

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

CAROLINE ARAÚJO COSTA DE LIMA

RECEPTOR A2A DE ADENOSINA MODULA O TRANSPORTE DE GLUTAMATO
INDEPENDENTE DE SÓDIO EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA RETINA

BELÉM

2024

CAROLINE ARAÚJO COSTA DE LIMA

RECEPTOR A2A DE ADENOSINA MODULA O TRANSPORTE DE GLUTAMATO
INDEPENDENTE DE SÓDIO EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA RETINA

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 grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – Concentração em Neurociências.

Orientador(a): Dr(a) Karen Renata Herculano Matos Oliveira.

BELÉM

2024

CAROLINE ARAÚJO COSTA DE LIMA

RECEPTOR A2A DE ADENOSINA MODULA O TRANSPORTE DE GLUTAMATO
INDEPENDENTE DE SÓDIO EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DA RETINA

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 grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – Concentração em Neurociências.

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a). Karen Renata Herculano Matos Oliveira (Orientadora)

Prof. Dr. Alan Barroso Araújo Grisólia

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

Prof(a). Dr(a). Luana Ketlen Reis Leão (Suplente)

BELÉM
2024

RESUMO

Desregulações nos níveis extracelulares de glutamato estão diretamente associadas a diversas patologias do SNC, evidenciando a importância dos transportadores de glutamato na manutenção da homeostasia tecidual e no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. A retina é particularmente vulnerável a eventos excitotóxicos devido aos seus altos níveis de glutamato extracelular e à exposição frequente a estímulos oxidantes, reforçando a necessidade de mecanismos regulatórios para preservação da fisiologia retiniana. Nesse contexto, a adenosina emerge como um neuromodulador essencial, apresentando efeitos regulatórios dependentes de concentração e do tipo de receptor ativado. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar o efeito da adenosina no transporte de glutamato independente de sódio em cultura de células retinianas. Assim, culturas primárias mistas de embriões de galinha *White leghorn* (E7-E8) foram mantidas por 7 dias em DMEM+10% de FBS a 37°C e 5% de CO₂. As células foram submetidas a uma pré-incubação com bloqueador do receptor A2A e incubadas com diferentes concentrações de adenosina para os ensaios de liberação e captação de glutamato. Os níveis de glutamato foram quantificados por CLAE, e os níveis de proteína pelo método de Bradford, com substituição equimolar de NaCl por LiCl. Além disso, a imunofluorescência com anticorpo anti-xCT e marcador nuclear DAPI foi utilizada para identificar o transportador de glutamato independente de sódio, com análise de imagens no ImageJ e Photoshop CS6. A análise estatística foi realizada pelo teste T de Student e ANOVA *one-way* com *post-hoc* Tukey pelo GraphPad 9.0 com dados expressos como porcentagem de controle ± D.P. com $p < 0,05$. Os resultados confirmaram a expressão da subunidade xCT, indicando que o sistema xCG⁻ é o transportador de glutamato independente de sódio nas células da retina. Observou-se também que a adenosina na concentração de 50 μM aumentou a liberação de glutamato em cerca de 800%, enquanto a captação de glutamato independente de sódio foi completamente inibida. Estes efeitos foram totalmente revertidos com a inibição do A2AR. Assim, mostramos que a ativação do receptor A2A modula o transporte de glutamato independente de sódio cuja expressão foi detectada em células da retina.

Palavras-Chave:

Adenosina; Neuromodulação; Sódio-independente; Glutamato.

ABSTRACT

Dysregulation of extracellular glutamate levels is directly associated with several CNS pathologies, highlighting the importance of glutamate transporters in maintaining tissue homeostasis and developing new therapeutic approaches. The retina is particularly vulnerable to excitotoxic events due to its high levels of glutamate extracellular and the frequent exposure to oxidative stimuli, reinforcing the need for regulatory mechanisms to preserve retinal physiology. In this context, adenosine emerges as an essential neuromodulator, exhibiting regulatory effects that are concentration- and receptor-dependent. Therefore, the objective of this study was to characterize the effect of adenosine on sodium-independent glutamate transport in retinal cell culture. As such, mixed primary cell cultures from *White leghorn* chick embryos (E7-E8) were maintained for 7 days in DMEM+10% FBS at 37°C and 5% CO₂. The cells were submitted to a pre-incubation with an A2A receptor blocker and incubated with different adenosine concentrations for glutamate release and uptake assays. Glutamate levels were quantified by HPLC, and protein levels were measured by the Bradford method, with equimolar substitution of NaCl by LiCl. Furthermore, immunofluorescence with an anti-xCT antibody and the nuclear marker DAPI was used to identify the sodium-independent glutamate transporter, with image analysis performed using ImageJ e Photoshop CS6. Statistical analysis was conducted using Student's test T and ANOVA one-way with Tukey post-hoc test via GraphPad 9.0, with data expressed as percentage of control±S.D. with p<0,05. The results confirmed the expression of the xCT subunit, indicating that the system x_{CG}⁻ is the sodium-independent glutamate transporter in retinal cells. Additionally, adenosine at a concentration of 50µM increased glutamate release by approximately 800%, while glutamate sodium-independent uptake was completely inhibited. These effects were fully by A2A receptor blockade. Therefore, we demonstrated that activation of the A2A receptor modulates glutamate sodium independent transport, whose

Keywords:

Adenosine; Neuromodulation; Sodium-independent; Glutamate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema simplificado do metabolismo da adenosina.....	12
Figura 2: Esquema da sinalização glutamatérgica modulada por adenosina.....	15
Figura 3: Estrutura e funcionamento do transportador x_{CG}^-	18
Figura 4: Representação esquemática da retina e suas camadas celulares.....	20
Figura 5: Esquema representativo dos ensaios de liberação e captação de glutamato.....	25
Figura 6: Imunomarcção para xCT em células da retina.....	26
Figura 7: Liberação de glutamato independente de sódio sob efeito da adenosina.....	27
Figura 8: Captação de glutamato independente de sódio sob efeito da adenosina.....	28
Figura 9: Liberação de glutamato independente de sódio com bloqueio do receptor A2A de adenosina.....	29
Figura 10: Captação de glutamato independente de sódio com bloqueio do receptor A2A de adenosina.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

γ-GCS	γ -Glutamilcisteína Sintase
ADA	Adenosina Deaminase
ADP	Adenosina Difosfato
AK	Adenosina Cinase
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina de Soro Bovino
CCG	Camada de Células Ganglionares
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMF	Meio Livre de Cálcio e Magnésio
cN	Endonucleotidase
CNE	Camada Nuclear Externa
CNI	Camada Nuclear Interna
CNT	Transportador Concentrativo de Nucleosídeos
CPE	Camada Plexiforme Externa
CPI	Camada Plexiforme Interna
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindol
DIV	Dias <i>in vitro</i>
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAATs	Transportadores de Aminoácidos Excitatórios
Ecto-NTPDase-1	Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase ou CD39
Ecto-5'-NT	Ecto-5'-Nucleotidase ou CD73
ENT	Transportador Equilibrativo de Nucleosídeos
EPR	Epitélio Pigmentar Retiniano
FBS	Soro Bovino Fetal
GABA	Ácido γ -Aminobutírico
GLT-1	Transportador de Glutamato-1

GS	Glutationa Sintetase
GSH	Glutationa Reduzida
HMS	Homosserina
iGluRs	Receptores Ionotrópicos de Glutamato
IP3	Inositol Trifosfato
LiCl-HBSS	Solução de Hank Sal Balanceada de LiCl
mGluRs	Receptores Metabotrópicos de Glutamato
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
NDPK	Nucleotídeo Difosfocinase
NMDA	N-metil-D-aspartato
OPA	Ortoftalaldeído
PACAP	Polipeptídeo Ativador de Adenilato Ciclase Hipofisário Pleiotrópico
PBS	Solução Salina de Tampão Fosfato
PKA	Proteína Cinase A
PKC	Proteína Cinase C
SAHH	S-adenosil-homocisteína hidrolase
SCH 58261	5-amino-7-(2-feniletil)-2-(2-furil)- pirazolo(4,3-e)-1,2,4-triazolo(1,5-c)pirimidina
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Ácido Tricloroacético
vGluT	Transportador de Glutamato Vesicular

A meus pais, que sonharam com este dia junto comigo.
*“Some say ‘never meet your heroes’
but I say ‘If you’re lucky enough you get them as your parents’”*
- Laura Dern

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 ADENOSINA: ASPECTOS GERAIS.....	11
1.2 EFEITOS NEUROMODULADORES DA ADENOSINA.....	13
1.3 SISTEMA x_{CG}^-	16
2. OBJETIVO.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 MATERIAL.....	22
3.2 CULTURA PRIMÁRIA MISTA DE CÉLULAS DA RETINA.....	22
3.3 ENSAIO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	23
3.4 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS.....	23
3.5 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E CAPTAÇÃO E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	24
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1 CÉLULAS DA RETINA <i>IN VITRO</i> EXPRESSAM O TRANSPORTADOR x_{CG}^-	26
4.2 ADENOSINA AUMENTA A LIBERAÇÃO E DIMINUI A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO INDEPENDENTE DE SÓDIO EM CÉLULAS DA RETINA.....	27
4.3 BLOQUEIO DO RECEPTOR A2A MEDEIA OS EFEITOS INDUZIDOS PELA ADENOSINA SOBRE O TRANSPORTE DE GLUTAMATO SÓDIO-INDEPENDENTE <i>IN VITRO</i>	29
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXO I.....	48
ANEXO II.....	49

1. INTRODUÇÃO

Desregulações na neurotransmissão estão diretamente relacionadas à fisiopatologia de diversas doenças que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC), como a Doença de Parkinson, a Isquemia Cerebral e o Glaucoma (LEWERENZ *et al.*, 2013; SEARS & HEWETT, 2021). Conforme descrito na literatura, a metilação do promotor de transportadores de glutamato desempenha um papel crucial na disfunção astrogliar na Esclerose Lateral Amiotrófica (CHANG *et al.*, 2021), enquanto estudos clínicos com pacientes com esquizofrenia identificam a desregulação do transporte de glutamato como um fator relevante na fisiopatologia da doença (FOURNIER *et al.*, 2017). Nesse contexto, o controle dos mecanismos de sinalização é fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens farmacológicas e terapêuticas, evidenciando a importância dos neuromoduladores.

Neuromoduladores consistem em uma grande variedade de substâncias, incluindo alguns peptídeos, que têm a capacidade de modificar a comunicação sináptica, influenciando a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade neuronal e a atividade e a expressão de diversos componentes da transmissão sináptica, como receptores e transportadores (NADIM & BUCHER, 2014). Atualmente, um dos moduladores mais amplamente caracterizados no SNC é a adenosina, capaz de atuar sobre diversos sistemas de neurotransmissão, como o dopaminérgico, o colinérgico, o serotoninérgico e o glutamatérgico (BOREA *et al.*, 2018; CUNHA, 2011).

ADENOSINA: ASPECTOS GERAIS

A adenosina é um nucleosídeo endógeno que desempenha várias funções essenciais, atuando como composto estrutural para o material genético celular, como fonte reserva de energia na forma de 5'-Adenosina Trifosfato (ATP), além de exercer o papel de sinalizador celular e neuromodulador (KASHFI *et al.*, 2016). Sob condições fisiológicas normais, os níveis extracelulares deste nucleosídeo mantêm-se na faixa nanomolar de concentração, variando entre 30-300 nM (HASKÓ *et al.*, 2008; NAVIA *et al.*, 2020), sendo esta molécula sintetizada tanto no meio extracelular quanto intracelularmente (BOISON *et al.*, 2012).

No meio extracelular, a adenosina é gerada através da cascata de conversão ATP/ADP/AMP (ADP, adenosina difosfato; AMP, adenosina monofosfato), mediada pelas enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (Ecto-NTPDase1 ou CD39) e ecto-5'-

nucleotidase (Ecto-5'-NT ou CD73), respectivamente. Por outro lado, no meio intracelular, esta cascata é mediada pela ação sequencial das enzimas 5'-nucleotidasas citoplasmáticas, NDPK (Nucleotídeo Difosfocinase), AK (Adenosina Cinase) e cN (endonucleotidase) (CHANG *et al.*, 2021). Uma vez sintetizado, este nucleosídeo é liberado diretamente no meio extracelular por meio dos Transportadores Equilibrativos e Concentrativos de Nucleosídeos (ENT e CNT, nesta ordem), os quais também são responsáveis pela importação de adenosina para o meio intracelular à favor ou contra o gradiente de concentração, respectivamente (BOISON *et al.*, 2012; GU *et al.*, 1995). Além disso, após sua síntese, a adenosina pode ser degradada em inosina ou AMP por ação da adenosina deaminase (ADA) e adenosina cinase (AK), respectivamente (FIGURA 1; BOISON *et al.*, 2012; CHANG *et al.*, 2021), ou pode ativar quatro subtipos de receptores metabotrópicos pertencentes à família de receptores P1: A1, A2A, A2B e A3 (Revisado por BOREA *et al.*, 2018).

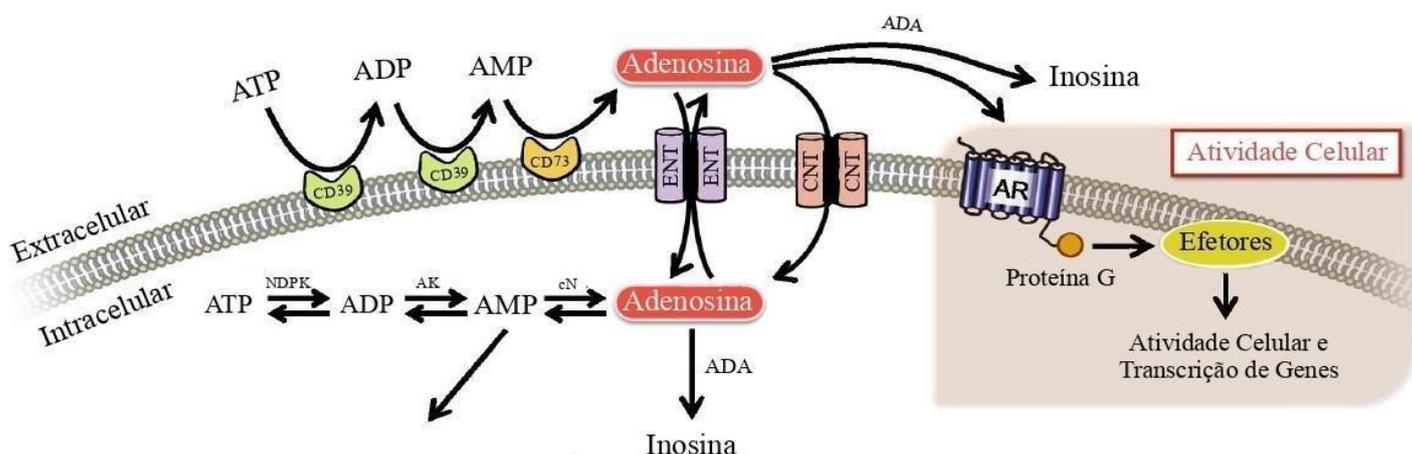


Figura 1: Esquema simplificado do metabolismo da adenosina. No meio extracelular, o ATP e o ADP podem ser hidrolisados em AMP pela CD39, sendo o AMP convertido em adenosina pela CD73. A adenosina extracelular pode ativar a sinalização celular mediada por AR através de proteínas G e efetores associados, degradar-se em inosina pela ADA ou ser transportada através da membrana plasmática através dos ENTs ou dos CNTs. No compartimento intracelular, o ATP pode ser hidrolisado em ADP e AMP por NDPK e AK, respectivamente, com o AMP sendo convertido em adenosina por cN. A adenosina intracelular pode ser degradada em inosina pela ADA, transportada para o compartimento extracelular ou resintetizada em ATP por enzimas metabólicas. ADA, adenosina deaminase; AK, adenosina cinase; ARs, receptores de adenosina; cN, endonucleotidase; CNT, transportador concentrativo de nucleosídeos; ENT, transportador equilibrativo de nucleosídeos; NDPK, nucleotídeo difosfocinase. Fonte: Adaptado de Chang *et al.*, 2021.

Os receptores A1 e A3 são acoplados às proteínas Gi/o ou Gi/q, enquanto os receptores A2A e A2B estão associados às proteínas Gs ou Gs/q (BOREA *et al.*, 2018), com o receptor

A1 apresentando maior afinidade pela adenosina (KASHFI *et al.*, 2016). A ativação dos receptores A1 e A2A modula a atividade da adenilil ciclase, reduzindo e aumentando seus níveis, respectivamente, afetando diretamente os níveis intracelulares de AMPc (Adenosina Monofosfato Cíclica) e a atividade da Proteína Cinase A (PKA). Por outro lado, embora os receptores A2B e A3 também influenciem a concentração celular de AMPc, sua ativação está mais associada ao aumento e à redução da atividade da Proteína Cinase C (PKC), respectivamente (Revisado por BOREA *et al.*, 2018).

No SNC, o receptor A1 está amplamente distribuído em áreas como córtex, hipocampo e cerebelo (FREDHOLM *et al.*, 2005), sendo encontrado tanto em neurônios quanto em células gliais (GEBICKE-HAERTER *et al.*, 1996; OTHMAN, YAN & RIVKEES, 2003; SHETH *et al.*, 2014). Por sua vez, o receptor A2A é encontrado em neurônios, micróglia e oligodendrócitos (LI *et al.*, 2001; MELANI *et al.*, 2009; SHETH *et al.*, 2014) no corpo estriado, no bulbo olfatório (FREDHOLM *et al.*, 2005; SHETH *et al.*, 2014) e na retina (YE, TANG & SONG, 2021). Por outro lado, os receptores A2B e A3 apresentam uma distribuição mais restrita, com baixos níveis de expressão em células neuronais e gliais (BRAND *et al.*, 2001; SEBASTIÃO & RIBEIRO, 1996) no hipocampo, cerebelo e *striatum* (FREDHOLM *et al.*, 2005; SHETH *et al.*, 2014).

EFEITOS NEUROMODULADORES DA ADENOSINA

No sistema cardiovascular, a adenosina exerce potentes efeitos vasodilatadores (REISS *et al.*, 2020), com o receptor A2A sendo o principal responsável pelo relaxamento do músculo liso arterial, facilitando o fluxo sanguíneo e o transporte de oxigênio (HEIN *et al.*, 2001). No sistema imune, este nucleosídeo desempenha um papel crucial no controle de respostas imunológicas (HASKO, ANTONIOLI & CRONSTEIN, 2018), sendo essencial a ativação do receptor A1 para a diferenciação de monócitos e para a secreção de interleucinas em estudos *in vitro* (EUDY & DA SILVA, 2021; ZHONG, PENG & ZENG, 2022). Ademais, evidências sugerem que a ativação dos receptores A1 e A2A modula, de forma indireta, a liberação de ácido gástrico, gastrina e somatostatina (ARIN *et al.*, 2017; YIP & KWOK, 2004; YIP, LEUNG & KWOK, 2004), ressaltando a ampla influência da adenosina na manutenção da homeostase corporal.

No SNC, a adenosina participa da regulação do sono, do estado de vigília e do ritmo circadiano (BURKE *et al.*, 2015; REICHERT, DEBOER & LANDOLT, 2022), além de

modular diversos processos cognitivos, como memória e aprendizado, em indivíduos saudáveis e em modelos experimentais de Doença de Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (GARCIA-GIL *et al.*, 2021). Ademais, este nucleosídeo é fundamental em processos relacionados à adicção e dependência química (NAM *et al.*, 2012), com a ativação do receptor A2A sendo responsável pela redução de sintomas causados por anfetaminas (WYDRA *et al.*, 2020). Além disso, a adenosina modula a nocicepção, com o receptor A1 promovendo efeitos antiinflamatórios e analgésicos (HADDAD *et al.*, 2023).

No SNC, um dos principais sistemas de neurotransmissão modulados pela adenosina é o glutamatérgico. Segundo Bai *et al.* (2018), a ativação do receptor A2A aumenta os níveis extracelulares de glutamato em um modelo de privação de oxigênio-glicose *in vitro*, além de inibir a atividade do Transportador de Glutamato-1 (GLT-1) e estimular a liberação de glutamato em astrócitos (MATOS *et al.*, 2012). Adicionalmente, Braga *et al.* (2019) caracterizaram que a ativação do receptor A1 modula a liberação de glutamato induzida por estímulo hipertônico no hipotálamo. Ademais, o receptor A2A regula a ativação do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) de glutamato na microglia (FRANCO *et al.*, 2020), e o bloqueio deste receptor atenua a excitotoxicidade glutamatérgica após insultos isquêmicos (COPPI, CHERCHI & GIBB, 2023). Além disso, o *knockout* de ENT altera os níveis extracelulares de adenosina, promovendo uma regulação negativa da expressão de EAAT2 (Transportador de Aminoácidos Excitatórios 2; NAM *et al.*, 2012), salientando a importância da adenosina na modulação do sistema glutamatérgico (FIGURA 2).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, com suas concentrações extracelulares variando entre as ordens nanomolar e micromolar (REINER & LEVITZ, 2018). Este neurotransmissor pode ser convertido diretamente em glutamina pela enzima glutamina sintetase, sendo a glutamina um precursor na síntese de neurotransmissores como o GABA (Ácido γ -Aminobutírico) e o próprio glutamato. Paralelamente, parcela significativa do glutamato é metabolizada em α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), contribuindo para a síntese de ATP (SEARS & HEWETT, 2021).

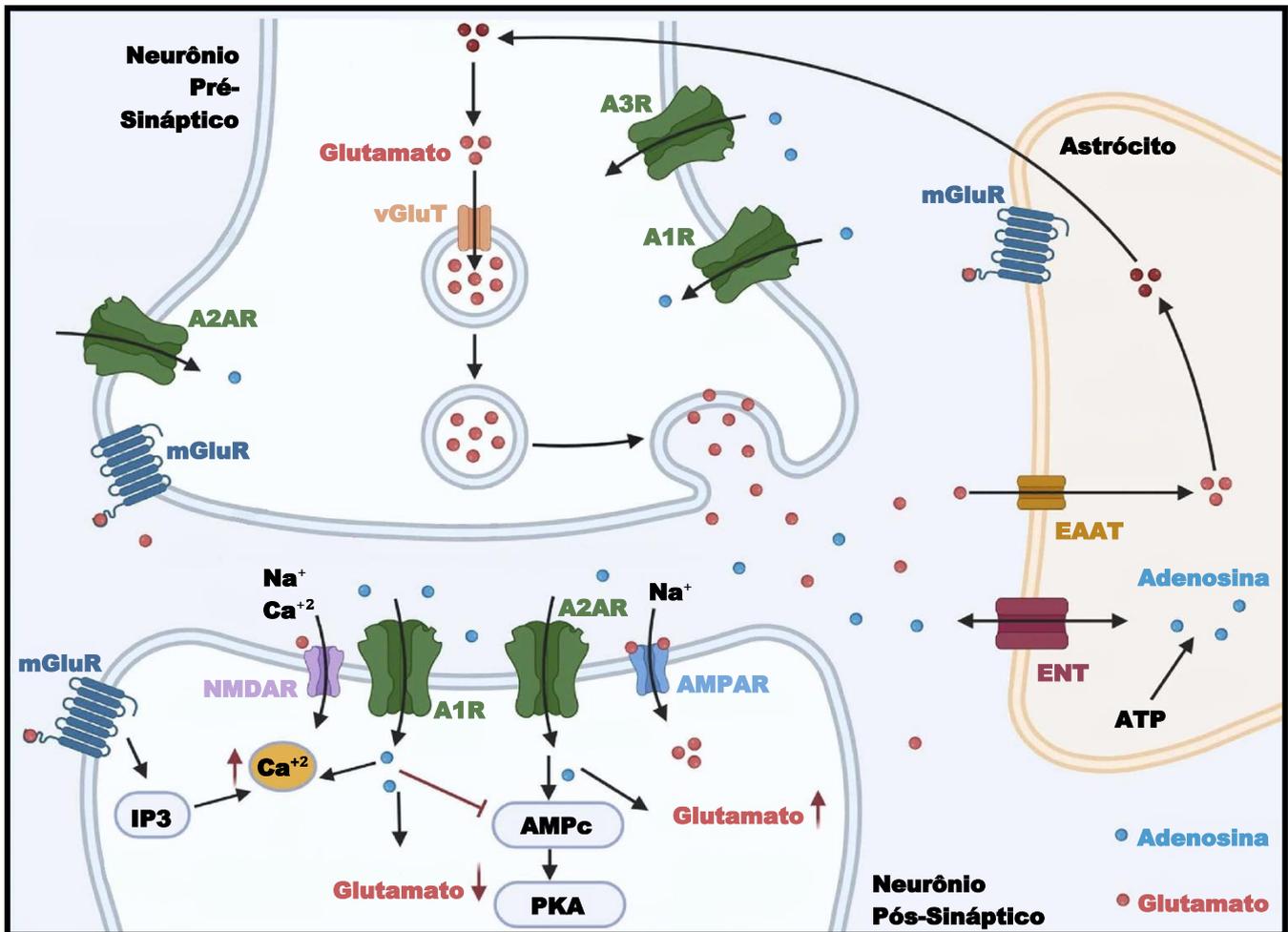


Figura 2: Esquema da sinalização glutamatérgica modulada por adenosina. No neurônio pré-sináptico, os receptores de adenosina A1 e A3 inibem a liberação vesicular de glutamato, enquanto o receptor A2A estimula esta liberação. No neurônio pós-sináptico, a ativação do receptor A1 reduz os níveis de AMPc, bloqueando a via de PKA, inibindo a síntese de glutamato e íon cálcio, além de regular a atividade dos receptores mGluR e NMDA. Por outro lado, o receptor A2A ativa a via AMPc-PKA, promovendo a síntese de glutamato e regulando a atividade do receptor AMPA. Nos astrócitos, o *knockout* do transportador ENT reduz indiretamente a expressão de transportador EAATs. A1R, receptor A1 de adenosina; A2AR, receptor A2A de adenosina; A3R, receptor A3 de adenosina; AMPAR, Receptor AMPA (Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico); AMPc, Adenosina Monofosfato Cíclica; ATP, Adenosina Trifosfato; EAATs, Transportadores de Aminoácidos Excitatórios; ENT, transportador equilibrativo de nucleosídeo; IP3, Inositol Trifosfato; NMDAR, Receptor NMDA (N-metil-D-aspartato); mGluR, Receptor Metabotrópico de Glutamato; PKA, Proteína Cinase A; vGluT, Transportador de Glutamato Vesicular. Fonte: Adaptado de Jang & Song, 2024.

Uma vez na fenda sináptica, o glutamato pode ativar receptores ionotrópicos (iGluRs) ou metabotrópicos (mGluRs), amplamente distribuídos no SNC (REINER & LEVITZ, 2018). No entanto, seu excesso no meio extracelular pode desencadear a ativação desregulada de iGluRs, levando à excitotoxicidade, caracterizada por aumento exacerbado na concentração intracelular de cálcio. Isto provoca uma sobrecarga nas mitocôndrias e um desequilíbrio redox, resultando em morte celular (VERMA, LIZAMA & CHU, 2022), evidenciando a importância do controle dos níveis extracelulares deste neurotransmissor. A manutenção desses níveis adequados é realizada pelos EAATs, que compreendem cinco subtipos conhecidos (EAAT1-EAAT5; SEARS & HEWETT, 2021), e pelo sistema x_{CG}^- , cuja atividade é independente de sódio (BURDO, DARGUSCH & SCHUBERT, 2006; MARTIS *et al.*, 2020).

SISTEMA x_{CG}^-

O sistema x_{CG}^- é composto por uma subunidade estabilizadora (4F2hC ou SLC3A2) e uma subunidade catalítica (xCT ou SLC7A11), que utilizam o gradiente de íons Cl^- para realizar o antiporte cistina-glutamato na proporção de 1:1 (FIGURA 3; KOPPULA, ZHUANG & GAN, 2021). Este transportador capta a cistina que, uma vez no citosol, é convertida em cisteína por meio de uma reação de redução que consome NADPH (Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida). A cisteína produzida é então utilizada na síntese de GSH em duas etapas: i) Formação de γ -glutamilcisteína a partir de cisteína e glutamato, pela γ -glutamilcisteína sintase (γ -GCS); ii) Formação de GSH a partir de γ -glutamilcisteína pela glutathione sintetase (GS) (JYOTSANA, TA & DeGIORNO, 2022).

A GSH é um dos principais antioxidantes endógenos do SNC, e alterações em sua concentração intracelular estão diretamente associadas ao estresse oxidativo e ao acúmulo de espécies reativas (WANG *et al.*, 2022). Este desequilíbrio no estado redox está diretamente relacionado a diversas patologias que acometem o SNC, como a Doença de Alzheimer (OLUFUNMILAYO, GERKE-DUNCAN & HOLSINGER, 2023), destacando a importância da GSH na manutenção da homeostase celular e a função essencial do sistema x_{CG}^- para sua síntese e combate ao estresse oxidativo.

Sob condições normais, a expressão de xCT *in vivo* permanece restrita ao sistema nervoso central e ao sistema imunológico, com a detecção de seu mRNA no cérebro, na retina, no timo e no baço (SATO *et al.*, 2002; TAGUCHI *et al.*, 2007). Estudos apontam que camundongos *knockout* para *Slc7a11* são viáveis, saudáveis e não apresentam fenótipo

deletério evidente (CHINTALA *et al.*, 2005; DE BUNDEL *et al.*, 2011), sugerindo um papel não-essencial do sistema x_{CG}^- *in vivo*. No entanto, pesquisas demonstram que estímulos estressores, como hipóxia e formação de células tumorais, promovem uma regulação positiva de xCT (DAHLMANN *et al.*, 2023). Diversos trabalhos indicam também que, em quadros de Câncer, Esquizofrenia, Depressão e outras patologias do SNC pode haver um aumento na expressão e na atividade deste sistema (FOURNIER *et al.*, 2017; KITAGAWA *et al.*, 2019; KOPPULA, ZHUANG & GAN, 2021), tornando-o um possível alvo terapêutico para o tratamento destas doenças.

Adicionalmente, o xCT desempenha um papel crucial no cultivo *in vitro*, uma vez que a cistina captada pelo sistema x_{CG}^- é fator limitante para a síntese de GSH, e a depleção deste antioxidante está associada à morte celular (DAHER, VUČETIĆ & POUYSSÉGUR, 2020; POLTORACK & DIXON, 2021). Martins *et al.* (2023) caracterizaram o sistema x_{CG}^- como o principal mediador da captação de glutamato independente de sódio nas células gliais do tecido coclear. Ademais, Oliveira *et al.* (2010) demonstraram que o transporte sódio-independente de glutamato apresenta proeminente atividade *in vitro*, sendo responsável por quase metade da captação deste neurotransmissor na retina. Portanto, é fundamental compreender quais moléculas podem afetar a atividade deste transporte sódio-independente e desregular o funcionamento tecidual normal.

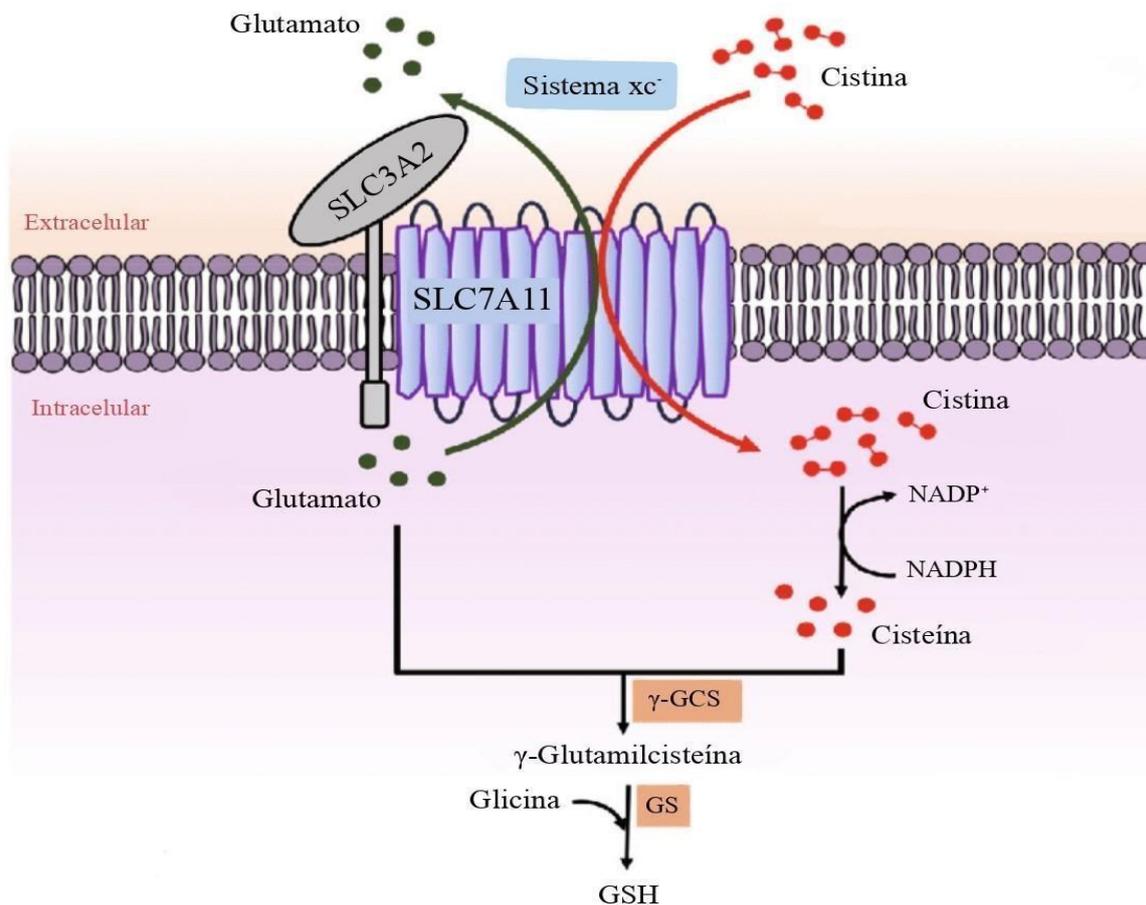


Figura 3: Estrutura e funcionamento do transportador x_{CG}^- . O transportador x_{CG}^- é um heterodímero composto pelas subunidades SLC7A11 e SLC3A2, e funciona como um antiportador de cistina/glutamato, captando cistina e liberando glutamato de forma sódio-independente. Uma vez captada, a cistina é convertida em cisteína por meio de uma reação de redução que consome NADPH. Em seguida, a cisteína é utilizada para a síntese de GSH através de um processo de duas etapas: i) A cisteína forma γ -glutamilcisteína em conjugação com glutamato sob ação da γ -GCS; ii) A glicina é adicionada a γ -glutamilcisteína por ação da GS, resultando na produção de GSH. γ -GCS, γ -glutamilcisteína sintase; GS, glutathiona sintetase; NADPH, fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida. Fonte: Adaptado de Koppula, Zhuang & Gan, 2021.

Nesse contexto, o modelo *in vitro* de células retinianas se destaca como uma ferramenta essencial para a compreensão do transporte de glutamato independente de sódio, considerando a relevância deste sistema de transporte no cultivo celular (DAHER, VUČETIĆ & POUYSSÉGUR, 2020; KOPPULA, ZHUANG & GAN, 2021). O estudo *in vitro* da retina de diferentes espécies de aves é amplamente difundido na literatura devido à facilidade de seu isolamento sem contaminação por outros tecidos, ao amplo conhecimento sobre a neurogênese na retina de embriões de galinha (DOS SANTOS-RODRIGUES *et al.*, 2015) e às semelhanças morfológicas e fisiológicas com a retina humana (HAMBURGUER & HAMILTON, 1951).

Adicionalmente, estudos indicam que a retina abriga os principais sistemas de neurotransmissão do SNC, como os sistemas GABAérgico e glutamatérgico (DOS SANTOS RODRIGUES et al., 2015). A atividade do sistema glutamatérgico é observada em células ganglionares, bipolares, horizontais e fotorreceptores, com a liberação contínua de glutamato sob a influência de estímulos luminosos (BADEN, EULER & BERENS, 2020). Ademais, células da retina de embriões de galinha *in vitro* apresentam um sistema específico de captação de alta afinidade para adenosina, molécula que está diretamente relacionada ao desenvolvimento deste tecido e à fisiopatologia de doenças, como glaucoma e isquemia retiniana (VENTURA et al., 2018). Dessa forma, o objetivo deste estudo é investigar o potencial papel modulador da adenosina sobre o transporte de glutamato independente de sódio.

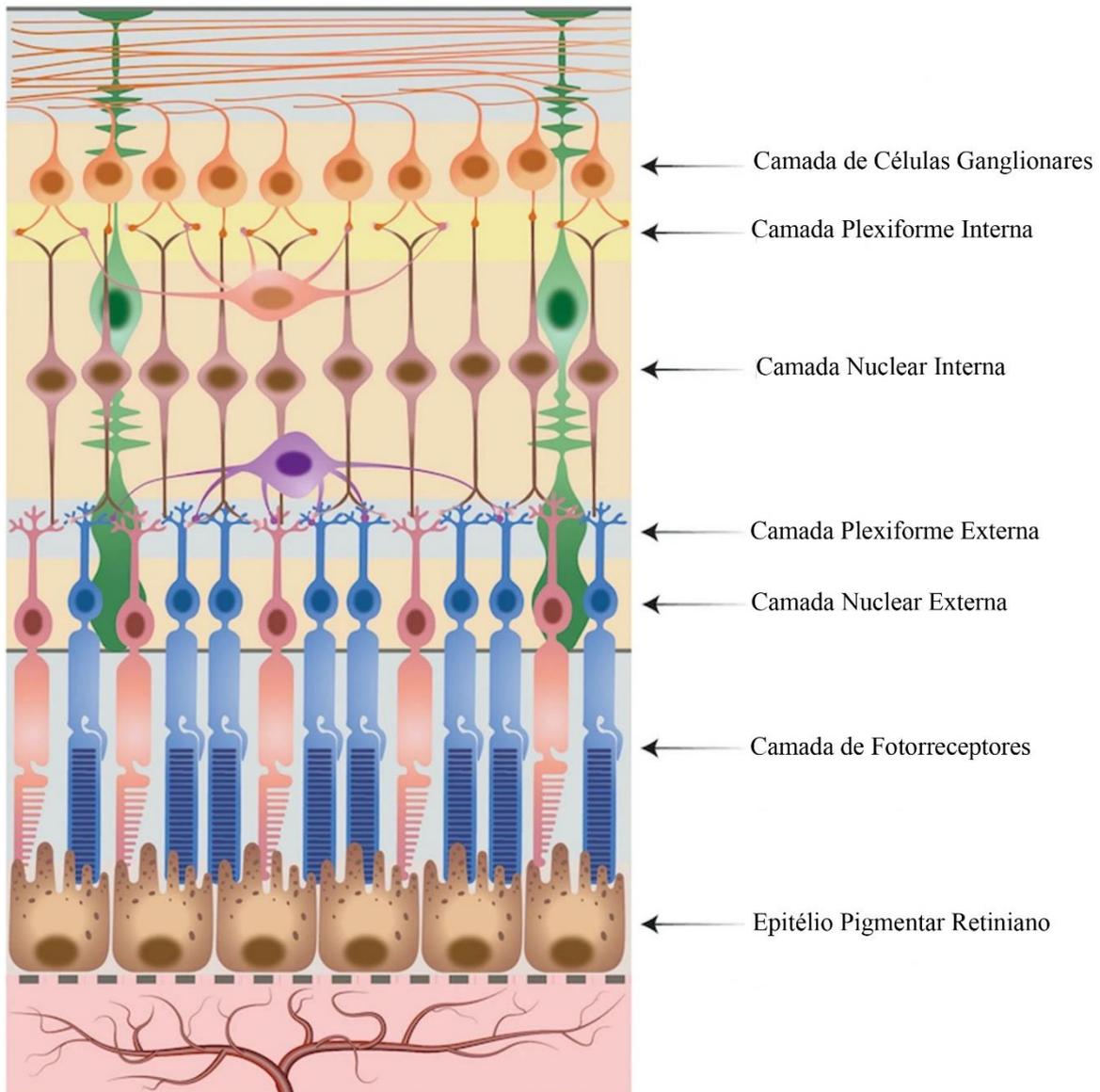


Figura 4: Representação esquemática da retina e suas camadas celulares. A retina é uma estrutura em camadas, consistindo em uma camada pigmentada, o Epitélio Pigmentar Retiniano (EPR), que está em contato com os segmentos externos dos bastonetes e dos cones. Os segmentos externos dos fotorreceptores, os corpos celulares, constituem a camada nuclear externa (CNE). Os axônios dos fotorreceptores fazem sinapse com as células neuronais (bipolares, amácrinas e horizontais) da camada nuclear interna (CNI) por meio da camada plexiforme externa (CPE). Os axônios das células CNI, por sua vez, fazem sinapse com a camada de células ganglionares (CCG) através da camada plexiforme interna (CPI). Os axônios das células ganglionares convergem para formar o nervo óptico. Fonte: Adaptado de Ferrara *et al.*, 2021.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o efeito da adenosina sobre o transporte de glutamato independente de sódio em cultura primária mista de células da retina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a expressão do transportador x_{CG}^- em cultura primária mista de células do tecido retiniano por imunofluorescência;

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de adenosina (20 μ M, 50 μ M e 100 μ M) sobre a atividade do transportador de glutamato independente de sódio em cultura primária mista de células da retina com sete dias de desenvolvimento *in vitro*;

- Identificar o receptor responsável por mediar os efeitos da adenosina sobre a atividade do transportador de glutamato independente de sódio utilizando bloqueador específico do receptor A2A de adenosina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Os reagentes para cultivo celular foram obtidos da ThermoFisher Scientific Inc. O anticorpo primário anti-xCT foi adquirido da Abcam (ab216876), assim como o anticorpo secundário anti-Alexa Fluor 488 *goat anti-rabbit* IgG (ab150077) e o marcador de núcleo celular 4,6-diamidina-2-fenilindol (DAPI; ab228549). Adenosina (CAS: 58-61-7), antagonista do receptor de adenosina A2A (5-amino-7-[2-feniletil]-2-[2-furil]-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina ou SCH58261); CAS: 160098-96-4) da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Ovos fertilizados da espécie *White leghorn* foram obtidos de um incubatório local e mantidos em atmosfera umidificada a 37-39°C.

3.2 CULTURA PRIMÁRIA MISTA DE CÉLULAS DA RETINA

Os embriões de galinha da linhagem *White leghorn* foram armazenados seguindo os protocolos estabelecidos por Hamburguer e Hamilton (1951). AS culturas primárias mistas de neurônios e células gliais da retina foram preparadas conforme descrito por Herculano *et al.* (2006), em conformidade com as diretrizes do Comitê de Ética Local (ANEXO I; CEPAE 9829240621).

Sob condições assépticas, 1-2 embriões com 7–8 dias de idade embrionária (E7–E8) foram removidos dos ovos e decapitados em placas de Petri contendo meio livre de cálcio e magnésio (CMF-Calcium Medium Free; em mM: NaCl 128, C₆H₁₂O₆ 12, KCl 4 e NaH₂PO₄.2H₂O 1; pH=7,2-7,4, ajustado com NaOH) mantido a 4°C. Em seguida, os globos oculares foram extraídos, e tanto o cristalino quanto o humor vítreo foram removidos para dissecação e isolamento da retina.

O tecido retiniano foi transferido para tubos de ensaio de 15mL contendo 1mL de solução de tripsina 0,05% (diluída em Solução Tampão Fosfato (PBS-Phosphate Buffer Saline); acrescido de (em mM): NaCl 137, NaH₂PO₄.2H₂O 10, KCl 2,7 e KH₂PO₄ 2; pH=7,2-7,4, ajustado com NaOH) e mantido durante 3-5 minutos em banho-maria a 37°C com agitação constante. Para inativação da tripsina, foi adicionado 1mL de Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; 10 g acrescido de: NaHCO₃ 3,7 g; C₆H₁₂O₆ 2,5 g; Penicilina 5 mL; Fungisona 1 mL; Gentamicina 100 µL) enriquecido com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS).

O tecido retiniano foi então submetido à dissociação mecânica por meio de sucessivas aspirações utilizando uma pipeta. As células obtidas foram semeadas em placas de cultura de células com 24 poços e mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% CO₂—95% de ar. O meio foi trocado a cada 2 dias ou de acordo com a necessidade, até alcançar confluência. Após 7 dias *in vitro* (DIV7), as culturas apresentaram uma monocamada confluyente composta por neurônios e células gliais.

3.3 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Após as células atingirem a confluência, o meio foi removido, e as células foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos por lavagem). Em seguida, foram fixadas com metanol 100% durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram novamente lavadas com PBS (3 lavagens de 10 minutos cada) e incubadas com solução bloqueio composta por PBS contendo glicina 0,3M e albumina de soro bovino 1% (BSA) por 3 horas à temperatura ambiente. Após incubação com solução bloqueio, esta solução foi retirada, e as células foram incubadas o anticorpo primário anti-xCT (1:200; diluído em PBS contendo BSA 1%) para detecção da subunidade xCT do transportador xCG⁻. A incubação com anticorpo primário foi realizada *overnight* (12-16 horas) a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por 2 horas com anticorpo secundário anti-Alexa Fluor 488 (1:1000; diluído em PBS contendo BSA 1%) à temperatura ambiente e sob proteção da luz. Após esta etapa, os núcleos celulares foram corados com DAPI (1:10000; diluído em PBS) durante 1 minuto, também à temperatura ambiente e sob proteção da luz. Por fim, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Nikon - ECLIPSE Ni) e as imagens foram processadas e analisadas nos softwares ImageJ e Photoshop CS6.

3.4 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

Para avaliar o efeito da adenosina no transporte de glutamato independente de sódio, as células foram incubadas com diferentes concentrações de adenosina (20µM, 50µM e 100µM; diluídas em DMEM) (FERREIRA, J.M. & PAES-DE-CARVALO, R., 2001) por 4 horas. Após este período, foram realizados ensaios de liberação e captação de glutamato. Para identificar o receptor de adenosina envolvido nos possíveis efeitos moduladores, as células foram pré-incubadas por 20 minutos com o antagonista do receptor A2A, SCH58261 (50nM; diluído em

Dimetilsulfóxido 100% (DMSO) e DMEM) antes da incubação com adenosina. Após as etapas de incubação, as células foram lavadas duas vezes com solução LiCl-Hank's Balanced Salt Solution Modificado (LiCl-HBSS; em mM: LiCl 128, HEPES 20, C₆H₁₂O₆ 12, KCl 4, CaCl₂ 2 e MgCl₂ 1; pH=7,2-7,4 ajustado com KOH). Todas as incubações foram realizadas a 37°C em estufa com 5% CO₂—95% de ar.

3.5 ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para o ensaio de liberação de glutamato, as células foram lavadas duas vezes com 500µL de LiCl-HBSS e, em seguida, incubadas com 500µL desta mesma solução por 20 minutos a 37°C, em estufa com 5% CO₂. Após a incubação, o sobrenadante foi coletado e armazenado para posterior análise por CLAE. Em seguida, para o ensaio de captação de glutamato, as culturas da retina foram lavadas duas vezes com 500µL de LiCl-HBSS e incubadas com 500µL de solução contendo 50µM de Glutamato (diluído em LiCl-HBSS) por 20 minutos a 37°C, também em estufa com 5% CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado e armazenado para posterior análise (Figura 5). Todas as amostras coletadas foram mantidas a -80°C até sua preparação e quantificação por CLAE.

Para dosagem de glutamato por CLAE, as amostras foram gradualmente descongeladas e inicialmente preparadas pela adição de 20µL de Ácido Tricloroacético 1% (TCA) a cada 500µL de amostra, seguida por centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, 300µL do sobrenadante foram coletados, e 20µL de Homoserina (HMS; 10µg/mL; diluída em água ultrapura) foram adicionados como padrão interno da técnica.

A derivatização das amostras foi realizada adicionando-se 10µL de Ortoftalaldeído (OPA; 0,013g diluído juntamente com 0,016g de N-Acetilcisteína em 300µL de metanol absoluto) e 40µL de tampão borato (0,1M; diluído em água ultrapura; pH=9,5 ajustado com NaOH) a cada 60µL de amostra ou solução padrão de L-Glutamato. Após este processo, as amostras foram injetadas em um sistema de CLAE com gradiente, utilizando a fase móvel A (composta por 95% de tampão acetato de sódio 50µM, pH=5,67 ajustado com ácido acético; 5% de metanol absoluto e 12 mL de propanol por litro de fase A) e fase B (metanol 70%). A eluição foi realizada com fluxo de 1,2 mL/min, em um tempo total de 25 minutos, utilizando detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação 340 nm e emissão de 460 nm. Por fim, a quantificação de glutamato liberado e captadas foi realizada conforme padronizado

por Moraes *et al.* (2012). A captação de glutamato foi calculada por meio da equação: $\Delta\text{Glu} = [\text{Glu}]_{t_0} - [\text{Glu}]_{t_{\text{en}}}$, onde $[\text{Glu}]_{t_0}$ representa a concentração inicial de glutamato e $[\text{Glu}]_{t_{\text{en}}}$ representa esta concentração ao final do experimento.



Figura 5: Esquema representativo dos ensaios de liberação e captação de glutamato. As células foram inicialmente incubadas com solução LiCl-HBSS para avaliação da liberação de glutamato, seguida de uma incubação com 50µM de glutamato para o ensaio de captação de glutamato. As amostras coletadas foram preparadas e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, conforme descrito por MORAES *et al.* (2012). CLAE, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; Glu, Glutamato; Hank Li⁺, Solução LiCl-HBSS. Fonte: Autoral (Ilustração produzida em BioRender.com).

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau CLAE. Para correção de valores, foi realizada a dosagem de proteína, no mínimo, 24 horas após a obtenção da amostra segundo método descrito por Bradford (1976).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism 9.3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste t não-pareado foi utilizado para comparação de dois grupos e a comparação entre múltiplos grupos foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com *post-hoc* Tukey. Os dados são expressos como porcentagem do controle \pm desvio padrão com o nível de significância definido em $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 CÉLULAS DA RETINA *IN VITRO* EXPRESSAM O TRANSPORTADOR x_{CG}^-

Atualmente, o sistema x_{CG}^- é o único transportador de glutamato conhecido por operar na ausência do íon sódio, ao contrário dos EAATs, que permanecem inativos na ausência deste íon. Dessa forma, supõe-se que o transporte de glutamato em nosso modelo experimental seja mediado pelo transportador x_{CG}^- . Assim, para investigar sua presença, realizamos a detecção da subunidade xCT por meio do ensaio de imunofluorescência.

Nossos resultados demonstram a especificidade da reação, evidenciada pelo controle negativo do anticorpo primário (FIGURA 6A), e confirmam a viabilidade celular por meio da marcação positiva para o marcador de núcleos celulares DAPI (FIGURA 6B; azul). A Figura 6C revela a proeminente expressão do xCT (verde) em células com características morfológicas distintas.

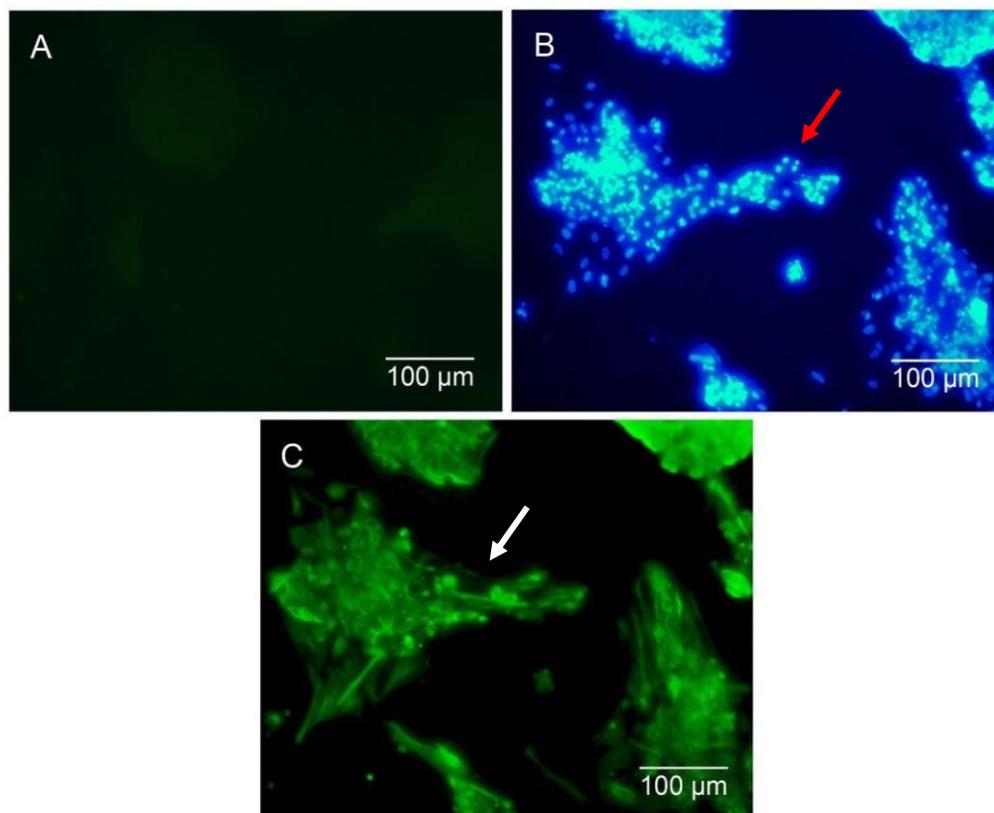


Figura 6: Imunomarcção para xCT em células da retina. A) Controle negativo; B) Marcação do núcleo celular com DAPI (Indicado pelas setas vermelhas); C) Células marcadas positivamente para xCT (Indicado pelas setas brancas). Aumento de 40x.

4.2 ADENOSINA AUMENTA A LIBERAÇÃO E DIMINUI A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO INDEPENDENTE DE SÓDIO EM CÉLULAS DA RETINA

Considerando a importância do transporte de glutamato sódio-independente no tecido retiniano e a relevância do efeito modulador da adenosina sobre a neurotransmissão glutamatérgica, além da detecção de um transportador sódio-independente em nosso modelo experimental, buscamos avaliar o possível impacto da adenosina sobre o transporte de glutamato independente de sódio.

O gráfico a seguir mostra os resultados da liberação de glutamato independente de sódio (em porcentagem do controle) após o tratamento com diferentes concentrações de adenosina. Nossos resultados indicaram que as concentrações de ADO 20 μ M e 100 μ M não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Por outro lado, a incubação com adenosina 50 μ M resultou em um aumento de aproximadamente 800% na liberação de glutamato sódio-independente em comparação ao grupo controle (FIGURA 7). Estes resultados sugerem que a adenosina pode exercer um efeito modulador significativo sobre a liberação de glutamato sódio-independente, com a concentração de 50 μ M promovendo o maior aumento.

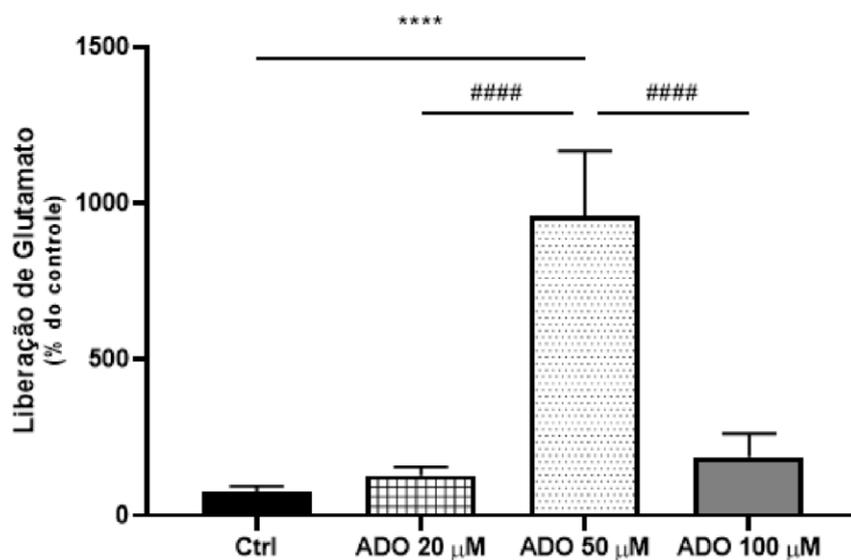


Figura 7: Liberação de glutamato independente de sódio sob efeito da adenosina. Avaliação da liberação de glutamato independente de sódio sob efeito de diferentes concentrações da adenosina em cultura de células retinianas de embriões de galinha. Valores expressos como porcentagem do controle (Ctrl 100 \pm 54,82, n=5; ADO 20 μ M 118,92 \pm 31,92, n=5; ADO 50 μ M 1106,18 \pm 375,08, n=5; ADO 100 μ M 206,74 \pm 81,02, n=6; ****p<0,0001 vs. Ctrl; #####p<0,0001 vs. ADO 50 μ M). ADO, adenosina; Ctrl, controle.

Em virtude da magnitude do efeito da adenosina sobre a liberação de glutamato por um sistema independente de sódio, avaliamos também a captação deste neurotransmissor. O gráfico a seguir mostra os resultados da captação de glutamato independente de sódio (em porcentagem do controle) após o tratamento com diferentes concentrações de adenosina.

Nossos resultados indicaram que a incubação com adenosina nas concentrações de 20 μ M, 50 μ M e 100 μ M promoveu um bloqueio completo na captação de glutamato em comparação ao grupo controle, com diferença significativa entre ADO 50 μ M e 100 μ M (FIGURA 8). Assim, estes dados ressaltam um proeminente efeito modulador da adenosina sobre a captação de glutamato independente de sódio.

De modo geral, os resultados da liberação e da captação de glutamato sódio-independente indicam uma ação direta da adenosina sobre o transporte sódio-independente deste neurotransmissor. Considerando que a concentração de ADO 50 μ M apresentou os efeitos mais proeminentes em ambas as avaliações, esta concentração foi então selecionada para os testes subsequentes.

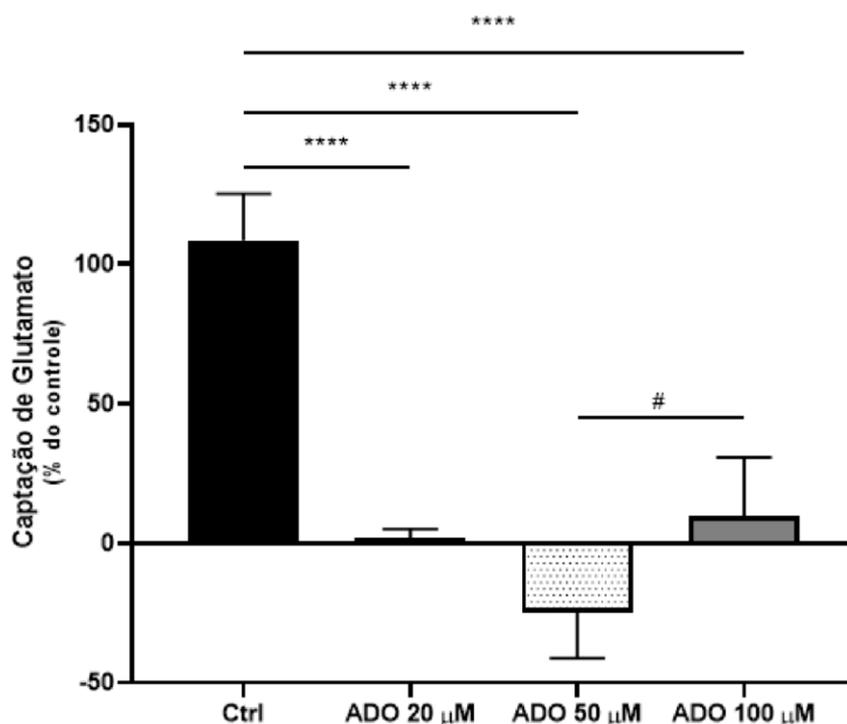


Figura 8: Captação de glutamato independente de sódio sob efeito da adenosina. Avaliação da captação de glutamato independente de sódio sob efeito de diferentes concentrações da adenosina em cultura de células retinianas de embriões de galinha. Valores expressos como porcentagem do controle (Ctrl 100 \pm 16,86 n=4; ADO 20 μ M 1,968 \pm 3,191, n=4; ADO 50 μ M -24,79 \pm 16,34, n=4; ADO 100 μ M 9,903 \pm 20,94, n=5; ****p<0,0001 vs. Ctrl; #####p<0,0001 vs. ADO 50 μ M). ADO, adenosina; Ctrl, controle.

4.3 BLOQUEIO DO RECEPTOR A2A MEDEIA OS EFEITOS INDUZIDOS PELA ADENOSINA SOBRE O TRANSPORTE DE GLUTAMATO SÓDIO-INDEPENDENTE *IN VITRO*

Após estabelecer o efeito significativo da adenosina sobre o transporte de glutamato sódio-independente, nosso objetivo foi caracterizar farmacologicamente este fenômeno, identificando o receptor responsável pelos efeitos observados. Estudos indicam que o receptor A2A desempenha um papel crucial na modulação da neurotransmissão glutamatérgica, promovendo efeitos semelhantes aos encontrados em nossos resultados. Assim, buscamos investigar a contribuição do receptor A2A nos efeitos observados em nosso estudo.

O gráfico a seguir mostra os resultados da liberação de glutamato independente de sódio (em porcentagem do controle) após o bloqueio do receptor A2A de adenosina. O bloqueador SCH58261, específico para o receptor A2A de adenosina, não apresentou diferença significativas em relação ao grupo controle, sugerindo que os efeitos observados anteriormente não são de natureza fisiológica. No entanto, ao realizar a pré-incubação das células com o bloqueador, seguida da incubação com ADO 50 μ M, foi observada uma inibição do fenômeno promovido pela adenosina na liberação de glutamato independente de sódio, indicando que a ativação do receptor A2A medeia os efeitos observados com por ADO 50 μ M.

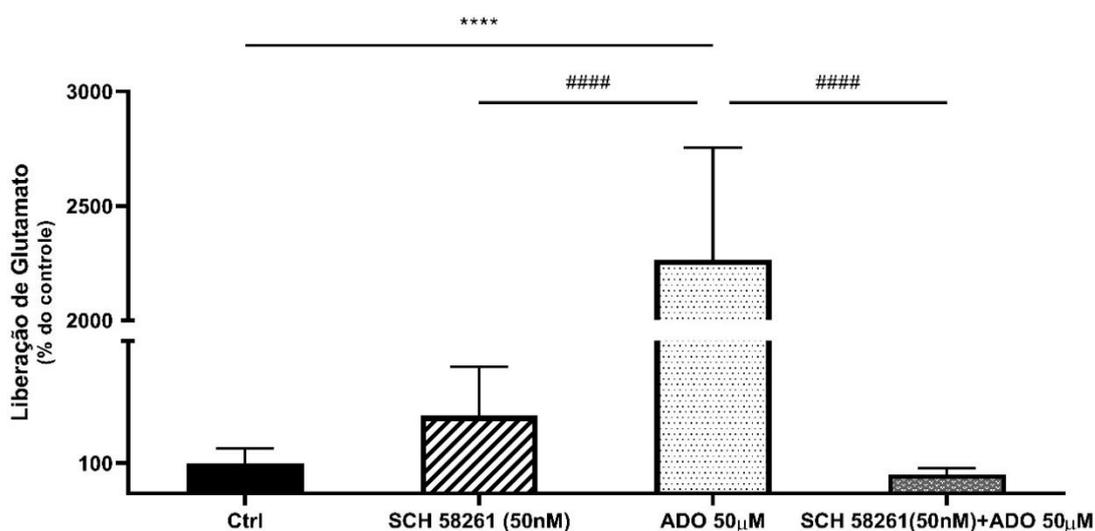


Figura 9: Liberação de glutamato independente de sódio com bloqueio do receptor A2A de adenosina. Liberação de glutamato independente de sódio com bloqueio do receptor A2A de adenosina por SCH58261 em cultura de células retinianas de embriões de galinha. Valores expressos como porcentagem do controle (Ctrl 100 \pm 47,51, n=4; SCH 58261 (50nM) 255,35 \pm 160,71, n=4; ADO 50 μ M 2614,54 \pm 886,52, n=5; SCH 58261 (50nM) +ADO 50 μ M 61,47 \pm 21,29, n=4; ****p<0,0001 vs. Ctrl; ####p<0,0001 vs. ADO 50 μ M). ADO, adenosina; Ctrl, controle.

O gráfico a seguir mostra os resultados da captação de glutamato independente de sódio (em porcentagem do controle) após o bloqueio do receptor A2A de adenosina. De modo semelhante ao que foi observado na liberação de glutamato independente de sódio, a utilização do inibidor do receptor A2A não bloqueou a captação basal de glutamato, confirmando que os efeitos promovidos pela adenosina sobre o transporte sódio-independente deste neurotransmissor não são de natureza fisiológica. Novamente, a pré-incubação com o bloqueador, seguida pela incubação com ADO 50 μ M, inibiu os efeitos mediados pela adenosina sobre a captação de glutamato independente de sódio, conforme ilustrado na Figura 10. Assim, estes resultados corroboram a hipótese de que o efeito modulatório observado é mediado pela ativação do receptor A2A de adenosina.

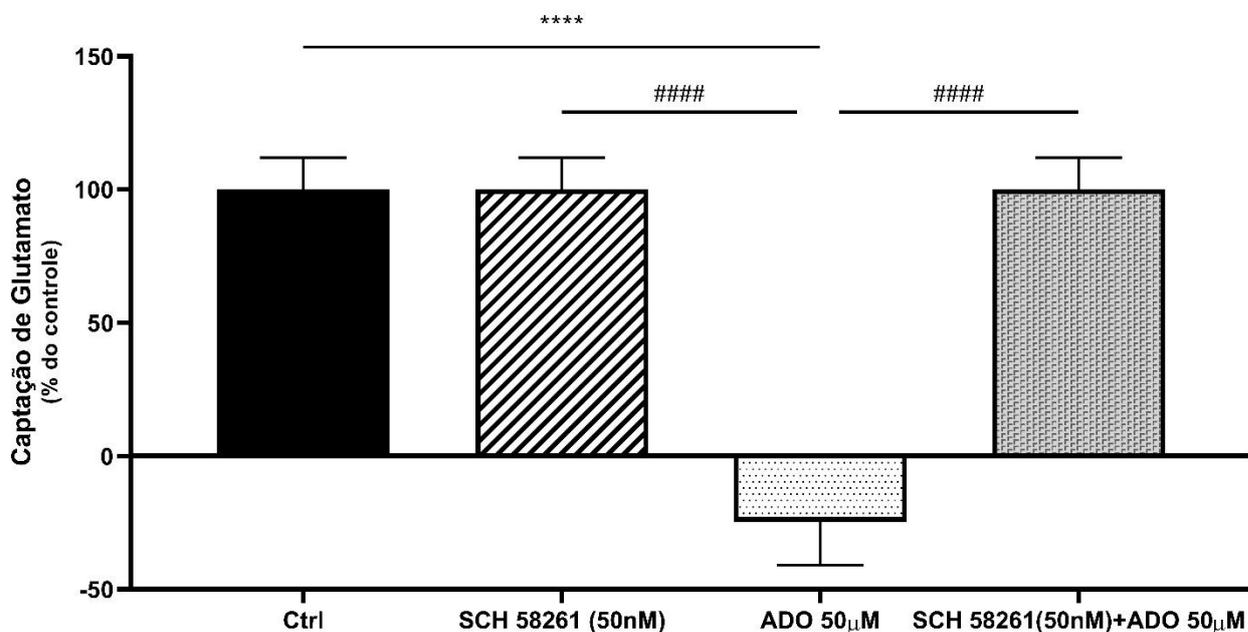


Figura 10: Captação de glutamato independente de sódio com bloqueio do receptor A2A de adenosina. Captação de glutamato independente de sódio com bloqueio do receptor A2A de adenosina por SCH58261 em cultura de células retinianas de embriões de galinha. Valores expressos como porcentagem do controle (Ctrl 100 \pm 11,86, n=4; SCH58261 (50nM) 100 \pm 11,86, n=4; ADO 50 μ M -30,83 \pm 19,68, n=5; SCH58261 (50nM) + ADO 50 μ M 100 \pm 11,86, n=4; ****p<0,0001 vs. Ctrl; #####p<0,0001 vs. ADO 50 μ M). ADO, adenosina; Ctrl, controle.

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicam, pela primeira vez, que a adenosina modula a atividade do sistema x_{CG}^- por meio da ativação do receptor A2A em células retinianas *in vitro*. Considerando que este transportador desempenha um papel crucial na síntese de GSH, estes achados abrem novas perspectivas para o combate ao estresse oxidativo, fenômeno central em diversas patologias, como degeneração macular relacionada à idade e retinopatia diabética (Revisado por LEWERENZ *et al.*, 2013). Dessa forma, os resultados obtidos ressaltam a importância de nossas descobertas e o potencial de futuras investigações.

Considerando que a expressão do transportador x_{CG}^- em condições fisiológicas permanece sendo alvo de intensa investigação (JYOTSANA, TA & DELGIORNO, 2022; MARTIS *et al.*, 2020), avaliamos, neste estudo, a expressão do xCT e sua localização celular. Nossos resultados indicaram a expressão do xCT em estruturas morfológicas distintas (FIGURA 10), sugerindo que diferentes tipos celulares expressam o sistema x_{CG}^- . Estudos demonstram que este transportador pode estar presente tanto em neurônios quanto em células gliais no cérebro e outras regiões do SNC de camundongos, ratos e humanos (BURDO, DARGUSH, & SCHUBERT, 2006; LA BELLA *et al.*, 2007). Por outro lado, pesquisas mais recentes apontam que o trocador cistina-glutamato é mais proeminente nas células gliais (Revisado por DAHLMANN *et al.*, 2023; LEE & ROH, 2021). Mesci *et al.* (2015) relatam que neurônios motores da medula espinhal não expressam a subunidade xCT, conclusão corroborada por Ottestad-Hansen *et al.* (2018) que não observaram marcação positiva para a subunidade xCT em neurônios do cérebro de camundongos. Assim, com base nas evidências apresentadas e nos resultados obtidos, sugerimos que o trocador cistina-glutamato é expresso predominantemente em células gliais da retina embrionária *in vitro*, quando comparado à expressão em neurônios. Contudo, experimentos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese e elucidar o papel deste sistema de transporte na fisiologia retiniana.

Estudos indicam que células do Epitélio Pigmentar Retiniano regulam positivamente a produção de GSH por meio do influxo de cistina pelo sistema x_{CG}^- (GAO *et al.*, 2020), e que a inibição deste transportador na retina diminui os níveis deste antioxidante, levando a disfunção tecidual *in vivo* (KATO *et al.*, 1993). Além disso, Dun *et al.* (2006) demonstraram que o aumento na expressão do mRNA para a subunidade xCT promove a elevação dos níveis de GSH em Células Ganglionares da Retina em quadros de desbalanço redox, contribuindo para manutenção da homeostase e combate ao estresse oxidativo. Este achados ressaltam o papel

crucial do transportador de glutamato sódio-independente na defesa antioxidante do tecido retiniano.

Por outro lado, o sistema x_{CG}^- está diretamente envolvido em diversos processos patológicos, sendo alvo frequente de estudos que buscam novas alternativas terapêuticas. Pesquisas indicam que este transportador desempenha um papel crucial no metabolismo e na proliferação de células tumorais, além de contribuir para a evasão imune e facilitar a metástase (DAHER, VUČETIĆ & POUYSSÉGUR, 2020; KOPPULA, ZHUANG & GAN, 2021; LEE & ROH, 2021). Além disso, o aumento da expressão do transportador x_{CG}^- e a consequente elevação na liberação de glutamato estão associados a quadros convulsivos e epiléticos, com camundongos *knockout* para a subunidade xCT apresentando limiar elevado para convulsões induzidas por fármacos (Revisado por DAHLMANN *et al.*, 2023). Nesse contexto, dada a relevância do transporte de glutamato independente de sódio tanto na fisiologia normal quanto em diversas patologias, torna-se essencial a investigação de mecanismos capazes de modular sua atividade.

Na retina, o bloqueio do receptor A1 resulta em um aumento na liberação de GABA induzida por D-aspartato (FERREIRA *et al.*, 2014), enquanto a ativação do receptor A3 protege as células retinianas contra a morte celular por excitotoxicidade em modelos *in vitro* (GALVÃO *et al.*, 2015). Ademais, Madeira *et al.* (2015) demonstraram que o bloqueio do receptor A2A inibe a morte de células ganglionares em um modelo *ex vivo* de glaucoma, além de modular a neuroinflamação, a reatividade microglial e a perda de células ganglionares no tecido retiniano em modelos de glaucoma *in vivo* (MADEIRA *et al.*, 2016). Estes achados ressaltam o papel crucial da adenosina na manutenção da homeostase retiniana e na proteção do tecido retiniano. Assim, avaliamos a possível influência da adenosina, um dos principais moduladores do SNC, no transporte sódio-independente de glutamato.

Os resultados obtidos indicam que somente a concentração de 50 μ M de adenosina induziu um efeito significativo sobre a liberação de glutamato sódio-independente, em contraste com as concentrações de 20 μ M e 100 μ M, que não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle. Por outro lado, nos dados de captação as concentrações de 20 μ M, 50 μ M e 100 μ M de adenosina apresentaram diferenças em comparação ao grupo controle. Ademais, os valores abaixo do “Eixo x” nas Figuras 8 e 10 representam a concentração extracelular de glutamato após incubação com Glutamato 50 μ M, indicando que houve um aumento na quantidade de glutamato no meio extracelular no final do experimento, em comparação ao início. Este padrão sugere que a liberação de glutamato sódio-independente predominou sobre

a captação devido à ação da adenosina. Nesse sentido, os resultados deste estudo indicam que a incubação com adenosina nas concentrações de 20 μ M, 50 μ M e 100 μ M promoveu alterações significativas nos níveis de captação de glutamato independente de sódio em comparação ao grupo controle.

No presente estudo, foram utilizadas concentrações elevadas de adenosina (20 μ M, 50 μ M e 100 μ M; OHANA *et al.*, 2001), uma vez que estudos apontam que diferentes concentrações de adenosina podem induzir efeitos contrastantes, decorrentes da ativação diferencial de seus receptores (Revisado por BOREA *et al.*, 2018). Pesquisas demonstram que baixas concentrações de adenosina podem promover a metástase de células cancerígenas, enquanto concentrações mais elevadas inibem a proliferação celular (TARNOWSKI *et al.*, 2017). Além disso, estudos relatam que agonistas do receptor A3, em altas concentrações, induzem apoptose, enquanto concentrações mais baixas não resultam em morte celular (OHANA *et al.*, 2001). Esses achados ressaltam a complexidade dos efeitos da adenosina e reforçam a necessidade de um estudo mais aprofundado para entender os mecanismos subjacentes a essas respostas, particularmente em relação ao transporte de glutamato sódio-independente. Assim, buscamos identificar o receptor responsável pelos efeitos no transporte de glutamato independente de sódio em nossos resultados.

Pesquisas indicam que a adenosina exerce seus efeitos moduladores por meio da ativação dos receptores A1 e A2A, principalmente (COSTA *et al.*, 2020; FREDHOLM *et al.*, 2005; NAVIA *et al.*, 2020). Paes-de-Carvalho (2002) descreve que a ativação do receptor A1 de adenosina promove uma diminuição dose-dependente no acúmulo de AMPc mediado pela dopamina em células retinianas *in vitro*. Ademais, da Silva *et al.* (2017) relatam que a ativação do receptor A2A previne o desenvolvimento de disfunções cardíacas de forma dose-dependente em ratos hipertensos.

Segundo Li *et al.* (2011), a ativação do receptor A1 inibe a liberação espontânea de GABA e glutamato em neurônios corticais, além de inibir a liberação evocada de glutamato em sinaptossomos (MARCHI *et al.*, 2002). Ademais, este receptor promove a depressão sináptica da neurotransmissão glutamatérgica no corpo estriado dorsal (FRITZ, YIN & ATWOOD, 2021) e inibe a exocitose do glutamato mediada pela PKC em sinaptossomos cérebro-corticais (BARRIE & NICHOLLS, 1993). Nesse sentido, os efeitos inibitórios da ativação do receptor A1 descritos na literatura não coincidem com o efeito estimulatório observado em nosso estudo (FIGURA 7). Assim, supomos que a ativação deste receptor não esteja diretamente envolvida

com os efeitos observados em nosso estudo, sendo necessários mais experimentos para corroborar esta hipótese.

Por outro lado, conforme destacado por Matos *et al.* (2012), a adenosina exerce um controle rápido sobre a atividade dos transportadores de glutamato e regula negativamente sua expressão a longo prazo, por meio da ativação do receptor A2A. Além disso, a ativação aguda deste receptor promove uma liberação de glutamato dependente de Ca^{+2} em astrócitos do hipocampo *in vitro* (Matos *et al.*, 2012). Ademais, foi observado que o receptor A2A medeia o efeito inibitório da adenosina sobre a captação de glutamato no hipocampo e regula tanto a liberação quanto a captação desse neurotransmissor no corpo estriado (PINTOR *et al.*, 2004). Nesse sentido, sugerimos que o receptor A2A modula a atividade do sistema sódio-independente em cultura de células da retina.

Nossos resultados mostram que o bloqueio do receptor A2A inibiu o efeito da adenosina sobre a liberação e a captação de glutamato sódio-independente, sem alterar os níveis basais do transporte deste neurotransmissor (FIGURAS 9-10). A ativação deste receptor aumenta indiretamente a atividade da PKA, sendo que diversos estudos associam a atividade desta cinase à modulação de mecanismos de sinalização celular (ZHANG & PANDEY, 2003; UEMATSU *et al.*, 2016). Baker *et al.* (2002) demonstraram que receptores metabotrópicos de glutamato do grupo II modulam a atividade do transportador cistina-glutamato por meio de um mecanismo dependente de PKA em fatias do *striatum*, e que o xCT humano contém dois sítios de fosforilação para esta cinase. Posteriormente, Resch *et al.* (2014), mostraram que o Polipeptídeo Ativador de Adenilato Ciclase Hipofisário Pleiotrópico (PACAP) aumenta a captação de cistina via sistema x_{CG}^{-} através de uma via dependente de PKA. Assim, com base nestas evidências, sugerimos que os efeitos promovidos pela ativação do receptor A2A ocorrem por meio de uma via de sinalização mediada pela PKA. No entanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese, uma vez que não avaliamos diretamente a atividade desta cinase em nosso estudo.

Embora mais investigações sejam necessárias para caracterizar integralmente o mecanismo responsável pelos resultados obtidos neste estudo, este trabalho apresenta uma significativa contribuição para o estudo da neuroquímica da retina, onde é demonstrado pela primeira vez um efeito modulador da adenosina sobre o transporte de glutamato independente de sódio.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que a adenosina pode modular o transporte de glutamato independente de sódio pela ativação do receptor A2AR. Esse processo parece estar associado à expressão do transportador de glutamato x_{CG}^- nas células da retina, sugerindo um papel crucial da adenosina na regulação da sinalização glutamatérgica retiniana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIN, R.M. et al. Adenosine: Direct and Indirect Actions on Gastric Acid Secretion. **Front Physiol.** 22 set. 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00737

BAI, W. et al. Adenosine A2A receptor inhibition restores the normal transport of endothelial glutamate transporters in the brain. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 498, n. 4, p. 795-802, 16 mar. 2018.

BADEN, T., EULER, T., BERENS, P. Understanding the retinal basis of vision across species. **Nat Rev Neurosci.** v. 21, n. 1, p. 5-20, jan 2020. doi: 10.1038/s41583-019-0242-1.

BAKER, D.A. et al. The Origin and Neuronal Function of *In Vivo* Nonsynaptic Glutamate. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 20, p. 9134-9141, 15 out. 2002.

BARRIE, A.P. & NICHOLLS, D.G. Adenosine A1 receptor inhibition of glutamate exocytosis and protein kinase C-mediated decoupling. **J Neurochem.** Mar 1993. doi: 10.1111/j.14714159.1993.tb03257.x

BOISON, D. et al. Adenosine hypothesis of schizophrenia--opportunities for pharmacotherapy. **Neuropharmacology.** v. 62, n. 3, p. 1527-1543, mar 2012. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.048

BOREA, P.A. et al. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1591-1625, 1 jul. 2018.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 7 maio 1976.

BRAGA, D.V. et al. (2019). Adenosine A1 receptors modulate the Na⁺-Hypertonicity induced glutamate release in hypothalamic glial cells. *Neurochemistry International*, 126(), 64–68. doi:10.1016/j.neuint.2019.02.013

BRAND A., et al Adenosine A(1) and A(3) receptors mediate inhibition of synaptic transmission in rat cortical neurons. **Neuropharmacology**. 2001;40(1):85-95. doi: 10.1016/s0028-3908(00)00117-9.

BURDO, J., DARGUSCH, R., SCHUBERT, D. Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc⁻ in the brain, kidney, and duodenum. **J Histochem Cytochem**. v. 54, n. 5, p.549-557, maio 2006. doi: 10.1369/jhc.5A6840.2006

BURKE, T.M. et al. Effects of caffeine on the human circadian clock in vivo and in vitro. **Sci Transl Med**. 16 set. 2015; doi: 10.1126/scitranslmed.aac5125

CHANG, C.P. et al. Emerging roles of dysregulated adenosine homeostasis in brain disorders with a specific focus on neurodegenerative diseases. **J Biomed Sci**. 11 out 2021. doi: 10.1186/s12929-021-00766-y

CHINTALA, S. et al. Slc7a11 gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 102, n. 31, p.10964-10969, 2 ago 2005;. doi: 10.1073/pnas.0502856102.

COPPI, E., CHERCHI, F., GIBB, A.J. Adenosine A2A receptor blockade attenuates excitotoxicity in rat striatal medium spiny neurons during an ischemic-like insult. **Neural Regen Res**. v. 19, n. 2, p.255-257, fev 2024; doi: 10.4103/1673-5374.375309

COSTA, M.A. et al. Adenosine A1 and A2A receptors modulate the nitrergic system in cell culture from dorsomedial medulla oblongata. **Auton Neurosci**. dez 2020. doi: 10.1016/j.autneu.2020.102737

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem Int.** v. 38, n. 2, p. 107-125, fev 2001. doi: 10.1016/s0197-0186(00)00034-6

DAHER, B., VUČETIĆ, M., POUYSSÉGUR, J. Cysteine Depletion, a Key Action to Challenge Cancer Cells to Ferroptotic Cell Death. **Front Oncol.** 7 maio 2020. doi: 10.3389/fonc.2020.00723

DAHLMANS, M. et al. Glial Glutamate Transporter-Mediated Plasticity: System xc/xCT/SLC7A11 and EAAT1/2 in Brain Diseases. **Front Biosci (Landmark Ed).** 20 mar 2023. doi: 10.31083/j.fbl2803057

DA SILVA, J.S. et al. Adenosine A2A receptor agonist prevents cardiac remodeling and dysfunction in spontaneously hypertensive male rats after myocardial infarction. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 553-562, 6 mar. 2017.

DE BUNDEL et al. Loss of system x(c)- does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. **J Neurosci.** 13 abril 2011. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5465-10.2011

DOS SANTOS-RODRIGUES et al. Chapter Fifteen - Adenosine Transporters and Receptors: Key Elements for Retinal Function and Neuroprotection. **Academic Press**, v. 98, p. 487-523, 2015, ISSN 0083-6729, ISBN 9780128030080, <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2014.12.014>

DUN, Y. et al. Expression of the cystine-glutamate exchanger (xc-) in retinal ganglion cells and regulation by nitric oxide and oxidative stress. **Cell Tissue Res.** v. 324, n. 2, p. 189-202, maio 2006. doi: 10.1007/s00441-005-0116-x

EUDY, B.J., DA SILVA, R.P. Systematic deletion of adenosine receptors reveals novel roles in inflammation and pyroptosis in THP-1 macrophages. **Mol Immunol.** abril 2021. doi: 10.1016/j.molimm.2021.01.018

FERREIRA, D.D. et al. Caffeine potentiates the release of GABA mediated by NMDA receptor activation: Involvement of A1 adenosine receptors. **Neuroscience**. v.281, p. 208-215, 5 dez 2014. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.060

FERREIRA, J.M. & PAES-DE-CARVALO, R. (2001). Long-term activation of adenosine A2a receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons, *900(2)*, 169–176. doi:10.1016/s0006-8993(01)02279-x

FREDHOLM, B.B et al. Adenosine and brain function. **Int Rev Neurobiol**. 2005;63:191-270. doi: 10.1016/S0074-7742(05)63007-3.

FOURNIER, M. et al. Implication of the glutamate-cystine antiporter xCT in schizophrenia cases linked to impaired GSH synthesis. **NPJ Schizophr**. 18 set 2017. doi: 10.1038/s41537017-0035-3

FRANCO, R. et al. Adenosine A2A Receptor Antagonists Affects NMDA Glutamate Receptor Function. Potential to Address Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. **Cells**. 26 abril 2020. doi: 10.3390/cells9051075

FRITZ, B.M., YIN, F. & ATWOOD, B.K. Input-selective adenosine A1 receptor-mediated synaptic depression of excitatory transmission in dorsal striatum. **Sci Rep**. 18 mar 2021. doi: 10.1038/s41598-021-85513-x.

GALVÃO, J., et al. Adenosine A3 receptor activation is neuroprotective against retinal neurodegeneration. **Exp Eye Res**. nov 2015. doi: 10.1016/j.exer.2015.08.009

GAO, Z.W. et al. The roles of adenosine deaminase in autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**. jan 2021 Jan. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102709

GARCIA-GIL, M. et al. Metabolic Aspects of Adenosine Functions in the Brain. **Front Pharmacol**. 14 maio 2021. doi: 10.3389/fphar.2021.672182

GEBICKE-HAERTER, P.J. et al. Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem Int.* 1996 Jul;29(1):37-42. PMID: 8808787.

GU, J.G., et al. Involvement of bidirectional adenosine transporters in the release of L-[3H]adenosine from rat brain synaptosomal preparations. *J Neurochem.* 1995 Maio ;64(5):2105-10. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.64052105.x.

HADDAD, M. et al. Adenosine Receptors as Potential Therapeutic Analgesic Targets. *Int J Mol Sci.* v. 24, n. 17, 24 ago 2023. doi: 10.3390/ijms241713160

HALLAJ, S. et al. Adenosine: The common target between cancer immunotherapy and glaucoma in the eye. *Life Sci.* 1 out 2021. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119796

HAMBURGER, V & HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo (1951). *Developmental Dynamics*, v. 195, n. 4, p. 231-72, dez. 1992.

HASKÓ, G. et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* v. 7, n. 9, p. 759-770, set 2008. doi: 10.1038/nrd2638

HASKÓ, G., ANTONIOLI, L., CRONSTEIN, B.N. Adenosine metabolism, immunity and joint health. *Biochem Pharmacol.* maio 2018. doi: 10.1016/j.bcp.2018.02.002

HEIN, T.W. et al. Functional and molecular characterization of receptor subtypes mediating coronary microvascular dilation to adenosine. *J Mol Cell Cardiol.* v. 33, n. 2, p. 271-282, fev 2001. doi: 10.1006/jmcc.2000.1298

HERCULANO, A.M. et al. Methylmercury intoxication activates nitric oxide synthase in chick retinal cell culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, n. 3, p. 415-418, mar. 2006.

JACKMAN, N.A. et al. Regulation of system xc⁻ activity and expression in astrocytes by interleukin-1 β : implications for hypoxic neuronal injury. **Glia**, v. 58, n. 15, p. 1806-1815, 15 nov. 2010.

JANG M.H. & SONG J. Adenosine and adenosine receptors in metabolic imbalance-related neurological issues. **Biomed Pharmacother.** 2024 Aug;177:116996. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116996.

JYOTSANA, N., TA, K.T., DELGIORNO, K.E. The Role of Cystine/Glutamate Antiporter SLC7A11/xCT in the Pathophysiology of Cancer. **Front Oncol.** 23 fev 2022. doi: 10.3389/fonc.2022.858462

KASHFI, S. A1 Adenosine Receptor Activation Modulates Central Nervous System Development and Repair. **Mol Neurobiol.** v. 54, n. 10, p. 8128-8139, dez 2017. doi: 10.1007/s12035-016-0292-6

KATO, S. et al. Cystine/glutamate antiporter expression in retinal Müller glial cells: implications for DL-alpha-aminoadipate toxicity. **Neuroscience**, v. 57, n. 2, p. 473-482, nov. 1993.

KITAGAWA, Y. et al. System xc⁻ in microglia is a novel therapeutic target for post-septic neurological and psychiatric illness. **Sci Rep**, (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-01944006-8>

KOPPULA, P., ZHUANG, L., GAN, B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. **Protein Cell.** v. 12, n. 8, p. 599-620, ago 2021. doi: 10.1007/s13238-020-00789-5

LA BELLA, V. et al Expression and developmental regulation of the cystine/glutamate exchanger (xc⁻) in the rat. **Neurochem Res.** v. 32, n. 6, p. 1081-1090, jun 2007. doi: 10.1007/s11064-006-9277-6

LEE, J., ROH J.L. SLC7A11 as a Gateway of Metabolic Perturbation and Ferroptosis Vulnerability in Cancer. **Antioxidants (Basel)**. v. 11, n. 12, 11 dez 2022. doi: 10.3390/antiox11122444

LEWERENZ, J. et al. The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 5, p. 522-555, 10 fev. 2013.

LI, X. et al (2001). Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors. , 68(12), 0–1350. doi:10.1016/s0024-3205(00)01036-5

LI, Y. et al. Adenosine modulates the excitability of layer II stellate neurons in entorhinal cortex through A1 receptors. **Hippocampus**. v. 21, n. 3, p. 265-280, mar 2011. doi: 10.1002/hipo.20745

MADEIRA, M.H., et al. Adenosine A2AR blockade prevents neuroinflammation-induced death of retinal ganglion cells caused by elevated pressure. **J Neuroinflammation**. 10 jun 2015. doi: 10.1186/s12974-015-0333-5. PMID: 26054642; PMCID: PMC4465153.

MADEIRA, M., et al. Caffeine administration prevents retinal neuroinflammation and loss of retinal ganglion cells in an animal model of glaucoma. **Sci Rep**. <https://doi.org/10.1038/srep27532>

MARCHI, M. et al. Effects of adenosine A1 and A2A receptor activation on the evoked release of glutamate from rat cerebrocortical synaptosomes. **Br J Pharmacol**. v. 136, n. 3, p. 434-440, jun 2002. doi: 10.1038/sj.bjp.0704712

MARTINS L.C. et al. Cochlear glial cells mediate glutamate uptake through a sodium-independent transporter. *Hear Res*. 2023 May;432:108753. doi: 10.1016/j.heares.2023.108753.

MARTIS, R.M. et al. Identification, Expression, and Roles of the Cystine/Glutamate Antiporter in Ocular Tissues. **Oxid Med Cell Longev.** 18 jun 2020. doi: 10.1155/2020/4594606

MATOS, M. et al. Adenosine A2A receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. **Glia**, v. 60, n. 5, p. 702-716, maio 2012.

MELANI A. et al. (2009). Selective adenosine A2a receptor antagonism reduces JNK activation in oligodendrocytes after cerebral ischaemia. **Brain**, 132(6), 1480–1495. doi:10.1093/brain/awp076

MESCI, P. et al. System xC⁻ is a mediator of microglial function and its deletion slows symptoms in amyotrophic lateral sclerosis mice. **Brain**. v. 138, n. 1, p. 53-68, jan 2015. doi: 10.1093/brain/awu312.

MORAES, E.R.S. et al. Determination of glutamate uptake by high performance liquid chromatography (HPLC) in preparations of retinal tissue. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 907, p. 1-6, 5 set 2012.

NADIM, F., BUCHER, D. Neuromodulation of neurons and synapses. **Curr Opin Neurobiol.** dez 2014. doi: 10.1016/j.conb.2014.05.003

NAM, H.W. et al. Adenosine and glutamate signaling in neuron-glia interactions: implications in alcoholism and sleep disorders. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 36, n. 7, p. 1117-1125, jul 2012. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01722.x.

NAVIA, A.M. et al. Adenosine Receptors as Neuroinflammation Modulators: Role of A1 Agonists and A2A Antagonists. **Cells**. 21 ju 2020. doi: 10.3390/cells9071739.

OHANA, G., et al. Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor. **J Cell Physiol.** v. 186, n. 1, p. 19-23; jan 2001. doi: 10.1002/10974652(200101)186:1<19::AID-JCP1011>3.0.CO;2-3. PMID: 11147810

OLIVEIRA, K.R.M. et al. Pharmacological characterization of glutamate Na⁺-independent transport in retinal cell cultures: Implications in the glutathione metabolism. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 1, p. 59-66, 12 set. 2009.

OLUFUNMILAYO, E.O., GERKE-DUNCAN, M.B., HOLSINGER, R.M.D. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders. **Antioxidants (Basel)**. 18 fev 2023. doi: 10.3390/antiox12020517

OTTESTAD-HANSEN, S. et al. The cystine-glutamate exchanger (xCT, Slc7a11) is expressed in significant concentrations in a subpopulation of astrocytes in the mouse brain. **Glia**. v. 66, n. 5, p. 951-970, maio 2018. doi: 10.1002/glia.23294

OTHMAN T., YAN H., RIVKEES S.A. Oligodendrocytes express functional A1 adenosine receptors that stimulate cellular migration. **Glia**. 2003 Nov;44(2):166-72. doi: 10.1002/glia.10281.

PAES-DE-CARVALHO, Roberto. Adenosine as a signaling molecule in the retina: biochemical and developmental aspects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 3, p. 437–451, 25 jun. 2002.

PINTOR, A. et al. Adenosine A2A receptor antagonists prevent the increase in striatal glutamate levels induced by glutamate uptake inhibitors. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 1, p. 152-156, 10 mar. 2004.

POLTORACK, C.D., DIXON, S.J. Understanding the role of cysteine in ferroptosis: progress & paradoxes. **FEBS J**. v. 289, n. 2, p. 374-385, jan 2022. doi: 10.1111/febs.15842

REICHERT, C.F., DEBOER, T., LANDOLT, H.P. Adenosine, caffeine, and sleep-wake regulation: state of the science and perspectives. **J Sleep Res**. ago 2022. doi: 10.1111/jsr.13597

REINER, A., LEVITZ, J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. **Neuron**. v. 98, n. 6, p. 1080-1098, 27 jun 2018. doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.018

REISS A.B. et al. Adenosine and the Cardiovascular System. **Am J Cardiovasc Drugs**. v. 19, n. 5, p. 449-464, out 2019. doi: 10.1007/s40256-019-00345-5

RESCH, J.M. et al. Augmented cystine-glutamate exchange by pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide signaling via the VPAC1 receptor. **Synapse**, v. 68, n. 12, p. 604-612, 6 ago. 2014.

SANJURJO-SORIANO, C. & KALATZIS, V. Guiding Lights in Genome Editing for Inherited Retinal Disorders: Implications for Gene and Cell Therapy. **Neural Plast**. 8 maio 2018. doi: 10.1155/2018/5056279.

SATO, H. et al. Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain. **J Neurosci**. v. 22, n. 18, p. 8028-8033, 15 set 2002. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-18-08028.2002

SEARS, S.M., HEWETT, S.J. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. **Exp Biol Med (Maywood)**. v. 246, n. 9, p. 1069-1083, maio 2021. doi: 10.1177/1535370221989263

SEBASTIÃO A.M. & RIBEIRO J.A. Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. **Prog Neurobiol**. 1996 Fev;48(3):167-89. doi: 10.1016/0301-0082(95)00035-6.

SHETH, S. et al. Adenosine receptors: expression, function and regulation. **Int J Mol Sci**. v. 15, n. 2, p. 2024-2052, 28 jan 2014. doi: 10.3390/ijms15022024

TAGUCHI, K. et al. Induction of cystine/glutamate transporter in bacterial lipopolysaccharide induced endotoxemia in mice. **J Inflamm (Lond)**. 26 set 2007. doi: 10.1186/1476-9255-4-20

TARNOWSKI, M., et al. Differential effect of adenosine on rhabdomyosarcoma migration and proliferation. **Arch Med Sci**. v. 16, n. 2, p. 414-427; 26 abril 2018. doi: 10.5114/aoms.2018.75506. PMID: 32190153; PMCID: PMC7069424.

UEMATSU, K. et al. Protein kinase A directly phosphorylates metabotropic glutamate receptor 5 to modulate its function. **J Neurochem**. v. 132, n. 6, p. 677-686, mar 2015. doi: 10.1111/jnc.13038. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25639954; PMCID: PMC4359654.

VENTURA, A.L.M. et al. Purinergic signaling in the retina: From development to disease. **Brain Res Bull**. set 2019. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.10.016.

VERMA, M., LIZAMA, B.N., CHU, C.T. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. **Transl Neurodegener**. 25 jan 2022. doi: 10.1186/s40035-02100278-7

WANG, J. et al. Role of Oxidative Stress in Retinal Disease and the Early Intervention Strategies: A Review. **Oxid Med Cell Longev**. 14 out 2022. doi: 10.1155/2022/7836828

WYDRA, K. et al. Adenosine A2A Receptors in Substance Use Disorders: A Focus on Cocaine. **Cells**. 2020 Jun 1;9(6):1372. doi: 10.3390/cells9061372

YANG, D. et al. Cholinergic and Adenosinergic Modulation of Synaptic Release. **Neuroscience**. 21 fev 2021. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.06.006

YE, S.S., TANG, Y. & SONG, J.T. ATP and Adenosine in the Retina and Retinal Diseases. **Front. Pharmacol**. 12:654445. doi: 10.3389/fphar.2021.654445.

YIP, L., KWOK, Y.N. Role of adenosine A2A receptor in the regulation of gastric somatostatin release. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 309, n. 2, p. 804-815, maio 2004. doi: 10.1124/jpet.103.061986

YIP, L., LEUNG, H.C., KWOK, Y.N. Role of adenosine A1 receptor in the regulation of gastrin release. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 310, n. 2, p. 477-487, ago 2004. doi: 10.1124/jpet.104.066654

ZHANG, H., PANDEY, S.C. Effects of PKA modulation on the expression of neuropeptide Y in rat amygdaloid structures during ethanol withdrawal. **Peptides.** v. 24, n. 3, p. 1397-1402, set 2003. doi: 10.1016/j.peptides.2003.08.008

ZHANG, C., WANG, K., WANG, H. Adenosine in cancer immunotherapy: Taking off on a new plane. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer.** nov 2023. doi: 10.1016/j.bbcan.2023.189005

ZHONG, L., PENG, Q., ZENG, X. The role of adenosine A1 receptor on immune cells. **Inflamm Res.** v. 71, n. 10-11, p. 1203-1212, nov 20. doi: 10.1007/s00011-022-01607-w

ANEXO I

1) **CEUA N° 9823240621** Registrado em: 24/06/2021

Título: "O uso da retina de embrião de galinha (White leghorn) como modelo para ensaios neuroquímicos" 

Documentos anexados: 1.) Termo de Compromisso 2.) Termo de doação do proprietário 3.) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 4.) Projeto de Pesquisa 5.) FormConcea_24.06.2021

ANEXO II



We certify that

Caroline Araújo Costa de Lima

presented the best poster during the XII Meeting of the Brazilian Purine Club held at Federal University of Paraná (Curitiba, PR, Brazil), November 8 – 11, 2023 and was awarded with the “João José Freitas Sarkis 2023 Prize” for the work “Adenosine A2A Receptor Modulates Sodium-Independent Glutamate Transport in Retinal Cell Culture”.

Prof. Dr. Henning Ulrich
President of the Brazilian Purine Club

