prevents a facilitatory action of calcitonin gene-related peptide in the rat hippocampus. **British Journal Pharmacology**, 129: 374 – 380, 2000.

SHI, J.; KUKAR, T.; WANG, C.; LI, Q.; CRUZ P. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo apyrase. **The Journal of Biological Chemistry**, 276: 17471-17478, 2001.

SOARES, F.A.; SCHMIDT, A.P.; FARINA, M.; FRIZZO, M.E.S.; TAVARES R.G.; PORTELA, L.V.C.; LARA, D.R; SOUZA, D.O. Anticonvulsant effects of GMP depends on its conversion to guanosine. **Brain Research**. 1005: 182 – 186, 2004.

SPERLÁGH, B.; VIZI, E. Neuronal synthesis, storage and release of ATP. **The Neuroscience**, 8: 175-186, 1996

STEVENS, B.; PORTA, S.; HAAK, L.; GALLO, V.; FIELDS, D. Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. **Neuron**, 36: 855-868, 2002.

SVENNINGSSON, P.; LE MOINE, C.; FISONE, G.; FREDHOLM, B.B. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. **Progress Neurobiology**, 59: 355-396, 1999.

VACAS, J.; FERNANDEZ, M.; ROS, M.; BLANCO, P. Adenosine modulation of [Ca_{2C}]i in cerebellar granule cells: multiple adenosine receptors involved. **Brain Research**, 992: 272-280, 2003.

VIZI, E.S.; LIAND, S.D.; SPERLAGH, B. Studies on the release and extracellular metabolism of endogenous ATP in rat superior cervical ganglion: support for neurotransmitter role of ATP. **Neuroscience**, 79: 893 - 903, 1997.

VON LUBITZ, D.K.; LIN, R.C.; POPIK, P.; CARTER, M.F.; JACOBSON, K.A. Adenosine A₃ receptor stimulation and cerebral ischemia. **European Journal Pharmacology**, 263: 59-67, 1994.

VON LUBITZ, D.K.; LIN, R.C.; JACOBSON, K.A. Cerebral ischemia in gerbils: effects of acute and chronic treatment with adenosine A_{2A} receptor agonist and antagonist. **European Journal Pharmacology**, 287: 295-302, 1995.

WINK, M.; BRAGANHOL, E.; TAMAJUSUKU, A.; CASALI, E.; KARL, J.; BARRETO-CHAVES, M.; SARKIS, J.J.; BATTASTINI, A.M. Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocytes cultures from different brain regions. **Neurochemistry International**, 43; 621-628, 2003.

XU, Y.L.; GALL, C.M.; JACKSON, V.R.; CIVELLI, O.; REINSCHEID, R.K. Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. **Journal Comportamental Neurology**, 500: 84-102, 2007

XU, Y.L.; REINSCHEID, R.K.; RESENDIZ, H.S.; CLARK, S.D.; WANG, Z.; LIN, S.H.; BRUCHER, F.A.; ZENG, J.; LY, N.K.; HENRIKSEN, S.J.; LECEA, L.; CIVELLI, O.

Neuropeptide S: A neuropeptide promoting aurosal and anxiolytic-like effects.
Neuron, 43: 487-497, 2004.

ZIGANSHIN, A.U.; HOYLE, C.; BURNSTOCK, G. Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. **Drug Development Research**, 32: 134-146, 1994.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, 49: 589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H.; BRAUN, N.; KEGEL, B.; HEINE, P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. **Neurochemistry International**, 32: 421-425, 1998.

ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends in Pharmacological Sciences**, 20: 231-236, 1999.

ZIMMERMANN, H., BRAUN, N. Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. **Progress Brain Research**, 120: 371-385, 1999.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, 52: 44-56, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)