



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

**LUCIELE VARASCHINI TEIXEIRA**

**AÇÕES DA GUANOSINA EM RATOS WISTAR FÊMEAS E MACHOS INDUZIDOS  
A ISQUEMIA CEREBRAL**

**PORTO ALEGRE  
2018**

**LUCIELE VARASCHINI TEIXEIRA**

**AÇÕES DA GUANOSINA EM RATOS WISTAR FÊMEAS E MACHOS INDUZIDOS  
A ISQUEMIA CEREBRAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como  
requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

**PORTO ALEGRE  
2018**

CIP - Catalogação na Publicação

Teixeira, Luciele Varaschini

Ações da guanosina em ratos Wistar fêmeas e machos induzidos à isquemia cerebral / Luciele Varaschini Teixeira. -- 2018.

91 f.

Orientador: Diogo Onofre Gomes Souza.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Isquemia cerebral. 2. Gênero. 3. Guanosina. 4. Função motora. 5. Memória. I. Souza, Diogo Onofre Gomes, orient. II. Título.

*Dedico esta tese a todos os animais,  
principalmente aos animais de laboratório,  
que contribuem em milhares de  
pesquisas pelo mundo, na maioria das vezes,  
somente para benefício humano.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha querida e excepcional família, pai, mãe, irmãs, sogra, sogro, avós... Em especial ao meu esposo Wagner, obrigada por todo o apoio e assistência em todos os momentos.

Às minhas “filhas peludas”, minhas companheiras de escrita e de todos os momentos em casa, obrigada pela companhia sempre.

Ao professor Carlos Alberto Gonçalves, obrigada por ter me acolhido e me apresentado ao professor Diogo Souza, obrigada pela amizade e confiança.

Ao meu orientador, professor Diogo Souza, obrigada por ter aceitado me orientar e ter acreditado no meu trabalho, por todo o apoio científico e emocional, pela amizade, por ter tornado esta etapa da minha vida possível.

A todos os animais que participaram dos experimentos, serei eternamente grata por terem doado as suas vidas no desenvolvimento desta tese.

“A maneira como tratamos os animais reflete o tipo de humanos que somos.”

A todos os colegas e amigos do laboratório 28, principalmente ao Roberto, que contribuiu fundamentalmente na parte comportamental dos experimentos. Obrigada a todos pelo apoio, pelas horas de diversão, pelos happy hours e por todos os ensinamentos!

À Francieli e ao Leo, colegas e amigos do laboratório 21, obrigada pela ajuda excepcional nos experimentos, por todos os ensinamentos, pela companhia nas horas alegres e nas horas estressantes. Obrigada especialmente a querida Francieli, pela insubstituível ajuda nas cirurgias.

Às minhas amigas queridas e colegas de trabalho do Centro de Cardiologia Experimental, Patrícia, Fernanda e Ana Paula, obrigada pela compreensão, pela amizade e por me ouvirem nas minhas horas estressantes.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Bioquímica, obrigada por todo apoio com os animais.

Aos funcionários do PPGBioq, obrigada pelo apoio nas horas de dúvidas, pelo suporte para que a conclusão desta etapa da minha vida fosse possível.

À CAPES e demais órgãos que ajudam a fomentar as pesquisas em nosso país, obrigada pelo apoio financeiro.

*“Precisamos de um novo e talvez mais místico e mais sábio conceito sobre os animais. Longe da natureza universal e vivendo em um substrato artificial complicado, o homem vê as criaturas não humanas através da lente de seu conhecimento e vê, assim, uma imagem amplificada e distorcida. Nós os vemos desde um prisma superior considerando que possuem um trágico destino por terem tomado forma tão inferior a nós mesmos. Como consequência erramos, e erramos muito. O animal não deve ser medido pelo homem. Em um mundo mais velho e mais completo que o nosso, eles são mais completos, dotados com extensões dos sentidos maiores do que os que nós perdemos ou que nunca alcançamos, convivendo com vozes que nós nunca conseguiremos ouvir. Eles não são irmãos, eles não são subordinados; eles são outras nações, presos com nós mesmos na rede da vida e do tempo, prisioneiros irmãos de esplendor e dos problemas que passamos na Terra.”*

*Henry Beston, 1928*

*Trecho traduzido do livro The Outermost House*

## RESUMO

A isquemia cerebral é uma enfermidade grave, de incidência e prevalência global, considerada uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo. Ela é decorrente da hipoperfusão ou interrupção sanguínea em uma determinada região encefálica e a falta de oxigênio e glicose leva a falha no metabolismo energético de neurônios e células gliais. A morte destas células libera grande quantidade de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório, o que desencadeia a cascata isquêmica, formada por estresse oxidativo, excitotoxicidade e processo inflamatório. Estes insultos causam danos teciduais graves que comprometem, principalmente, o sistema sensorimotor, memória, cognição e as emoções. A guanosina, um derivado da guanina, tem mostrado papel neuroprotetor ao sistema nervoso central, agindo no sistema glutamatérgico. Esses efeitos têm sido demonstrados em ratos machos, mas não em fêmeas, por isso, o objetivo desta tese foi investigar através de testes comportamentais, imunoistoquímico e histológico, a ação da guanosina em ratos Wistar machos e fêmeas induzidos cirurgicamente a um modelo de isquemia focal permanente do córtex cerebral parietal, levando em consideração o ciclo estral das fêmeas imediatamente antes da indução isquêmica. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (Nº 29396). Após a verificação do ciclo estral, fêmeas e machos foram anestesiados, posicionados em aparelho estereotáxico e a isquemia focal cortical foi induzida por termocoagulação dos vasos piais. Ao término da cirurgia, os animais foram tratados com solução salina 0,9% ou guanosina 60 mg/kg, ambos por via intraperitoneal, em 4 doses (0, 1, 3 e 6 horas após a indução isquêmica). No teste do cilindro, as fêmeas apresentaram significativamente melhor recuperação sensorimotora a longo prazo comparadas aos machos. No teste do campo aberto, memória de habituação a longo prazo e locomoção em fêmeas foram prejudicadas pela isquemia e os machos não apresentaram prejuízo. No teste do labirinto em cruz elevado não houve diferença significativa entre os grupos. No teste claro/escuro, as fêmeas isquêmicas demonstraram comportamento ansiolítico comparadas aos machos e às fêmeas naïves. A imunoistoquímica de astrócitos e a mensuração do volume de lesão não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Com este trabalho demonstrou-se a importância da realização de pesquisas em ambos os gêneros, considerando o ciclo estral, principalmente para enfermidades complexas como a isquemia cerebral. O tratamento com a guanosina é promissor, principalmente na recuperação motora em fêmeas, entretanto, estudos futuros são necessários para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: Isquemia cerebral, ciclo estral, fêmeas, função motora, guanosina



## ABSTRACT

Ischemic stroke is a serious disease of global incidence and prevalence, considered a leading cause of death and disability worldwide. It is due to hypoperfusion or blood disruption in a brain region and the lack of oxygen and glucose leads to failure in energetic metabolism of neurons and glial cells. The death of these cells releases large amount of glutamate, the main excitatory neurotransmitter, which triggers the ischemic cascade, formed by oxidative stress, excitotoxicity and inflammatory processes. These insults cause severe tissue damage that mainly compromise the sensorimotor system, memory, cognition and emotions. Guanosine, a guanine derivative, has shown a neuroprotective role in the central nervous system, acting on the glutamatergic system. These effects have been demonstrated in male rats, but not in females, so the aim of this thesis was to investigate through behavioral, immunohistochemical and histological tests, the action of guanosine in male and female Wistar rats surgically induced to a model of focal permanent cerebral ischemia in the motor cortex, considering the female estrous cycle immediately before the ischemic induction. This work was approved by the UFRGS Ethical Committee on the Use of Animals (No. 29396). After estrous cycle verification, females and males were anesthetized, positioned in a stereotaxic apparatus, and cortical focal ischemia was induced by thermocoagulation of the pial vessels. At the end of the surgery, the animals were treated with 0.9% saline or guanosine 60 mg/kg, both intraperitoneally, in 4 doses (0, 1, 3 and 6 hours after ischemic induction). In the cylinder test, females presented significant long-term sensorimotor recovery compared to males. In the open field test, long-term memory habituation and locomotion/exploratory activity in females were impaired by ischemia and males showed no impairment. In the elevated plus maze test, there was no significant difference between groups. In the light/dark test, the ischemic females showed anxiolytic-like behavior compared to naïve males and females. The immunohistochemistry of astrocytes and the measurement of lesion volume did not show any statistical difference between groups. With this work it was demonstrated the importance of conducting researches in both genders, considering the estrous cycle, mainly for complex diseases such as cerebral ischemia. The treatment with guanosine is promising, especially in motor recovery in females; however, future studies are necessary to better understand the mechanisms involved.

Keywords: Ischemic stroke, estrus cycle, female, motor function, guanosine

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de AVE.....	14
Figura 2 – Esquema representativo de formação da lesão após AVEI.....	16
Figura 3 – Estrutura de uma sinapse.....	24
Figura 4 – Mecanismos envolvidos nos efeitos neuroprotetores da guanosina...	30
Figura 5 – Tipos de memória.....	32

### Capítulo 1

Figura 1 – Esquema experimental.....	40
Figura 2 – Simetria de animais isquêmicos (comparação entre tratamentos).....	42
Figura 3 – Teste do campo aberto.....	43
Figura 4 – Teste do labirinto em cruz elevado.....	44
Figura 5 – Análise morfológica de astrócitos.....	44
Figura 6 – Análise quantitativa de astrócitos.....	45
Figura 7 – Volume de infarto de cérebros isquêmicos.....	46
Figura Suplementar 1 – Simetria de animais isquêmicos (comparação entre gênero).....	52

### Capítulo 2

Figura 6 – Teste do campo aberto.....	54
Figura 7 – Teste do labirinto em cruz elevado.....	56
Figura 8 – Teste claro/escuro.....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ações e consequências pós-AVE..... 34

### **Capítulo 1**

Tabela 1 – Contagem total de astrócitos nos lados ipsilateral e contralateral..... 45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA – ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico  
ATP – trifosfato de adenosina  
AVE – acidente vascular encefálico  
AVEI – acidente vascular encefálico isquêmico  
BHE – barreira hematoencefálica  
CA1 – corno de Ammon 1  
CSPGs – proteoglicanos de sulfato de condroitina  
EAATs – transportadores de aminoácidos excitatórios  
ERNs – espécies reativas de nitrogênio  
EROs – espécies reativas de oxigênio  
GAP-43 – growth associated protein 43  
GFAP – glial fibrilar acidic protein  
GMP – guanosina monofosfato  
GPR23 – G protein receptor 23  
GUO – guanosina  
iGluR – receptores glutamatérgicos ionotrópicos  
IL – interleucina  
iNOS – óxido nítrico sintetase induzida  
MCAO – middle cerebral artery occlusion  
mGluR – receptores glutamatérgicos metabotrópicos  
NF-kB – fator nuclear kappa B  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
NO – óxido nítrico  
RAM – Random Access Memory  
RNMDA – receptor do N-metil-D-aspartato  
SCN – sistema nervoso central  
VGLUT – transportador glutamatérgico vesicular

## SUMÁRIO

### PARTE I

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Acidente vascular encefálico (AVE).....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Fisiopatologia do acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI).....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Acidente vascular encefálico e gênero.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Acidente vascular encefálico e astrogliose.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5 Sistema glutamatérgico cerebral.....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Sistema glutamatérgico, memória e Acidente vascular encefálico.....	24
1.5.2 Sistema glutamatérgico e derivados da guanina.....	26
1.5.2.1 Efeitos da guanosina <i>in vivo</i> .....	27
<b>1.6 Memória.....</b>	<b>31</b>
1.6.1 Breves conceitos dos tipos de memória.....	31
1.6.2 Acidente vascular encefálico e memória.....	33
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Geral.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Específicos.....</b>	<b>36</b>

### PARTE II

<b>Capítulo 1: Neuroprotective Effects of Guanosine Administration on <i>In Vivo</i></b>	
<b>Cortical Focal Ischemia in Female and Male Wistar Rats.....</b>	<b>37</b>
<b>Capítulo 2: Metodologias e resultados complementares não publicados.....</b>	<b>53</b>
<b>Teste do campo aberto.....</b>	<b>53</b>
<b>Teste do labirinto em cruz elevado.....</b>	<b>56</b>
<b>Metodologia e resultados do teste claro/escuro.....</b>	<b>56</b>

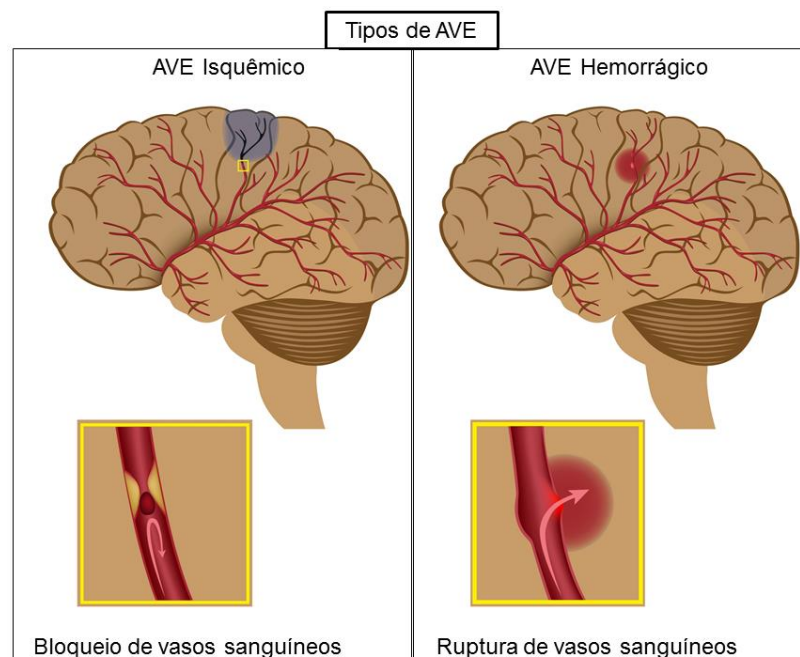
### PARTE III

<b>3 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Acidente vascular encefálico (AVE)

A Organização Mundial da Saúde define o AVE pela falha no suprimento sanguíneo cerebral, de localização focal ou global e rápido surgimento de sinais clínicos ou sintomas, que levam o paciente ao óbito ou causam incapacidade semipermanente ou permanente, sem causa aparente que não a de origem vascular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A ausência do fluxo sanguíneo ocorre por ruptura (acidente vascular hemorrágico) ou obstrução (acidente vascular isquêmico) de uma artéria numa região encefálica (Figura 1). De acordo com o tempo de ausência do fluxo sanguíneo no tecido, o acidente vascular pode ser classificado como transitório ou permanente (SACCO et al., 2013). O AVE é um problema de saúde mundial, de alta incidência, que causa incapacidade sensório-motora afetando assim, tanto o paciente como seus familiares a longo prazo. Para as próximas décadas há uma tendência de aumento mundial na prevalência de AVE (WHO, 2003; BONITA et al., 2004; WARLOW et al., 2008; LANHOME et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).



**Figura 1. AVE isquêmico: impedimento de fluxo sanguíneo por trombo; AVE hemorrágico: impedimento de fluxo sanguíneo por ruptura de vaso e extravasamento de sangue. Imagem adaptada de:**

[http://www.americancryostem.com/wp-content/uploads/2013/08/shutterstock\\_78688366.jpg](http://www.americancryostem.com/wp-content/uploads/2013/08/shutterstock_78688366.jpg)

O AVE é a segunda maior causa de morte no mundo, atingindo cerca de 33 milhões de pessoas ao ano (MOZAFFARIAN et al., 2015). No Brasil, o AVE continua sendo a primeira causa de morte e incapacidade (68 mil casos em 2014), o que resulta em grande impacto socioeconômico. De acordo com um estudo prospectivo nacional, a cada 100 mil habitantes, 108 serão incidentes, com taxa de fatalidade aos 30 dias de 18,5% e passados 12 meses de 30,9% (BRASIL, 2014).

### ***1.2 Fisiopatologia do acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI)***

O AVEI decorre de uma interrupção transitória ou permanente do fluxo sanguíneo em uma região do cérebro, que pode ocorrer por trombose local ou embolia, impedindo assim, o fornecimento de glicose e oxigênio para as células. A falta de nutrientes desencadeia mudanças no metabolismo celular, o que resulta no colapso da produção de energia, levando a desintegração das membranas celulares (ADAMS et al., 1993; BROUNS e DE DEYN, 2009).

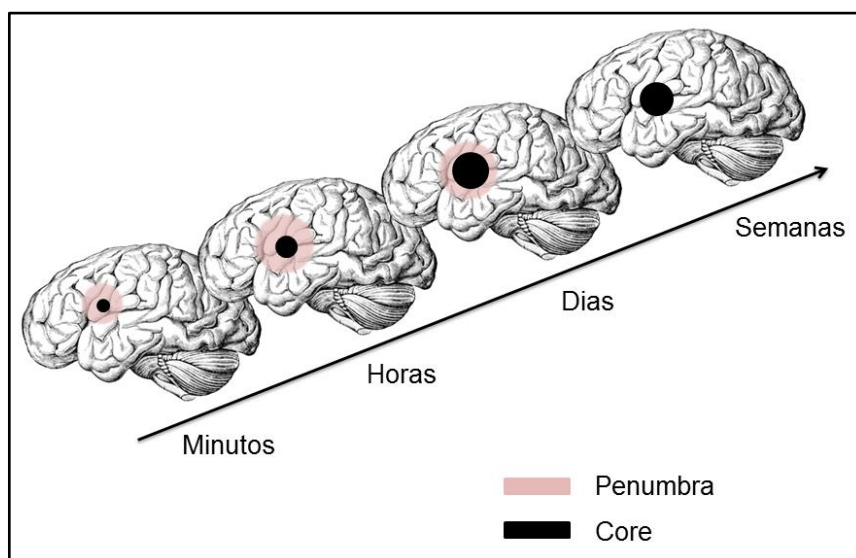
A sequência de processos neuroquímicos, chamada de cascata isquêmica, é composta por uma série de eventos complexos que evoluem no tempo e no espaço. Uma vez que um evento na cascata pode causar ou pode ser causado por vários outros eventos, a cascata isquêmica é um fenômeno altamente heterogêneo. No entanto, pode ser resumido como a falha bioenergética celular devido à hipoperfusão cerebral focal, regional ou global, seguido por estresse oxidativo, excitotoxicidade, disfunção da barreira hemato-encefálica, lesão microvascular, ativação hemostática, inflamação pós-isquêmica, desequilíbrio iônico e, finalmente, morte celular de neurônios, células gliais e células endoteliais (BROUNS e DE DEYN, 2009).

Logo após a diminuição do fluxo sanguíneo, em poucos minutos, ocorre o surgimento do centro necrótico, chamado core. Ao redor desse centro estrutura-se uma zona menos afetada, chamada penumbra, onde há células necróticas e células metabolicamente ativas (Figura 2). A necrose é morfológicamente caracterizada por edema das células e das organelas, com subsequente ruptura dessas estruturas e da membrana celular, liberando o conteúdo para o meio extracelular (MAJNO e JORIS, 1995; BROUGHTON et al., 2009).

Em estágios iniciais, a zona de penumbra compreende, aproximadamente, a metade do volume total da lesão isquêmica e é neste local que a terapia

farmacológica agirá, na tentativa de interromper a cascata isquêmica o mais rápido possível (GINSBERG, 1997). Nesta zona é possível encontrar morte celular por apoptose, uma vez que há ativação de certos genes específicos. Muitas células da zona de penumbra sofrem apoptose após horas, dias ou semanas pós-isquemia, assim, elas são potencialmente recuperáveis apenas por algum tempo no tecido (DIRNAGL et al., 1999; LIPTON, 1999; ZHENG e YENARI, 2004).

Após uma lesão tecidual sempre há formação de cicatriz e o mesmo ocorre no tecido nervoso. Após uma lesão cerebral há resposta glial extensa (gliose reativa) que engloba astrócitos, microglia e matriz extracelular (PANICKAR e NORENBORG, 2005). Estudos demonstram que a gliose reativa pode ser benéfica ou prejudicial sobre a restauração das funções cerebrais após o AVEI (SOFRONIEW, 2009). Logo após uma lesão, a formação da cicatriz é crucial para a selagem e remodelagem do local, evitando o ataque do sistema imune e controlando a extensão da lesão (SOFRONIEW e VINTERS, 2010). Além disso, a cicatriz glial estimula a revascularização local, na tentativa de restaurar o aporte nutricional ao tecido lesado. Entretanto, na fase tardia da cicatrização ocorre um impedimento na regeneração axonal, devido à secreção de inibidores de fatores de crescimento pelos astrócitos reativos. Ainda, componentes da membrana basal geram uma barreira física que impede a extensão de axônios através da lesão (ROLLS et al., 2009).



**Figura 2 – Esquema representativo de formação da lesão após AVEI (zona de penumbra em rosa claro e core em preto), de acordo com o tempo pós-isquemia. Fonte: Figura elaborada pela autora.**



### **1.3 Acidente vascular encefálico e gênero**

O AVE é a quarta causa de morte mundial entre mulheres de 20 a 59 anos de idade (aproximadamente 60%). A partir dos 60 anos de idade, o AVE passa a ser a segunda causa de morte entre as mulheres. Nos primeiros 6 meses após o AVE, as mulheres apresentam maiores incapacidades comparadas aos homens, além de um risco maior de sofrer recorrências (MOZAFFARIAN et al., 2015). Cerca de 87% dos AVEs incidentes são isquêmicos com maior ocorrência em homens e 13% são hemorrágicos com maior ocorrência em mulheres (APPELROS et al., 2009; AMARENCO et al., 2009; ROGER et al., 2011). De acordo com o NIHSS (*National Institute of Health Stroke Scale*), maior número de mulheres (44%) experimenta AVEI agudo e severo, com recuperação mais lenta, comparado aos homens (36%). Uma hipótese para isso é a elevada faixa etária de incidência de AVE em mulheres (REEVES et al., 2008; PETREA et al., 2009; HAAST et al., 2012).

Pesquisas sugerem que mulheres possuem efeito neuroprotetor pré-menopausa relacionado aos hormônios ovarianos circulantes, principalmente estrogênio. Embora as faixas etárias variem de acordo com os diferentes estudos, Reeves e colaboradores (2008) afirmaram que mulheres entre 40 e 75 anos de idade parecem ter menos risco de sofrer AVE em comparação aos homens na mesma faixa etária, mas após os 75 anos de idade, a chance de incidência de AVE em mulheres passa a ser 50% maior do que nos homens.

Os hormônios sexuais (estrogênio, progesterona e testosterona) agem fisiologicamente (reatividade vascular, fluxo sanguíneo cerebral, barreira hematoencefálica) e fisiopatologicamente (arterosclerose) sobre a vasculatura cerebral (KRAUSE et al., 2006). *In vivo*, testosterona e estrogênio possuem influências opostas sobre as artérias cerebrais. O estrogênio possui efeito vasodilatador potente, podendo inibir certos vasoconstritores séricos. Outras pesquisas também identificaram que artérias femininas geralmente são menos constrictas, possivelmente como resultado do efeito do estrogênio sobre a produção de óxido nítrico no endotélio (GEARY et al., 1998). Apesar de pouco investigado, alguns pesquisadores sugeriram que, ao invés de o estrogênio ter atividade neuroprotetora em mulheres, talvez os andrógenos provoquem o aumento da incidência de AVE em homens (ROSSOUW, 2002).

Os mecanismos neuroprotetores atribuídos ao estrogênio e a progesterona são menos aparentes em homens comparados às mulheres, obviamente por eles possuírem níveis circulantes mínimos desses hormônios. Assim, as funções fisiológicas e fisiopatológicas no homem são mais influenciadas pelos andrógenos, principalmente a testosterona. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos deste hormônio sobre vasculatura (OHTSUKI et al., 2005). Em contraste ao estrogênio, a testosterona causa aumento do tônus vascular cerebral, como consequência da produção de tromboxano A<sub>2</sub>, levando a agregação plaquetária e possível trombogênese (PRATICO e FITZGERALD, 1995).

Muitos estudos demonstraram que a terapia de reposição hormonal em mulheres aumentou a incidência e a mortalidade por AVE, principalmente isquêmico (WASSERTHEIL-SMOLLER et al., 2003; BILLECI et al., 2008). Entretanto, esses achados contradizem os efeitos protetores observados em modelos animais e os efeitos biológicos observados em humanos. Ainda, mulheres de 15 a 44 anos que fazem uso de contraceptivos orais com estrogênios e progestágenos possuem risco elevado de sofrer AVEI, devido ao efeito pró-coagulante desses hormônios (DANIELS et al., 2013). A gestação é um fator de risco adicional para o AVEI em mulheres, embora a exata etiologia ainda não tenha sido descoberta. Wiebers (1985) sugeriu um aumento de 13 vezes no risco de AVEI para gestantes. Muitos pesquisadores acreditam que essa associação possa estar relacionada às mudanças hormonais durante a gravidez e a elevação natural do estradiol durante a gestação possa causar aumento da atividade de vários fatores de coagulação (ZAKAI et al., 2011; HEIKAL et al., 2013; CHANG et al., 2014; SAMAI et al., 2014).

Estudos relatam uma variedade de tratamentos para AVE agudo e crônico, como trombólise, unidades de cuidados do paciente com AVE, cirurgia de carótida, reabilitação e formas de prevenção. Para o AVEI, o tratamento mais utilizado é a trombólise, entretanto, os resultados são obscuros (REEVES et al., 2008; APPELROS et al., 2009). Igualmente, mulheres e homens recebem terapia trombolítica, mas em geral, melhores resultados são observados em homens. O acesso aos centros de reabilitação é semelhante para mulheres e homens, no entanto, menor recuperação funcional e resposta à reabilitação são observadas em mulheres. Diferenças mais evidentes são observadas na cirurgia da carótida. Em casos de estenose carotídea, os homens parecem ter mais benefício do que as

mulheres, embora estas sofram menos endarterectomia carotídea (REEVES et al., 2008).

Vários autores relatam menor uso de medicamentos relacionados ao AVE (aspirina, varfarina, estatina, alteplase) em mulheres. A redução do risco com o uso de aspirina não é clara. No entanto, a aspirina inibe a agregação plaquetária de forma mais eficaz em homens do que em mulheres. Essa diferença na funcionalidade plaquetária e na coagulação podem estar relacionadas aos hormônios sexuais (BAILEY et al., 2009).

Funcionalmente, mulheres sofrem AVE mais graves do que homens (GALL et al., 2010), o que resulta em uma pior qualidade de vida (mais limitações físicas e pior saúde mental) e maior dependência (BARRETT et al., 2007). Ademais, a depressão pós-AVE é mais comum entre as mulheres do que nos homens.

Diante de tantas pesquisas sobre AVE, ainda são necessárias muitas investigações, como modelos animais ideais, para o desenvolvimento de tratamentos específicos em mulheres e homens (BACIGALUPPI et al., 2010). Estudos epidemiológicos e clínicos realizados frequentemente com homens geram resultados diferentes para mulheres, como exemplo, na resposta a muitas drogas (SOLDIN e MATTISON, 2009), nas doenças cardiovasculares (BARRETT-CONNOR, 1997; BERGER et al., 2009) e na disfunção autoimune (WHITACRE, 2001; LOCKSHIN, 2006; FISH, 2008).

Como exemplos, a incidência de transtornos de ansiedade em mulheres é 2,25 vezes maior do que os homens (BEKKER e VAN MENS-VERHULST, 2007), mas a maioria dos estudos sobre ansiedade e drogas ansiolíticas em animais é realizado em machos (PALANZA, 2001); a incidência de AVE em mulheres e homens tem desfechos diferentes, mulheres sofrem mais de depressão, mas os estudos são conduzidos majoritariamente em animais machos (REEVES et al., 2008). BEERY e ZUCKER (2011) inspecionaram 40 artigos sobre modelos animais de AVE em periódicos cientificamente renomados; 65% dos relatos descreveram pesquisas em machos, nenhum em fêmeas, 10% em ambos os sexos e 25% não especificaram sexo. A utilização de machos torna-se, provavelmente, muito maior do que observada nos artigos, se a maioria dos estudos não especificar o gênero utilizado.

#### 1.4 Acidente vascular encefálico e astrogliose

Os astrócitos são células imprescindíveis para o funcionamento do cérebro. Eles participam das funções de manutenção, como suporte nutricional, formação da barreira hematoencefálica (BHE), metabolismo neuronal, manutenção do ambiente extracelular, regulação do fluxo sanguíneo cerebral, estabilização da comunicação célula-célula, síntese de neurotransmissores e defesa contra EROs (RANSOM e RANSOM, 2012). Os astrócitos são os tipos predominantes de células gliais, sendo, portanto, o principal alvo de manipulação, por isso, estudos recentes têm focado sobre o papel destas células no AVE.

No cérebro, os astrócitos são basicamente divididos de acordo com a morfologia e a localização: astrócitos radiais circundantes aos ventrículos, astrócitos protoplasmáticos na substância cinzenta e astrócitos fibrosos na substância branca (PRIVAT et al., 1995), glia radial de Bergmann no cerebelo, astrócitos velados na camada granulosa do cerebelo, astrócitos interlaminares nas camadas supragranulares do córtex cerebral, entre outros (REICHENBACH e WOLBURG, 2013).

Em um AVE, os astrócitos sofrem transformações morfológicas como hipertrofia e hiperplasia. Há poucos minutos de lesão, citocinas liberadas por neurônios e células gliais do núcleo e neurônios da penumbra da lesão, desencadeiam a ativação de astrócitos. Estes astrócitos, também chamados astrogliose reativa (SOFRONIEW, 2009) apresentam hipertrofia celular, proliferação (hiperplasia), aumento da expressão de proteínas do filamento intermediário (GFAP, vimentina e nestina) e expressão alterada de muitas outras moléculas envolvidas na estrutura celular, transcrição genética, metabolismo energético, sinalização intracelular e transportadores de membrana (CLARKE et al., 1994; HOLMIN et al., 1997; RIDET et al., 1997; FUCHS e CLEVELAND, 1998; LI e CHOPP, 1999; YASUDA et al., 2004).

Quando ativados, os astrócitos exibem processos alongados na área perilesional (KAJIHARA et al., 2001). Em poucos dias após um AVE, uma cicatriz glial (parede física e funcional) se forma ao redor do tecido cerebral necrótico (BIDMON et al., 1998; SILVER e MILLER, 2004), gerada principalmente por astrócitos reativos. De acordo com a gravidade da lesão, formas menores de

astrogliose reativa podem se resolver com o tempo, enquanto nos casos mais graves, a formação de cicatriz pode ser permanente (SOFRONIEW, 2009).

Existem controvérsias sobre o papel funcional da cicatriz glial após o AVE, pois, os astrócitos reativos expressam moléculas inibitórias à regeneração axonal, como os proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs) (MCKEON et al., 1991; SMITH e STRUNZ, 2005; GRIS et al., 2007), principal barreira contra a extensão do axônio e consequente falha de regeneração do SNC. Por outro lado, a cicatriz glial pode isolar o local lesionado do tecido viável, evitando uma onda de dano tecidual descontrolado (FAULKNER et al., 2004), através da restrição de substâncias nocivas secretadas na região danificada para a área sadia (BUSH et al., 1999).

A astrogliose reativa está presente em várias patologias e muitos autores a consideram prejudicial para o desfecho neurológico após AVE. Logo após a lesão, os astrócitos reativos liberam mediadores inflamatórios, como interleucinas e quimiocinas (IL-6, IL-1 alfa e beta e interferon gama) (ORZYLOWSKA et al., 1999; BASIC KES et al., 2008; TUTTOLOMONDO et al., 2008; NAYAK et al., 2012). Estes mediadores podem induzir morte neuronal (VENTERS et al., 2000) e contribuir para a progressão da lesão no período pós-AVE, seja diretamente ou via indução de mediadores neurotóxicos, como o óxido nítrico (STOLL et al., 1998) e pelo aumento da permeabilidade na BHE (YANG et al., 1999). A ativação do fator nuclear kappa-B (NF-kB) em astrócitos também contribui para a degeneração neuronal pela produção e liberação de citocinas inflamatórias, EROs e excitotoxinas (MATTSON, 2005). A liberação de óxido nítrico (NO), superóxido e peroxinitrito leva a morte de neurônios por apoptose ou necrose (SUGAWARA e CHAN, 2003; GURSOY-OZDEMIR et al., 2004; BUSKILA et al., 2005). Astrócitos reativos também aumentam a expressão de S-100B na região da penumbra, elevando a expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), levando a morte neuronal mediada pelo NO (MATSUI et al., 2002).

No entanto, a astrogliose reativa também desempenha um papel benéfico ao cérebro. A cicatriz astrocitária isola a lesão e o tecido saudável, evitando uma onda de dano tecidual em cascata ainda não controlado (BUSH et al., 1999; FAULKNER et al., 2004). Os astrócitos reativos restringem a lesão e, conseqüentemente, as substâncias secretadas para a área perilesional, minimizando a área de inflamação no estágio agudo após a lesão (SOFRONIEW, 2005).

A terapêutica neuroprotetora pós lesional deve ser benéfica tanto para neurônios como para astrócitos, pois sabe-se que neurônios não são viáveis sem

astrócitos (CHEN e SWANSON, 2003). Gurer e colaboradores (2009) demonstraram em modelos animais de AVE que a viabilidade dos astrócitos foi mais longa comparada aos neurônios durante a isquemia. Assim, mesmo dentro do núcleo isquêmico, uma proporção de astrócitos permanece viável e metabolicamente ativa nas fases iniciais após a reperfusão em uma isquemia cerebral focal temporária (THOREN et al., 2005). Desse modo, os astrócitos sobreviventes fornecem uma possibilidade de restabelecer a integridade neuronal, através do retorno da função neuronal na penumbra isquêmica.

Logo após um AVE, a recuperação do tecido lesado pode ser atribuída à resolução do edema, absorção de tecido lesado ou reperfusão da penumbra isquêmica e atenuação da inflamação e excitotoxicidade, enquanto a recuperação após as duas semanas iniciais se deve, provavelmente, à plasticidade neurovascular. Eventos celulares e moleculares específicos abrem uma janela de tempo crucial para criar um microambiente único permissivo à regeneração na fase isquêmica pós-aguda (CARMICHAEL, 2006), induzindo substancial remodelação estrutural e funcional do tecido cerebral intacto remanescente, levando à recuperação neurológica. Como um participante ativo desses eventos, os astrócitos desempenham papéis importantes na mediação do reparo endógeno após o AVE, levando à melhora funcional (LIU e CHOPP, 2016).

### ***1.5 Sistema glutamatérgico cerebral***

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro. Seu efeito de sinalização independe da natureza química da molécula, mas sim, de como as células respondem quando expostas a ele. Os receptores de glutamato são expressos na superfície das células, portanto, sua função neurotransmissora ocorre no fluido extracelular. Por não haver enzimas extracelulares que possam degradar o glutamato, as baixas concentrações extracelulares requerem a captação celular. Esta absorção é catalisada por uma família de proteínas transportadoras de aminoácidos excitatórios (EAATs) localizadas na superfície celular de astrócitos e neurônios (DANBOLT, 2001; GREWER e RAUEN, 2005; TZINGOUNIS e WADICHE, 2007; VANDENBERG e RYAN, 2013). Os transportadores de glutamato regulam o tempo de concentração desse substrato na fenda sináptica (GREWER e RAUEN,

2005). Na membrana pós-sináptica, o glutamato interage com receptores específicos classificados em dois grandes grupos: metabotrópicos (mGluR), acoplados a sistemas de segundos mensageiros e ionotrópicos (iGluR – NMDA, AMPA e cainato), permeáveis a cátions sódio e cálcio (BRUNO et al., 2017). A Figura 3 ilustra a estrutura de uma sinapse.

Além de ser o principal mediador excitatório, o glutamato também é responsável pela plasticidade do sistema nervoso, desenvolvimento neural, aprendizado e memória (FEATHERSTONE, 2010). Assim, para que as sinalizações ocorram perfeitamente, o glutamato deve estar presente nas concentrações certas, nos lugares certos e no momento certo. Ainda, para que o conjunto obtenha a devida funcionalidade, as células devem ter sensibilidade e energia suficientes para resistir a estimulação normal, em que a remoção do glutamato ocorra nas taxas apropriadas dos locais certos. Tanto a falta como o excesso de glutamato são prejudiciais as células. A ativação excessiva dos receptores de glutamato leva a excitação das células nervosas até a morte, processo chamado excitotoxicidade (DANBOLT, 2001).

Dentro da célula, o glutamato pode ser redistribuído para as mitocôndrias ou para as vesículas sinápticas (ERECINSKA e SILVER, 1990; NICHOLLS, 1993). Várias enzimas que fazem a translocação do glutamato estão localizadas nas mitocôndrias. Os transportadores de glutamato mitocondriais são muito diferentes comparados aos transportadores de glutamato da membrana plasmática celular (PALMIERI, 2013). Nas terminações nervosas glutamatérgicas, o glutamato é transportado para as vesículas sinápticas pelos transportadores de glutamato vesiculares. Estes também são muito diferentes comparados aos transportadores de glutamato da membrana plasmática celular por serem independentes de sódio e potássio e por possuírem menor afinidade (EL MESTIKAWY et al., 2011; OMOTE et al., 2011).

O glutamato é constantemente liberado para o líquido extracelular, principalmente através de vesículas sinápticas (DANBOLT, 2001). No entanto, existem outros mecanismos não vesiculares de liberação, como canais aniônicos (WANG et al., 2013), operação reversa de proteínas transportadoras de glutamato da membrana plasmática (SONTHEIMER, 2008), transportador glutamina-cistina (BRIDGES et al., 2012) e um quarto mecanismo muito debatido nas últimas décadas que é a liberação de glutamato por astrócitos maduros *in situ* (BEZZI et al., 2004).

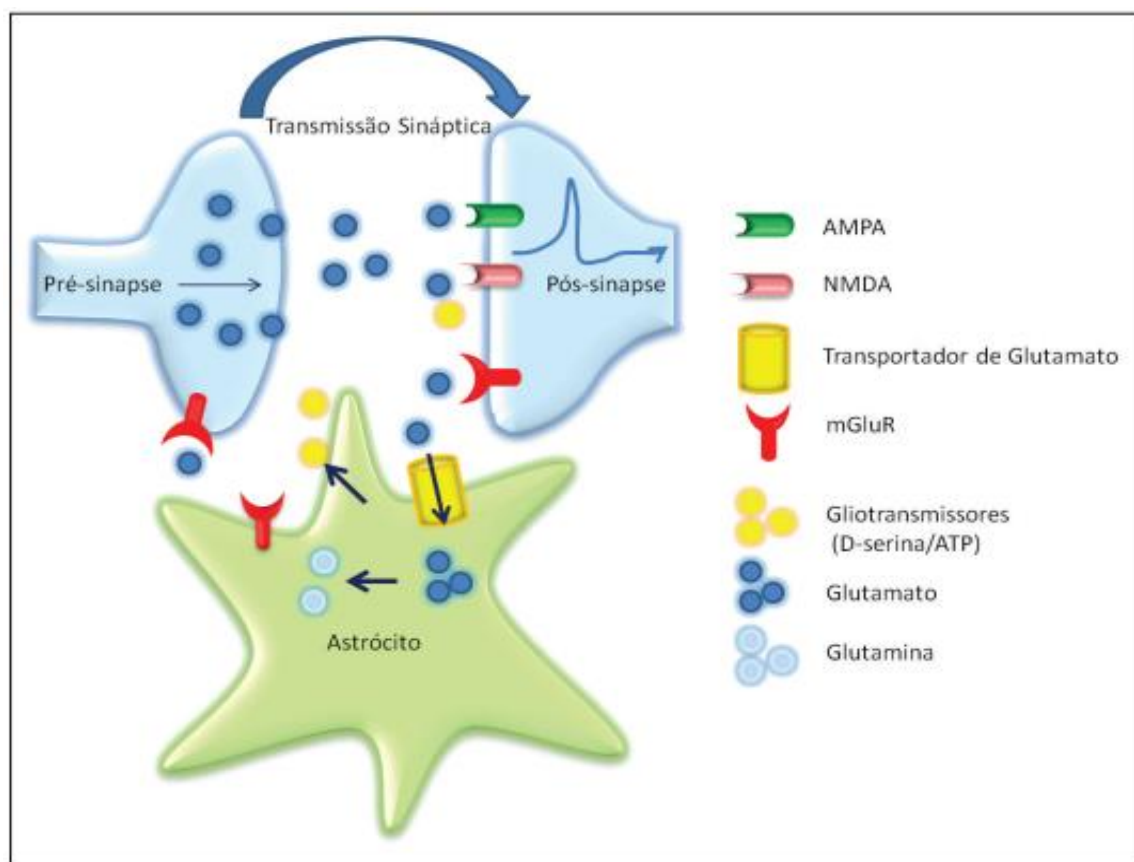


Figura 3 – Estrutura de uma sinapse: Neurônios pré e pós-sinápticos em azul e astrócito em verde. Fonte: GOMES et al., 2013.

### 1.5.1 Sistema glutamatérgico, memória e acidente vascular encefálico

O glutamato está envolvido em vários aspectos funcionais no cérebro, incluindo memória e aprendizado (DANBOLT, 2001). O processo de memória e aprendizado envolve a modulação da excitabilidade neuronal. Certos eventos na formação da memória prolongam ou reduzem a capacidade de resposta excitatória.

Existem pontos comuns entre os mecanismos de aprendizado, memória e recuperação de um AVE. Em nível neuropsicológico, envolvem características semelhantes como não aprendizado, ação de massa, interferência contextual e prática distribuída (KRAKAUER, 2006). Também ocorrem alterações semelhantes de imagem cerebral, nas quais uma rede inicialmente difusa de áreas cerebrais é canalizada com aprendizado, treinamento e recuperação, conjunto principal diretamente envolvido na tarefa. Em nível celular, os processos de formação de memória e mudanças pós-AVE estão associados a fenômenos como a potenciação



de longo prazo e à morfogênese da coluna dendrítica. Em nível molecular, os padrões de aprendizado e memória estão associados a mudanças de expressão em estatiminas e GAP-43, além do sistema de sinalização Nogo, onde essas mesmas vias moleculares estão envolvidas na recuperação do AVE (CARMICHAEL, 2012, 2016). A propriedade emergente no reparo neural após AVE é que os sistemas moleculares que medeiam a plasticidade sináptica incluída à aprendizagem e à memória estejam unidos para produzir a recuperação da função.

Estudos sobre reparo neuronal após AVE em roedores tem identificado diferentes tipos de reorganização no tecido lesado. Em um AVEI experimental no córtex cerebral, por exemplo, ocorre rápida plasticidade na ativação funcional, embora os animais apresentem perda sensorimotora por algumas semanas (MURPHY e CORBETT, 2009). Logo após um AVE, a resposta de movimento para o membro afetado é transferida para o hemisfério sadio. Após algumas semanas, a região lesada restabelece a conexão a partir do remapeamento (CRAMER, 2008).

Pesquisas com modelos murinos em AVE tem focado em tratamentos com antagonistas do glutamato na tentativa de diminuir o tamanho de infarto e melhorar a recuperação funcional dos animais. O transportador glutamatérgico vesicular (VGLUT1) está associado a plasticidade sináptica, como a potenciação de longo prazo, enquanto o VGLUT2 é expresso principalmente em vias sensoriais e autonômicas (VAROQUI et al., 2002).

Por outro lado, o receptor N-metil-D-aspartato (RNMDA) está relacionado a vários processos neurodegenerativos, inclusive em lesões encefálicas agudas, como em AVE e trauma. Várias evidências têm sido verificadas envolvendo RNMDA e excitotoxicidade em AVE. Em estudo pioneiro, Jorgensen e Diemer (1982) perceberam um padrão semelhante de neurodegeneração tanto em ratos isquêmicos quanto em animais tratados sistemicamente com glutamato monossódico. Trabalhos subsequentes demonstraram aumento das concentrações de glutamato extracelular pós-AVEI medidas por microdiálise (GLOBUS et al., 1988). O aumento das concentrações de glutamato foi observado no estriado, hipocampo, córtex e tálamo, entretanto, somente o hipocampo sofreu dano pela isquemia global transitória (GLOBUS et al., 1990). Em modelos isquêmicos focais também foi observado padrão semelhante de elevação de glutamato extracelular (HILLERED et al., 1989).

Estudos demonstraram neuroproteção após lesão isquêmica através de antagonismo dos receptores de glutamato. Tanto os antagonistas de NMDA competitivos como os não competitivos foram eficazes em modelos focais de isquemia, entretanto, apresentaram pouco efeito em modelos globais de isquemia, onde os antagonistas não-NMDA pareceram ser mais eficazes. Contudo, receptores de glutamato metabotrópicos também foram verificados na patogênese da isquemia global. Os antagonistas do grupo I (mGluR1 e mGluR5) e os agonistas do grupo II (mGluR2 e mGluR3) demonstraram neuroproteção em gerbilos induzidos à isquemia global transitória (KINGSTON et al., 1999).

Paradoxalmente, enquanto o glutamato é indispensável como um importante neurotransmissor, envolvido na em muitos aspectos das funções cerebrais, também é altamente tóxico como uma excitotoxina endógena. A ativação excessiva de GluRs ocasionada por enfermidades agudas, como no AVE, leva à morte uma grande quantidade de neurônios, embora esses receptores estejam intimamente envolvidos fisiologicamente a funções cerebrais (SUNDARAM et al., 2012).

### *1.5.2 Sistema glutamatérgico e derivados da guanina*

Os efeitos extracelulares das purinas derivadas da guanina foram demonstrados principalmente no SNC e estão relacionados ao sistema glutamatérgico, principal sistema de neurotransmissão excitatória no cérebro (MELDRUM, 1994). Como já comentado em tópicos anteriores, o glutamato exerce efeitos fisiológicos essenciais ao SNC, mas também pode atuar como uma toxina endógena após liberação excessiva na fenda sináptica (excitotoxicidade). A toxicidade ocorre através da ativação dos iGluRs e mGluRs, entretanto, o bloqueio completo da atividade desses receptores não é benéfico para as células. Desse modo, torna-se de fundamental importância que moduladores glutamatérgicos possam atuar na neuroproteção sem inibir a função fisiológica do glutamato. Assim, as purinas derivadas da guanina destacam-se como moduladores endógenos na transmissão glutamatérgica, interagindo benéficamente com receptores e transportadores de glutamato (IKONOMIDOU e TURSKI, 2002).

Estudos realizados por diferentes grupos de pesquisa (SHARIF e ROBERTS, 1981; BUTCHER et al., 1986; MONAHAN et al., 1988; BARON et al., 1989; HOOD et

al., 1990; PAAS et al., 1996) demonstraram que os compostos derivados da guanina deslocaram a ligação do glutamato e análogos em preparações de membranas celulares. Trabalhos realizados pelos grupos de pesquisa de Ramirez G. e Souza D. O. também foram fundamentais para demonstrar que esse efeito dos derivados da guanina foi independente da interação das proteínas G ou sua capacidade de reduzir a ligação agonista aos receptores acoplados a proteína G quando há interação com essas proteínas (SOUZA e RAMIREZ, 1991; PAZ et al., 1994; RAMOS et al., 1997; PORCIÚNCULA et al., 2002; ROTTA et al., 2004). Ainda, esses estudos podem ser confirmados pelo fato de que o GMP (que não se liga às proteínas G) diminui a ligação do glutamato a mGluRs e iGluRs, por estes também não interagirem com as proteínas G (BURGOS et al., 1998, 2000; ALEU et al., 1999; TASCA et al., 1999a; TASCA e SOUZA, 2000a). Ademais, além de os derivados da guanina se ligarem aos receptores do glutamato, também aboliram várias respostas celulares induzidas pelo glutamato, tanto em situações fisiológicas como patológicas (TASCA et al., 1995, 1998, 1999a, 1999b; REGNER et al., 1998; BURGOS et al., 2000a; TASCA e SOUZA, 2000a). Uemura e colaboradores (1991) demonstraram que os nucleosídeos de purina são liberados após indução isquêmica cerebral e seus níveis mantêm-se elevados de 2 horas a 7 dias no tecido. Níveis extracelulares de derivados da guanina também foram encontrados em amostras de líquido em humanos (REGNER et al., 1997). Estas descobertas sugerem que os derivados da guanina podem representar um sistema restaurador endógeno ativado após um insulto.

#### 1.5.2.1 Efeitos da guanosina *in vivo*

A guanosina é um nucleosídeo derivado da guanina, que atua como um sistema endógeno neuroprotetor. Sua administração sistêmica atinge todos os sistemas, entretanto, vários estudos sobre seu metabolismo confirmam a rápida conversão em guanina, questionando-se se a real atividade biológica é diretamente da guanosina (JIANG et al., 2008a, 2008b; GIULIANI et al., 2012). Contudo, ainda não existem estudos sobre o efeito neuroprotetor da guanina, mas um estudo *in vitro* mostrou que o tratamento com guanosina aumentou a proliferação celular de células-tronco neurais, sugerindo que a guanosina é uma molécula bioativa (SU et al., 2013).

Devido ao rápido metabolismo das purinas, vários estudos procuram determinar se as propriedades neuroprotetoras são realmente da guanosina ou são de seus metabólitos. Como já observado, os níveis plasmáticos de guanosina aumentam de maneira dose-dependente e dependente do tempo após a administração sistêmica (GIULIANI et al., 2012).

Experimentos já conformaram que a concentração plasmática basal da guanosina pode dobrar 90 minutos após a injeção intraperitoneal deste nucleosídeo, obtendo níveis plasmáticos máximos de seus metabólitos (guanina, xantina e ácido úrico) detectados 15 a 30 minutos após a administração (JIANG et al., 2008a). Também foi observado que os níveis desses metabólitos permanecem constantes por até 3 horas após o tratamento, por isso acredita-se que esse nucleosídeo tenha uma meia-vida prolongada no meio extracelular (CICCARELLI et al., 2001). Além disso, a guanosina mostrou-se amplamente distribuída nos tecidos após a administração sistêmica, atingindo o SNC em 7,5 minutos (JIANG et al., 2008a; GIULIANI et al., 2012). Após administração por via oral, também foi observado aumento dose-dependente das concentrações de guanosina e seus metabólitos no líquido (SCHMIDT et al., 2010b; VINADE et al., 2005). Desse modo, pode-se inferir que a guanosina pode ser absorvida por transportadores de nucleosídeos (PENG et al., 2005; NAGASAWA et al., 2007) e distribuídos em células intestinais, vasos cerebrais e na BHE (PATIL e UNADKAT, 1997).

Embora a guanosina seja bastante pesquisada por vários grupos mundialmente, ainda não foi estabelecido o receptor celular para este nucleosídeo. Contudo, locais de ligação seletiva já foram demonstrados em membranas cerebrais de ratos (TRAVERSA et al., 2002, 2003). Estudos apontam para a existência de um suposto receptor de guanosina seletivo em membranas cerebrais de ratos, apesar de essa proteína ainda não ter sido sequenciada, isolada e clonada. Atualmente, o GPR23 é um receptor sugerido para a guanosina (DI LIBERTO et al., 2012).

O efeito neuroprotetor da guanosina foi avaliado em vários modelos de AVEI. O tratamento com guanosina em um modelo perinatal de hipóxia-isquemia em ratos resultou no aumento da captação de glutamato (MORETTO et al., 2005, 2009). Além disso, diferentes protocolos de tratamento com guanosina protegeram ratos adultos de danos neurológicos após indução isquêmica por oclusão unilateral da artéria cerebral média (MCAO), recuperando parcialmente a marcha e reduzindo o volume de infarto (CHANG et al., 2008; RATHBONE et al., 2011; CONNELL et al., 2013).

Ganzella e colaboradores (2012) descobriram que o tratamento por via oral com guanosina pode reverter a perda de neurônios e aumentar a expressão de GFAP na região CA1 do hipocampo, em um modelo de AVEI permanente por oclusão bilateral das carótidas em ratos adultos. Contudo, o tratamento não teve efeito sobre a cognição.

Em estudos utilizando ratos submetidos ao AVEI cortical focal permanente induzido por termocoagulação houve neuroproteção pela guanosina. Os experimentos demonstraram que os animais recuperaram parcialmente a função sensorimotora do membro afetado, houve redução o volume de infarto, redução da degeneração neuronal, prevenção do aumento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERN), aumento a função e expressão de defesas antioxidantes celulares (glutathiona e superóxido dismutase) e redução na ativação da microglia, resultando na diminuição da inflamação (HANSEL et al., 2014, 2015).

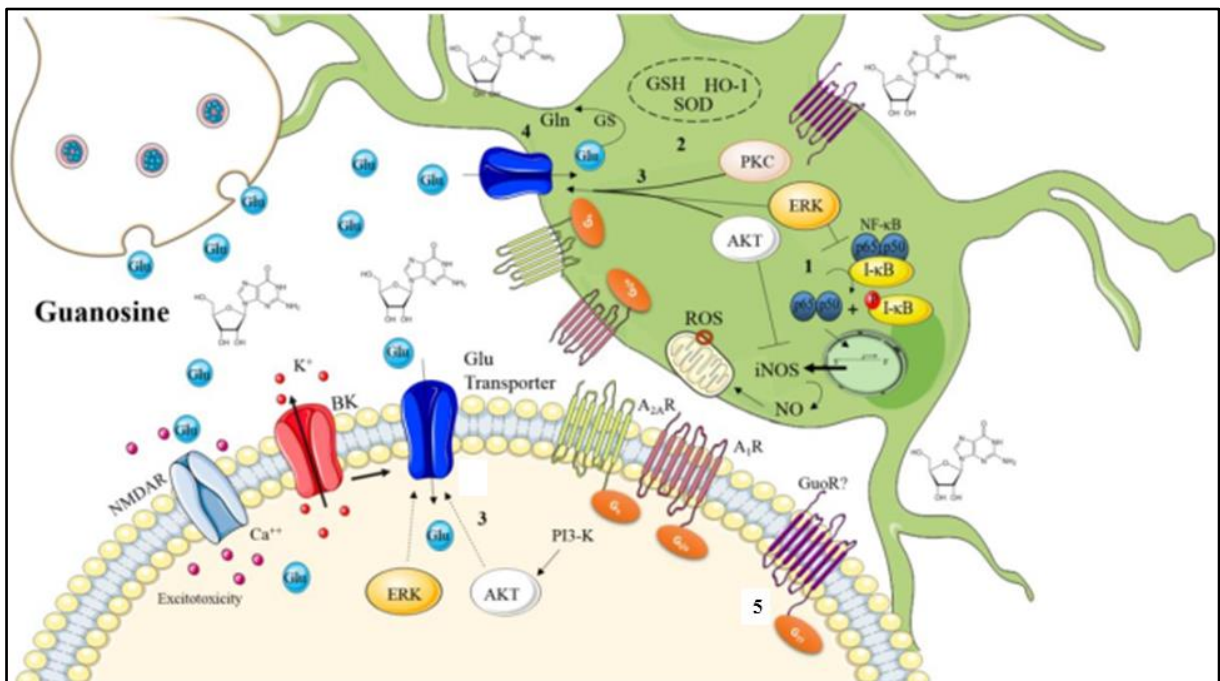
A ação neuroprotetora da guanosina também foi relatada em outras desordens neurodegenerativas, como em crises convulsivas agindo como anticonvulsivante (SCHMIDT et al., 2000; SOARES et al., 2004; TAVARES et al., 2005, 2008; TORRES et al., 2010), em modelo de doença de Parkinson diminuindo a bradicinesia (SU et al., 2009; CHEN et al., 2015), em modelo de encefalopatia hepática diminuindo os níveis de glutamato no líquido devido à elevação da amônia (ALBRECHT e JONES, 1999; PANIZ et al., 2014), em modelo de indução de sepse diminuindo a peroxidação lipídica no cérebro (PETRONILHO et al., 2012). Ainda, pesquisas em desordens psiquiátricas também tem sido documentadas. A guanosina promoveu comportamento ansiolítico (VINADÉ et al., 2003; ALMEIDA et al., 2016) e antidepressivo (NETO et al., 2011; BETTIO et al., 2012; MILLER e HEN, 2015) em modelos de ansiedade e depressão, respectivamente, desenvolvidos em ratos e camundongos. Alguns dos efeitos terapêuticos da guanosina se devem às suas ações tróficas, pois estudos indicam que a guanosina induziu aumento na proliferação celular e na neurogênese (GAGE et al., 1998, 2000; ZHAO et al., 2008; SU et al., 2009). Por fim, o efeito antinociceptivo guanosina foi demonstrado em modelos de dor neuropática em ratos e camundongos, reduzindo a hiperalgesia e déficit motor (SCHMIDT et al., 2010a, 2010b; GUNN et al., 2011).

A guanosina, desde o princípio dos experimentos, apresentou efeitos benéficos em muitos modelos *in vitro* e *in vivo* de doenças e insultos cerebrais associados ao desequilíbrio do sistema glutamatérgico. Os estudos já publicados

descrevem a guanosina como uma droga segura, uma vez que não há evidência de toxicidade após administrada alta dose exógena. Estudos sobre os efeitos cardiorrenais da guanosina têm sido conduzidos, mostrando a capacidade anti-inflamatória vascular com mínimo efeito sobre a pressão arterial ou fluxo sanguíneo renal (JACKSON e MI, 2014).

Até os dias atuais, não há tratamento efetivo para AVEI em humanos, pois a variabilidade de resposta individual ao tratamento disponível é grande (DURUKAN e TATLISUMAK, 2007). Contudo, de acordo com resultados obtidos em modelos de AVEI em roedores, a guanosina mostrou-se eficaz durante a janela de oportunidade de tratamento (MORETTO et al., 2009).

Todos esses estudos sugerem que a guanosina é uma provável estratégia de tratamento para a clínica humana, entretanto, mais estudos específicos devem ser conduzidos sobre os mecanismos farmacocinético e farmacodinâmico deste nucleosídeo (BETTIO et al., 2016). A Figura 4 demonstra os mecanismos envolvidos nos efeitos neuroprotetores da guanosina.



**Figura 4 – Mecanismos envolvidos nos efeitos neuroprotetores da guanosina. (1) Redução dos níveis de EROs através da inibição do NF-κB, ativação da via MAPK/ERK e prevenindo a indução de iNOS; (2) Aumento das defesas antioxidantes; (3) Ativação das vias PI3K/Akt, PKC e MAPK/ERK leva a ativação dos transportadores de glutamato; (4) Recupera e funcionalidade dos transportadores de glutamato e aumenta a atividade da GS, protegendo contra a excitotoxicidade; (5) O local específico de ligação para a guanosina foi identificado como GPCR (GRILLO et al., 2012), entretanto, seu receptor ainda não está caracterizado. Imagem adaptada de LANZMASTER et al., 2016.**

## **1.6 Memória**

### *1.6.1 Breves conceitos dos tipos de memória*

A memória pode ser definida como o processo cognitivo que inclui, consolida e recupera toda a informação que aprendemos (LURIA, 1981). As memórias podem ser divididas, classicamente, de acordo com o tempo de retenção ou armazenamento de informação em (Figura 5):

1) Sensorial (visão, audição, olfato, tato e paladar – na ordem de milissegundos);

2) De curto prazo (armazenamento temporário – segundos a poucos minutos - de poucas informações advindas da memória sensorial ou da memória de longo prazo; processos bioquímicos rápidos no hipocampo e córtex entorrinal). A memória de trabalho ou operacional também faz parte deste grupo e subdivide-se em: a) alça fonológica (armazenamento temporário e manipulação das informações verbais); b) esboço visuoespacial (armazenamento e manipulação visual e espacial); c) retentor episódico (recupera a informação de forma consciente e trabalha as atividades cognitivas mais complexas); d) executivo central (sistema atencional que atua na seleção e manipulação da informação nos outros subsistemas, age como um controlador buscando informações já armazenadas na memória de longo prazo) (BADDELEY, 2000, 2002, 2003, 2007, 2009). Funcionalmente, a memória de trabalho pode ser comparada a memória RAM de um computador, ou seja, mantém a informação “fresca” durante segundos a poucos minutos, enquanto ela está sendo percebida ou processada (KANDEL, 2012).

3) De longo prazo (armazena informações por longos períodos – minutos, horas, dias, semanas, meses, anos; requer processos bioquímicos lentos e mais complexos no hipocampo, núcleos amigdalinos e outras áreas) (NADEL et al., 2000; IZQUIERDO, 2011). Este grupo subdivide-se em memória declarativa ou explícita e memória não declarativa ou implícita. A memória explícita depende de processos conscientes e é passível de verbalização. Subdivide-se em episódica (experiências de vida, relacionada ao hipocampo) (LOMBROSO, 2004; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2006) e semântica (conhecimentos gerais, conceitos e teorias, estruturas neocorticais anteriores e posteriores) (MOSCOVITCH et al., 2005). A memória implícita não depende de processos conscientes e é de difícil verbalização. Envolve

procedimentos, habilidades motoras e hábitos. Sua ativação está relacionada ao processamento motor, como núcleos da base, estriado, cerebelo, córtex motor e córtex pré-motor (DIAS e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2011).

O hipocampo é a principal estrutura na formação de memórias explícitas, incluindo o córtex entorrinal, o núcleo da amígdala e outras áreas corticais distantes. Todas estas estruturas recebem vias nervosas (dopaminérgica, noradrenérgica, serotoninérgica, colinérgica) vinculadas ao afeto, estados de consciência, diferentes graus de alerta, ansiedade ou estresse. O processo de formação e consolidação das memórias de longa duração é lento, pois consiste de muitas etapas e qualquer uma delas pode falhar. Ademais, estas etapas podem sofrer modulações bioquímicas levando a exacerbação ou inibição da formação de memória (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO et al., 2002; WU et al., 2014).

O processamento da memória de curta duração é paralelo ao das memórias de longa duração, ocorrendo também no hipocampo e córtex entorrinal. Este fato trouxe implicações clínicas importantes, pois pacientes diagnosticados com patologias psiquiátricas, tumores ou lesões de lobo temporal apresentam principalmente falha na memória de curta duração (IZQUIERDO et al., 2013).

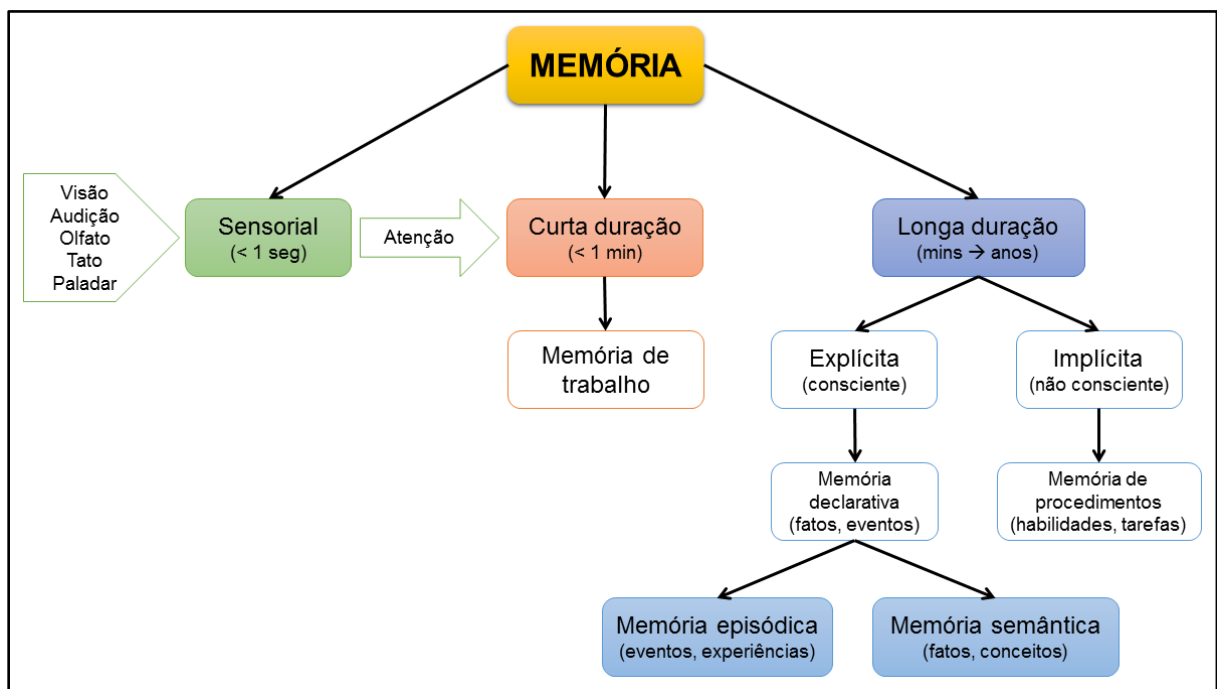


Figura 5 – Tipos de memória. Adaptado de <http://www.human-memory.net/types.html>



### *1.6.2 Acidente vascular encefálico e memória*

Após um AVE geralmente ocorre comprometimento da memória, que pode persistir por vários anos (LINCOLN et al., 2011; SCHAAPSMEERDERS et al., 2013). Em uma revisão sistemática, Snaphaan e Leeuw (2007) estimaram que entre 23 e 55% dos pacientes acometidos por AVE apresentaram comprometimento da memória após três meses e, de 11 a 31%, após um ano. Dados revisados sobre as queixas cognitivas relatadas por pacientes pós-AVE indicaram que muitos possuem problemas de memória na vida diária (VAN RIJSBERGEN et al., 2014) e a perda de memória é a queixa mais frequente comparada a outros comprometimentos cognitivos (LAMB et al., 2013).

A perda de memória ocorre como resultado da perda de células nervosas no cérebro. Quando a perda de memória é severa e interfere nas atividades do dia-a-dia passa a se chamar demência. A demência pós AVE é chamada demência vascular ou prejuízo cognitivo vascular, em que os portadores apresentam dificuldade na aprendizagem e na recordação, ou seja, esquecem nomes, lugares familiares e vocabulário (NOVITZKE e QURESHI, 2008). A frequência de comprometimento cognitivo após um AVE muda de acordo com a região encefálica afetada (Tabela 1).

Pesquisas mostraram que no Reino Unido e Suécia, a prevalência de comprometimento cognitivo logo após AVE foi de 96% e três meses após, variou de 24 a 39% (GUTIÉRREZ et al., 2011; DOUIRI et al., 2013). Na Noruega e na França a mesma prevalência pós lesão foi de 57% e 47,3%, respectivamente (IHLEHANSEN et al., 2011; JACQUIN et al., 2014). Nos estudos de Salihović e colaboradores (2018) a frequência de comprometimento cognitivo na Bósnia e Herzegovina foi de 69%, muito próxima comparada aos outros estudos. Um estudo de acompanhamento pós AVEI (durante, aproximadamente, 11 anos) realizado na Holanda, com 277 pacientes jovens adultos (18 a 50 anos de idade, com 55% de mulheres), demonstrou diminuição no funcionamento cognitivo (SCHAAPSMEERDERS et al., 2013). Entretanto, o longo acompanhamento pode estar associado a comorbidades neurológicas, que afetam negativamente o desempenho cognitivo (VAN NORDEN et al., 2012). Todos os estudos sugerem que as síndromes cognitivas são comuns após um AVE.

Tabela 1 – Ações e consequências pós-AVE de acordo com a região encefálica afetada.

<i>Regiões do cérebro</i>	<i>Ação</i>	<i>Consequência pós-AVE</i>
<b>Lobo frontal</b>	Atenção; emoções, controle sexual e social; tomada de decisões; movimentos voluntários; verbalização; cheiro	Mudança de comportamento social; perda do movimento delicado; perda da força nos braços, mãos e dedos; perda de expressão facial; dificuldade na fala
<b>Lobo parietal</b>	Habilidade acadêmica; nome de objetos; toque, cheiro (direito)/ organização, linguagem (esquerdo); coordenação sensorio-motora dos olhos e mãos	Dificuldade em interpretar informações visuais como comprimento, tamanho e profundidade; incoordenação de olhos e mãos; perda sensorial (tato); confusão direita-esquerda; dificuldade de ler, escrever e calcular
<b>Lobo temporal</b>	Compreensão da linguagem; audição; memória; reconhecimento facial; comportamento	Incapacidade de entender a linguagem falada (dificuldade de encontrar palavras e formar frases); perda auditiva; dificuldade em reconhecer sons e vozes; sons distorcidos; perda de memória de curto e longo prazo; comportamento agressivo; sexualidade exacerbada; distúrbios no olfato e paladar
<b>Lobo occipital</b>	Visual	Hemianopsia; quadrantanopia; escotoma; perda de sensibilidade da córnea; agnosia; cegueira
<b>Cerebelo</b>	Equilíbrio; controle postural; coordenação; movimento	Perda do balanço e coordenação; tontura, náusea, emese, ataxia
<b>Tronco encefálico</b>	Funções vitais (sistema nervoso autônomo, regulação do sono, excitação, ingestão de alimentos e fluidos); equilíbrio e movimento	Diminuição da capacidade vital da respiração, leva a dificuldades de fala; dificuldades na organização e percepção do ambiente; problemas no equilíbrio e movimento; paralisia, hemiplegia, disfagia

Fonte: Adaptado de CHELLAPPAN et al., 2012.

Muitos estudos clínico-patológicos citam que volumes maiores de lesão (TOMLINSON et al., 1970; SCHNEIDER et al., 2003) e grande número de áreas isquêmicas macroscópicas (NEUROPATHOLOGY, 2001; SCHNEIDER et al., 2003; WHITE et al., 2005; SONNEN et al., 2007) estão associados ao aumento da probabilidade de demência pós-AVEI. Contudo, o diagnóstico através da

determinação do volume ou número de infartos necessários para que ocorra comprometimento cognitivo vascular ou demência tem se mostrado difícil, pois, diferentemente da doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas, não existem critérios neuropatológicos aceitos para confirmar tal diagnóstico clínico. Pesquisas mostraram uma relação inconsistente entre volume e número de infartos e comprometimento cognitivo vascular (VINTERS et al., 2000; WHITE et al., 2005). Estas inconsistências podem estar mais relacionadas ao local do que ao volume de infarto. No entanto, esses fatores não foram claramente definidos e diversos relatos de AVEI corticais (SCHNEIDER et al., 2003; WHITE et al., 2005; SONNEN et al., 2007) e sub corticais (SNOWDON et al., 1997; VINTERS et al., 2000; WHITE et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2007) foram relacionados à demência.

Além de desafiar essas relações, alguns estudos sugerem que múltiplos micro infartos possam estar relacionados à demência, denotando um fenômeno mais generalizado, como hipóxia difusa, inflamação, estresse oxidativo e/ou ruptura da barreira hematoencefálica (WHITE et al., 2005; SONNEN et al., 2007). Outros fatores que determinam se os infartos estão relacionados ao comprometimento cognitivo vascular incluem variação na reserva cognitiva (ELKINS et al., 2006) e outras patologias coexistentes.

Em uma recente revisão sobre a recuperação da memória pós-AVE, das Nair e colaboradores (2016) concluem que muitos pacientes sofrem perda de memória após um AVE e, embora existam centros de reabilitação com várias formas de intervenções para melhorar a vida desses indivíduos, os programas de tratamento não são totalmente eficientes. Contudo, quando os autores compararam os pacientes tratados e não tratados, a reabilitação da memória foi realmente mais eficaz no grupo tratado.

## **2 OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo geral***

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito da guanosina em ratos Wistar fêmeas e machos induzidos cirurgicamente a um modelo de isquemia cerebral cortical focal permanente.

### ***2.2 Objetivos específicos***

Avaliar os efeitos da guanosina em fêmeas e machos, isquêmicos e naïves sobre:

- A recuperação sensorimotora;
- As memórias de curto e longo prazo;
- A ansiedade a longo prazo;
- A astrogliose reativa a longo prazo;
- O volume de lesão após 48 horas de indução isquêmica;
- O ciclo estral em fêmeas, avaliado imediatamente antes da cirurgia.

## **PARTE II**

Nesta parte serão apresentados a metodologia e os resultados na forma de um artigo científico publicado no periódico *Neurochemical Research*, seguido de dados complementares não publicados.

**Capítulo 1:** *Neuroprotective Effects of Guanosine Administration on In Vivo Cortical Focal Ischemia in Female and Male Wistar Rats.*



## Neuroprotective Effects of Guanosine Administration on In Vivo Cortical Focal Ischemia in Female and Male Wistar Rats

Luciele Varaschini Teixeira<sup>1</sup> · Roberto Farina Almeida<sup>1</sup> · Francieli Rohden<sup>1</sup> · Leo Anderson Meira Martins<sup>1</sup> · Poli Mara Spritzer<sup>2</sup> · Diogo Onofre Gomes de Souza<sup>1</sup>

Received: 31 January 2018 / Revised: 23 May 2018 / Accepted: 26 May 2018  
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

### Abstract

Guanosine (GUO) has neuroprotective effects in experimental models of brain diseases involving glutamatergic excitotoxicity in male animals; however, its effects in female animals are poorly understood. Thus, we investigated the influence of gender and GUO treatment in adult male and female Wistar rats submitted to focal permanent cerebral ischemia in the motor cortex brain. Female rats were subdivided into non-estrogenic and estrogenic phase groups by estrous cycle verification. Immediately after surgeries, the ischemic animals were treated with GUO or a saline solution. Open field and elevated plus maze tasks were conducted with ischemic and naïve animals. Cylinder task, immunohistochemistry and infarct volume analyses were conducted only with ischemic animals. Female GUO groups achieved a full recovery of the forelimb symmetry at 28–35 days after the insult, while male GUO groups only partially recovered at 42 days, in the final evaluation. The ischemic insult affected long-term memory habituation to novelty only in female groups. Anxiety-like behavior, astrocyte morphology and infarct volume were not affected. Regardless the estrous cycle, the ischemic injury affected differently female and male animals. Thus, this study points that GUO is a potential neuroprotective compound in experimental stroke and that more studies, considering the estrous cycle, with both genders are recommended in future investigation concerning brain diseases.

**Keywords** Ischemic stroke · Female · Estrous cycle · Symmetry · Open field test · Immunohistochemistry

### Introduction

Stroke is the second most common cause of death and disability worldwide [1]. The ischemic stroke is characterized by a transient or permanent reduction in the cerebral blood flow. The ischemic core is surrounded by the penumbra zone, which is a region composed by normal and functionally impaired cells tangled in diverse degrees [2–4]. Thus, the penumbra zone has been increasingly considered in

studies searching brain targets for prevention/treatment of acute brain ischemia [5–7].

Release of the affected cells content is harmful to the brain. When glutamate, the main excitatory neurotransmitter in mammalian brains, is released by damaged cells, its excessive levels in the synaptic cleft of the penumbra zone, leads to toxic overstimulation of glutamate receptors. This overstimulation, known as excitotoxicity, massively generates free radical species and extensively injures the cerebral tissue [2, 3, 8].

Guanosine is an endogenous guanine-based nucleoside. Intracellularly, GUO is a relevant regulatory and structural molecule [9]. Additionally, it has been shown that GUO acts as a neuroprotective agent against experimental models of brain diseases involving glutamatergic excitotoxicity [10–13], like ischemic stroke [14], oxidative stress [15], hepatic encephalopathy [16, 17], and anxiety [18].

Experiments using rodents as animal models are predominantly performed with male animals, even when the objective of the studies is to evaluate a specific condition in females [19]. Indeed, specific mechanisms underlying sexual dimorphism

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2562-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Luciele Varaschini Teixeira  
[luciele.sm@gmail.com](mailto:luciele.sm@gmail.com)

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Department of Physiology, Laboratory of Molecular Endocrinology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

in brain injuries, which have been studied for some decades, remain elusive [20].

Sex differences in stroke risk and outcomes have been well documented [21], such as the later age of stroke incidence in women versus men [22, 23]. However, while evidence suggests an association between estrogens and neuroprotection in younger women, mechanistic interpretation of a neuroprotective role performed by ovarian steroids is still not well-established [24–27].

In vitro and in vivo studies have shown that ovarian hormones exert direct protective actions on neuron-glia cells, by acting on the neurovascular unit, regulating reactive gliosis and neuroinflammation, and even modifying neurogenesis [26–35]. However, most of these in vivo studies compare sex-hormone vs. placebo treatments in male or ovariectomized female animals. In turn, few data are available concerning female animals with normal estrogen levels during the estrous cycle [36].

The female gonadal hormones regulate astrogliosis depending on the affected region of the central nervous system (CNS) and the pathological condition, increasing or decreasing the number, shape, and size of astrocytes. Estradiol, for example, decreases astrocyte proliferation in the cerebral cortex and hippocampus after stabbing wound injuries [37–39]. Reactive astrogliosis is characterized by an increased number and shaping of astrocytes, especially those with branched morphology (ramified astrocytes). It may occur after an ischemic brain lesion and may be implicated in the brain recovery and animal behavioural performance [40].

The astrocytes are multiple functional cells, which constantly adapt to gene expression and cellular morphology, depending on the cellular context and the insult severity [41–43]. Astrocyte reactivity is characterized by cell proliferation and morphological changes. This is a common parameter for many pathological situations, including brain trauma and ischemia. Compared to non-reactive astrocytes, reactive astrocytes show an altered phenotype characterized by the hypertrophy of cellular processes, providing a more branched—or stellated—appearance to these cells [40].

The effects of GUO in female rats and the long-term recovery after brain injury in both sexes have not yet been investigated. Thus, we aimed to investigate the influence of gender, including the female estrous cycle, and GUO treatment in adult male and female Wistar rats submitted to a model of focal permanent ischemia in the motor cortex brain.

## Materials and Methods

### Animals

Adult female and male Wistar rats 90–120 days old, with a body weight 200–350 g (females) and 250–400 g (males)

were used in our experiment. The animals were maintained under controlled light (12/12 h light–dark cycle) and environmental conditions (temperature  $22 \pm 2$  °C) with water and commercial food supply ad libitum. All procedures were performed according to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for Animal Care. The project was approved by the Ethical Committee in the Use of Animals from the Federal University of Rio Grande do Sul (process number 29,396). In all procedures, the number of animals used, and their suffering were minimized. The schematic procedures are depicted in Fig. 1.

### Estrous Cycle Stage

Before the ischemic brain surgical injury, the estrous cycle was checked in all female rats by vaginal lavage. Approximately 20  $\mu$ L of saline solution were inserted into the rat vagina with a disposable pipette, and immediately removed with the same pipette and placed on a slide for subsequent optical microscope analysis. The estrous cycle phase was determined by cytology analysis. The female groups were divided into estrogenic (proestrous and estrous) and non-estrogenic (metaestrous and diestrous) phases [44, 45].

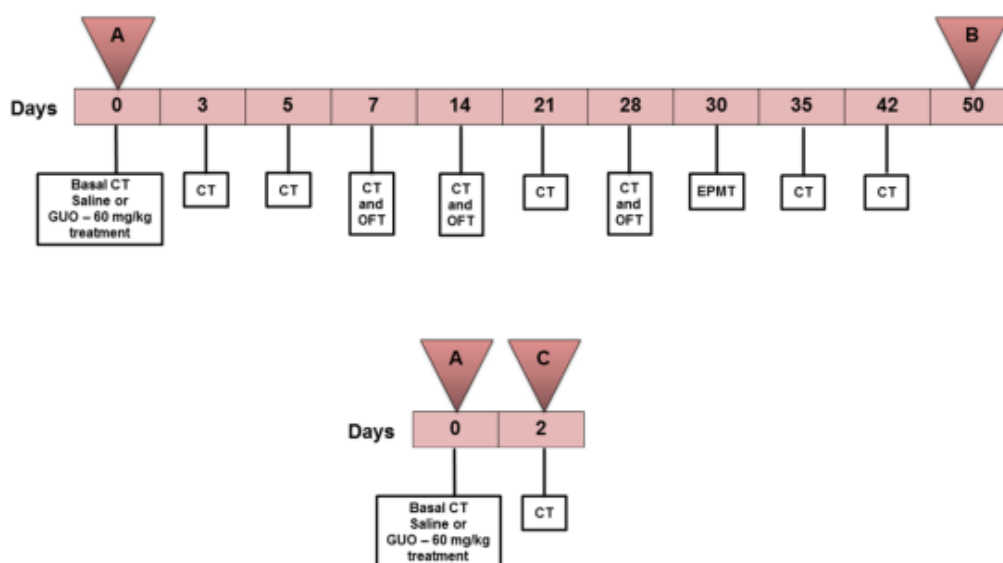
### Permanent Focal Ischemia Surgery

The animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (90 mg/kg, i.p.) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, i.p.), and placed in a stereotaxic apparatus. After skin incision, the skull was exposed, and a craniotomy was performed by exposing the left frontoparietal cortex (+2 to –6 mm A.P., and –2 to –4 mm M.L. from the bregma). An ischemic lesion was induced by thermocoagulation in motor and sensorimotor pial vessels [14]. Blood vessels were thermocoagulated by approximating a hot probe to the dura mater for 2 min, time required for the verification of the red-brown color, indicating complete thermocoagulation. Soon after, the skin was sutured, and each animal was rewarmed to 37 °C using a heating pad and accompanied until recovery from the anesthesia.

### Animal Groups and Drug Treatment

The animals were subdivided into 12 groups, as follows: Female naïve non-estrogenic (F-NE); Female naïve estrogenic (F-E); Male naïve (M); Female naïve non-estrogenic GUO (F-NE-GUO); Female naïve estrogenic GUO (F-E-GUO); Male naïve GUO (M-GUO); Female ischemic non-estrogenic (F-ISC-NE); Female ischemic estrogenic (F-ISC-E); Male ischemic (M-ISC); Female ischemic non-estrogenic GUO (F-ISC-NE-GUO); Female ischemic estrogenic GUO (F-ISC-E-GUO); and Male ischemic GUO





**Fig. 1** Experimental scheme. **a** Ischemic surgery. Female animals were subdivided into non-estrogenic and estrogenic groups. All animals received guanosine—GUO (60 mg/kg, i.p., 4 times) or saline after surgery. **b** Euthanasia and samples collection for subsequent

immunohistochemistry analyses. **c** Euthanasia and samples collection for subsequent infarct volume measures. *CT* cylinder task; *OFT* open field task; *EPMT* elevated plus maze task

(M-ISC-GUO). GUO (added as 60 mg/kg in NaCl 0.9%) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The GUO dose was chosen according to a dose–response curve previously established by our group [14], which was here firstly used in studies with female rats. Thus, all groups received 1 mL/kg, i.p. administration of saline solution or GUO in 4 times: 0, 1, 3, and 6 hs after the surgery.

### Cylinder Task (CT)

This task is a consolidated tool for neurological evaluation consequences of focal ischemia. CT evaluates the forelimb preference when the animal rears to explore the environment by making forelimb contact with a cylinder wall (20 movements). The apparatus consisted of a transparent glass cylinder with 20 cm diameter  $\times$  30 cm height. The task was performed before the ischemic surgery to verify the basal forelimb symmetry of animals. The CT was repeated at the 3rd, 5th, 7th, 14th, 21st, 28th, 35th, and 42nd days after surgery. The ipsilateral (to the lesion), contralateral or both forelimbs preference was counted. The asymmetry of each animal was calculated by the formula:  $\text{asymmetry} = (\% \text{ of ipsilateral use paw}) - (\% \text{ of contralateral use paw})$ . Then, the asymmetry percentage was converted in a symmetry percentage ( $100 - \% \text{ asymmetry}$ ) [46]. At the end of each task, the apparatus was cleaned using 70% alcohol.

### Open Field Task (OFT)

This task allows simultaneous measurement of habituation to novelty and locomotor/exploratory activity [47]. The apparatus consisted of a black cage measuring 50 cm length  $\times$  50 cm width  $\times$  50 cm height, where the animal was placed for 10 min. The parameters were recorded using ANY-Maze software (Stoelting CO., Wood Dale, IL). The animals were evaluated at the 7th, 14th and 28th days after the ischemic insult. The parameters evaluated were habituation to novelty (spatial memory) and locomotor/exploratory activity. Short-term habituation was considered as a decrease of locomotion from the 1st to the 5th mins in the same session; long-term habituation was considered as a decrease in the locomotion at the 1st min during successive sessions. The distance traveled during the last 5 min of each session was considered as the locomotor/exploratory activity. At the end of each session, the apparatus was cleaned with 70% alcohol.

### Elevated Plus Maze Task (EPMT)

This task evaluates anxiety-like behavior [18]. The apparatus has 2 open (50 cm length  $\times$  10 cm width) and 2 enclosed (50 cm length  $\times$  10 cm width  $\times$  40 cm height) arms, separated by a central platform (5 cm length  $\times$  5 cm width). The apparatus was placed 70 cm of height from the floor. ANY-Maze software was used to record the parameters for 5 min. The parameters recorded included (a) the total distance



traveled; (b) the percentage of time spent in open arms; and (c) the distance traveled in open arms. The animals were evaluated only once, at the 30th day post-ischemic surgery. At the end of each task, the apparatus was cleaned using 70% alcohol.

### Immunohistochemistry

This procedure was performed after 50 days post-ischemic surgery. Thirty-six animals (24 females and 12 males) were deeply anesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg, i.p.) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, i.p.), and transcardially perfused with saline solution (50 mL) using a peristaltic pump (10 mL/min). Subsequently, the brains were removed and fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PFA-PBS, pH 7.4) for 24 h at room temperature. Further, the brains were cryoprotected in a 30% sucrose solution at room temperature until they sank. The samples were soon dipped in isopentane and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP) was performed to evaluate the number and morphology of astrocytes. Coronal brain slices of 30  $\mu\text{m}$  thickness (from +2.20 mm rostrally to  $-0.80$  mm caudally relative to bregma) were obtained (penumbra zone—ipsilateral; control—contra lateral to ischemia), using a cryostat (MEV, SLEE Medical GmbH, Mainz, Germany). The brain slices were mounted on glass slides and post-fixed with PFA-PBS for 15 min, permeabilized in 0.1% triton X-100 diluted in PBS (PBS-Tx), and then blocked for 1 h with 5% albumin also diluted in PBS-Tx. The histological samples were incubated for 24 h at  $4^{\circ}\text{C}$  with anti-GFAP (1:500 in PBS-Tx) rabbit polyclonal antibody (Z0334, Dako, Glostrup, Denmark) followed by a 2 h incubation with secondary goat anti-rabbit AlexaFluor® 555 antibody (1:1000 in PBS-Tx, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The images were acquired at 8-bit grayscale (256 grey levels) in a laser-scanning confocal microscopy (Olympus FV1000). Approximately 10–15 confocal sections of 0.7  $\mu\text{m}$  thickness were taken parallel to the coverslip (*xy* sections) with an  $\times 40$  objective (Olympus, U plan-super-apochromat, UPLSAPO40X). After Z-stack reconstruction, the final image contains cells that occupy an area of 0.048  $\text{mm}^3$  (i.e. 0.4 mm of width  $\times$  0.4 mm of height  $\times$  0.03 mm of depth). We thus estimated the cell quantity per 1  $\text{mm}^3$ . All lighting conditions and magnifications were kept constant. Image reconstruction and analysis were performed using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). We obtained images of the contralateral and ipsilateral hemispheres from 3 tissue slices that were sequentially cut (approximately 300  $\mu\text{m}$  of distance between them) in 6 brains for each analyzed group, totaling 6 images per animal and 36 images per group. Altogether, we analyzed 216 images. All measurements were

made in the motor cortex, approximately 300  $\mu\text{m}$  surrounding the cortex lesion (Fig. 5a) at the 50th day post-surgery.

GFAP is considered as a marker of astrocytes in adult brains [48]. The number of GFAP-immunoreactive astrocytes per  $\text{mm}^3$  was estimated as described previously [49]. Briefly, a grid of 4 squares was overlaid upon each image, and the astrocytes that were located inside or intersected by the lower and/or left edge of these squares were counted. We also established a morphological classification for all counted cells based on a visual assessment, the non-reactive astrocytes were classified as *no-ramified* cells whereas reactive astrocytes were classified as *ramified* cells (Fig. 5B). The percentage of *no-ramified* or *ramified* astrocytes was calculated considering the total number of counted cells for each image. Three blind researchers individually performed cell counting and morphological classification by visual inspection.

### Infarct Volume Measure

Infarct volume were conducted only in ischemic animals. To delineate and measure the ischemic zone, 48 h after ischemic surgery [50] the animals were deeply anesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg, i.p.) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, i.p.), and transcardially perfused with saline solution (50 mL) using a peristaltic pump (10 mL/min). Then, the brains were removed from the skull and coronally sectioned into slices with 2 mm thickness using a rat brain matrix. The slices were immersed into a 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) solution at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 min, followed by 4% paraformaldehyde overnight fixation (Sigma, St. Louis, MO, USA). After fixation, the slices were sequentially placed on a dark base in a frontal-occipital orientation and digital images were acquired. The infarct volume of each slice was analyzed using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and was calculated by the formula: Infarct Volume = [contralateral area  $\times$  slice thickness (2 mm)] – [ipsilateral area  $\times$  slice thickness (2 mm)]/[contralateral area  $\times$  slice thickness (2 mm)] [51]. The counts were performed by three blind researchers individually and the results were expressed in percentage.

### Statistical Analysis

A two-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test was used to analyze the intragroup time-effect of the ischemic surgery in the CT. Additionally, a two-way ANOVA followed by a Sidak's post hoc test was used to compare the ischemic rats with their respective ischemic GUO groups. In OFT, we used one-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test to evaluate the long-term habituation (1st min of total distance traveled in each of the 3 different exposures), and the locomotion/exploration (last

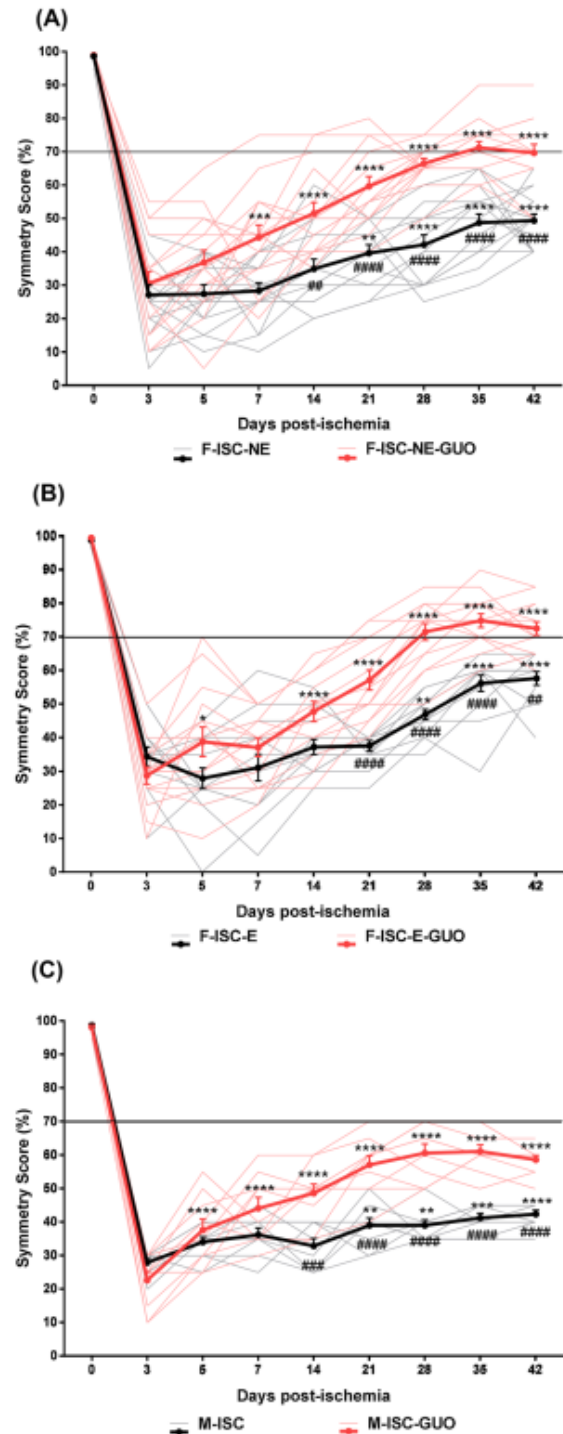
**Fig. 2** Symmetry score of ischemic animals. Results are presented as individual performance of each animal (hard lines), and the mean of each group. Groups were subdivided into female non-estrogenic (F-ISC-NE and F-ISC-NE-GUO) (a), female estrogenic (F-ISC-E and F-ISC-E-GUO) (b) and male (M-ISC and M-ISC-GUO) (c). The day zero refers to the symmetry evaluated before ischemic induction. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. and were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test for time effect (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared with 3rd day post-ischemic induction) and two-way ANOVA by Sidak's multiple comparisons test for group effect (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared between groups in the same day). Animals/group: F-ISC-NE = 16; F-ISC-NE-GUO = 18; F-ISC-E = 14; F-ISC-E-GUO = 17; M-ISC = 9; M-ISC-GUO = 10

5 min of total distance traveled in each of the 3 different exposures). Short-term spatial habituation (the difference between the first and the fifth min of distance traveled in each of the three different exposures) was evaluated by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test. Comparisons between naïve and their respective ischemic group in the EPMT was performed using an unpaired Student's t-test to investigate the ischemic effect on anxiety-like behavior. Cell count and morphology of astrocytes were analyzed by two-way ANOVA followed by a Sidak's post hoc test comparing the percentage of ramified and no-ramified astrocytes in the same group. Infarct volume measure was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test to compare the lesions size between groups. Data are reported as the mean  $\pm$  SEM. Alpha or significance levels were set at 0.05. All analyses were performed using Graph Pad Prism 6.0.

## Results

### Cylinder Task (CT)

In CT (Fig. 2), the time course analyses evidenced that all the ischemic animals, without GUO treatment, partially recovered the impaired symmetry in forelimb paws, with 70% considered full recovery. The GUO treatment significantly improved this recovery. F-IS-NE-GUO group achieved a full (70%) recovery from the 35th day post-insult [Fig. 2a,  $F(8, 240) = 181.7$ ;  $p < 0.0001$ ], and the F-IS-E-GUO group, from the 28th post-insult [Fig. 2b,  $F(8, 216) = 200.3$ ;  $p < 0.0001$ ]. Instead, the M-IS-GUO group achieved only a partial 60% recovery from the 35th day post-insult (Fig. 2c,  $F(8, 136) = 225.0$ ;  $p < 0.0001$ ). These improved recoveries were maintained up to the last measurement (42 days post-insult). When comparing the female and male rats with or without GUO treatment, we observed that the estrous cycle did not interfere in forelimb recovery (see Sup. Figure 1).

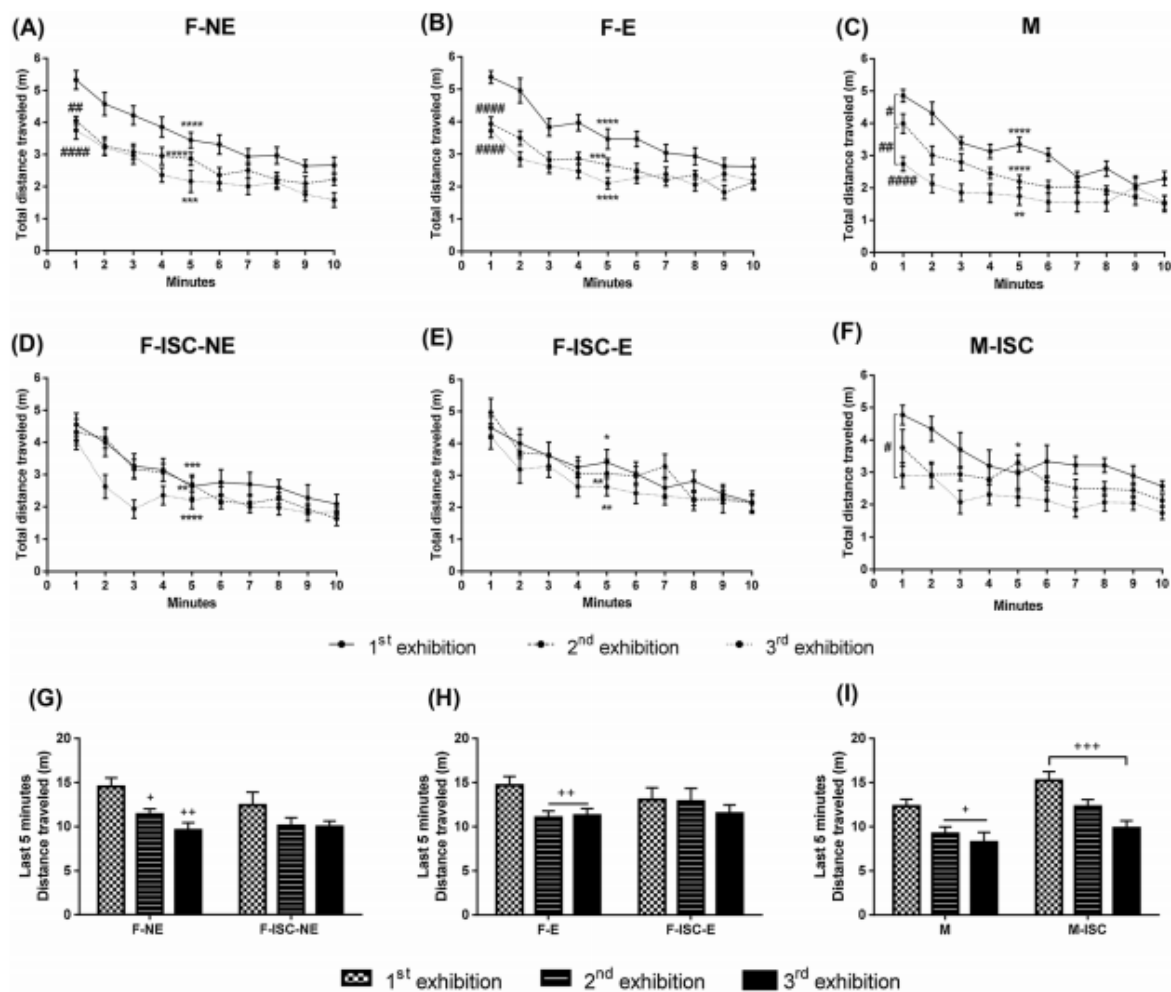


### Open Field Task (OFT)

In OFT, the distance traveled measured in the 3 different exposures of naïve and ischemic animals is represented in Fig. 3a–i. As expected, all naïve groups presented short- and long-term habituation to novelty: all naïve groups decreased the distance traveled from the 1st to the 5th min in each session and decreased the distance traveled in the 1st min in successive sessions, respectively. Additionally, F-NE, F-E, M and M-ISC groups had a decrease in the distance

traveled in the last 5 min (locomotion/exploratory activity) when comparing all sessions, unless F-IS-NE and F-IS-E groups (Fig. 3g, h, respectively). The comparison between non-ischemic and ischemic groups in each exposition indicated no statistical difference. GUO did not affect any group, or the parameters evaluated (data not shown).

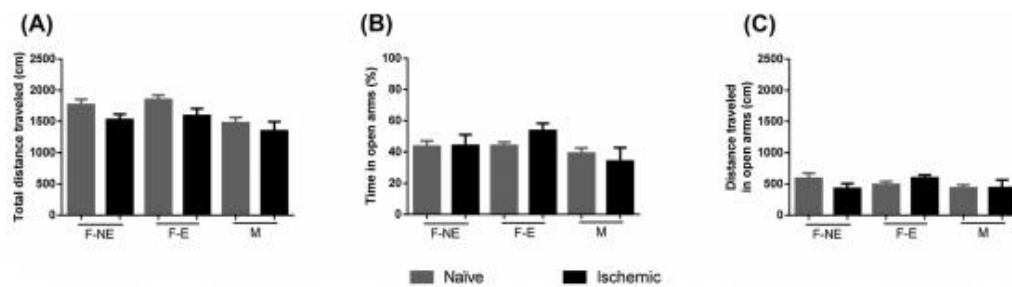
Long-term habituation to novelty was maintained in naïve groups (Fig. 3a,  $F(2, 57) = 12.15$ ;  $p < 0.0001$ , Fig. 3b,  $F(2, 54) = 15.70$ ;  $p < 0.0001$ , and Fig. 3c,  $F(2, 42) = 14.99$ ;  $p < 0.0001$ ), but the ischemic insult affected the long-term



**Fig. 3** Open field task: total distance traveled. Groups were subdivided into **a** female non-estrogenic naïve (F-NE) and **(D)** ischemic (F-ISC-NE), **b** female estrogenic naïve (F-E) and **(E)** ischemic (F-ISC-E), **c** male naïve (M) and **(F)** ischemic (M-ISC). **a–f**, demonstrating long-term habituation on 1st min of session (# symbol), and short-term habituation comparing 1st and 5th mins of session (\*symbol); **G** to **I**, demonstrating the locomotion/exploration activity on the last 5 min of session (+symbol). The task was performed 3 times (7, 14 and 28 days) after ischemic surgery. Data are

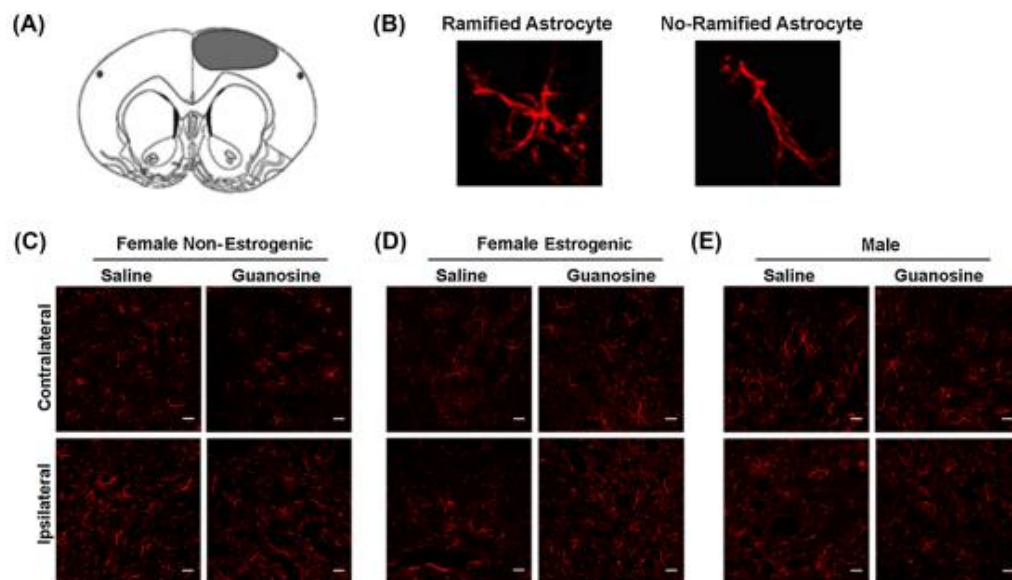
reported as mean  $\pm$  SEM. Long-term habituation and locomotion/exploration activity were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test when compared 3 sessions in the same group, and short-term habituation was analyzed by two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test. (\*, \* $p < 0.05$ , \*\*, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*, \*\*\*, $p < 0.001$ , \*\*\*\*, \*\*\*\*, $p < 0.0001$ ). Animals/group: F-NE = 20; F-ISC-NE = 16; F-E = 19; F-ISC-E = 14; M = 15; M-ISC = 9





**Fig. 4** Total distance traveled, time percentage and distance traveled in open arms by animals in elevated plus maze task. Groups were subdivided into female non-estrogenic naïve (F-NE) and ischemic (F-ISC-NE); female estrogenic naïve (F-E) and ischemic (F-ISC-E); male naïve (M) and ischemic (M-ISC). **a** Total distance traveled. **b**

Time percentage in open arms. **c** Distance traveled in open arms. Data are reported as the mean  $\pm$  SEM, and were analyzed by student's t test when compared respective naïve and ischemic groups. Animals/group: F-NE=20; F-ISC-NE=8; F-E=19; F-ISC-E=8; M=15; M-ISC=15



**Fig. 5** Morphological analysis of astrocytes. GFAP immunohistochemistry was performed 50 days after ischemic surgery. Six animals per group and three slices per animal were analyzed. Images of brain cortices from the contralateral (CL) and ipsilateral (IPSI) region were

acquired through confocal microscopy at indicated areas (a). Representative images of ramified (stellated) and no-ramified astrocyte morphology (b). Representative images of contralateral and ipsilateral region from each analyzed group (c-e)

habituation in female (F-IS-NE and F-IS-E) groups (Fig. 3d,  $F(2, 45) = 2.627$ ;  $p = 0.0834$ ; Fig. 3e,  $F(2, 39) = 0.7305$ ;  $p = 0.4881$ ), without affecting the male (M-IS) group (Fig. 3f,  $F(2, 23) = 8.166$ ;  $p = 0.0021$ ).

Short-term habituation to novelty was present, in all 3 sessions, in naïve groups (Fig. 3a,  $F(1, 57) = 107.7$ ;  $p < 0.0001$ , Fig. 3b,  $F(1, 54) = 80.71$ ;  $p < 0.0001$ , and Fig. 3c,  $F(1, 42) = 68.32$ ;  $p < 0.0001$ ), as well as in ischemic female groups F-IS-NE, F-IS-E and M-IS (Fig. 3d,  $F(1, 45) = 57.40$ ;  $p < 0.0001$ ; Fig. 3e,  $F(1, 39) = 42.80$ ;  $p < 0.0001$ ; and Fig. 3f,  $F(1, 22) = 13.49$ ;  $p = 0.0013$ ). In

male ischemic group the short-term habituation was verified only in the session 1; the absence of statistical significance from the 1st to 5th min in the sessions 2 and 3 may be due to the maintenance of the long-term habituation in male ischemic group. Thus, we considered that the male rats performance in the OFT was not affected by the ischemic insult.

Locomotion/exploratory activity in naïve groups showed a significant decrease in the distance traveled comparing the first OFT exposition with the other successive sessions: Fig. 3g, F-NE group— $F(1.821, 34.61) = 11.36$ ;  $p = 0.0002$ ; Fig. 3h, F-E group— $F(1.576, 28.36) = 8.179$ ;  $p = 0.003$ ;

Fig. 3i, M group— $F(1.520, 21.28) = 6.166$ ;  $p = 0.0122$ . The ischemic insult abolished this decrement in female ischemic groups: Fig. 3g, F-ISC-NE group— $F(1.508, 22.62) = 3.685$ ;  $p = 0.0522$ ; Fig. 3h, F-ISC-E group— $F(1.576, 20.49) = 0.8461$ ;  $p = 0.4185$ . This effect was not observed in the ischemic male groups: Fig. 3i, M-ISC group— $F(1.481, 11.85) = 15.19$ ;  $p = 0.0010$ .

### Elevated Plus Maze Task (EPMT)

The ischemic insult and GUO did not affect the total distance traveled, the distance traveled in open arms, or the time spent in open arms in the EPM task (Fig. 4a–c), preliminarily pointing to an absence of anxiolytic-like behavior caused by this brain ischemia protocol.

### Immunohistochemistry of Astrocytes

It was not observed any significant morphological differences between the contralateral (control zone) and ipsilateral (penumbra zone) cortices of F-IS-NE, F-IS-E and

M-IS animals, regardless the GUO treatment (Fig. 5c–e). Similarly, the estimative of cells per  $\text{mm}^3$  revealed no significant differences in the total number of astrocytes in the contralateral and ipsilateral cortices for each analyzed group (Table 1). The prevalence of *no-ramified* astrocytes, comparing to *ramified* astrocytes, was the same in both cortices in all analyzed groups. The ischemic insult caused no astrogliosis (Fig. 6a–c), at least after 50 days of ischemic surgery (Fig. 6a,  $F(1, 63) = 116.2$ ;  $p < 0.0001$ ; Fig. 6b,  $F(1, 65) = 90.04$ ;  $p < 0.0001$ ; and Fig. 6c,  $F(1, 66) = 95.64$ ,  $p < 0.0001$ ).

### Infarct Volume

The ischemic insult generated similar infarct sizes both in male and female groups, and GUO did not affect the infarct volume measure (Fig. 7a, b). There was no statistical difference in the infarct volume measure when comparing between groups ( $F(5, 24) = 1.615$ ,  $p = 0.1942$ ).

### Discussion

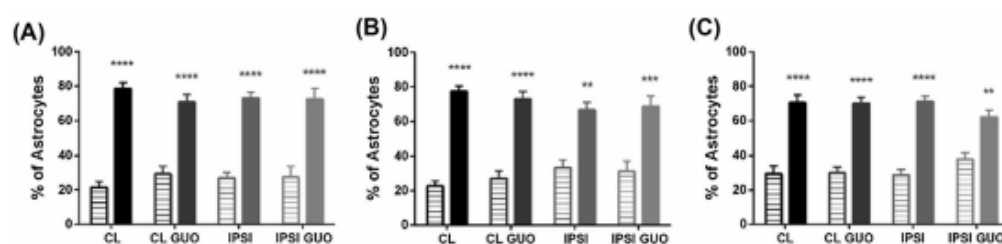
In this study, the ischemic brain insult differently affected behavioral performance of female and male rats. This work is the first to examine the long-term effect of an acute ischemic brain insult (stroke) simultaneously in female and male animals and the comparative potential neuroprotective effects of GUO in both genders. As many studies are performed on ovariectomized rats using exogenous treatment with estrogen, we considered the estrogenic and non-estrogenic phases of the estrous cycle in non-ovariectomized rats.

It has been shown that after focal stroke in rats, endogenous guanosine in cortex was elevated within 2 h and remains high for 7 days [52], what led to the investigation of the effects of exogenously administered guanosine in stroke models [53–55]. Guanosine has neuroprotective effects in vivo experimental models, as seizures [56–60],

**Table 1** Total count of astrocytes of contralateral (CL) and ipsilateral (IPSI) cortices

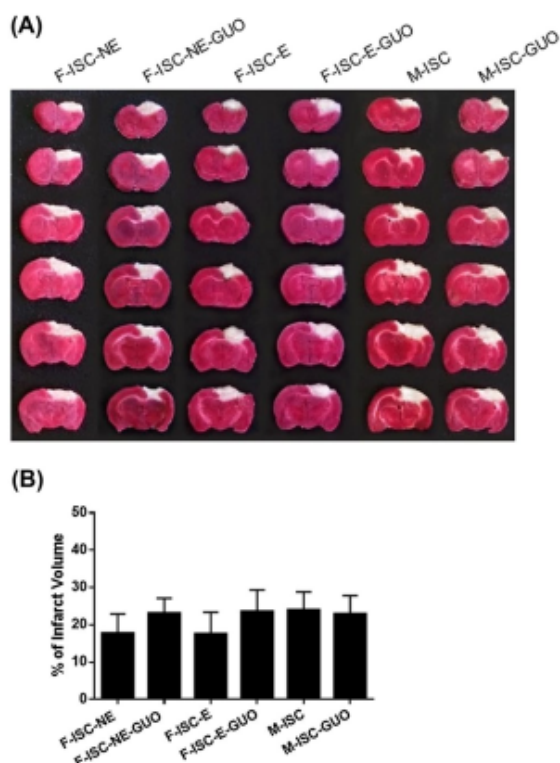
	Total of cells/ $\text{mm}^3$ (Ramified + No-Ramified)	
	Saline	GUO
Female non-estrogenic		
CL	4969.1 $\pm$ 483.15	3950.5 $\pm$ 432.86
IPSI	5246.9 $\pm$ 681.47	4058.7 $\pm$ 501.22
Female estrogenic		
CL	4012.3 $\pm$ 379.92	4232.0 $\pm$ 443.18
IPSI	5030.8 $\pm$ 794.54	4085.1 $\pm$ 470.27
Male		
CL	4629.6 $\pm$ 377.76	4379.0 $\pm$ 567.28
IPSI	6018.5 $\pm$ 911.65	5277.7 $\pm$ 639.39

Total of cells are expressed as mean  $\pm$  standard errors



**Fig. 6** Quantitative analysis of astrocytes. Female non-estrogenic (a), female estrogenic (b), male (c). The percentage of ramified (striped) or no-ramified (full) cells remained constant. For each group individually, the percentage of no-ramified astrocytes were significantly higher. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Sidak's

multiple comparisons test. \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  when compared the percentage of astrocytes ramified and no-ramified in the same group. Animals/group: 3. CL contralateral; IPSI ipsilateral



**Fig. 7** Brain infarct volume of ischemic groups. The lesion sizes were obtained 48 hs after ischemic surgery. **a** Representative TTC images of each group. **b** Percentage of infarct volume. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Animals/group: 5

brain ischemia [2, 14, 61, 62], Parkinson's disease [63, 64], Alzheimer's disease [65], hepatic encephalopathy [16, 17, 66] and sepsis [13]. In an *in vitro* model of ischemia (oxygen glucose deprivation), it was also observed the neuroprotective effects of guanosine. In all these experimental models, guanosine exerts modulatory effects on the cerebral glutamatergic system, by stimulating astrocytic glutamate uptake [67–69], exerting antioxidant effects, preventing mitochondrial membrane depolarization, and regulating inflammatory responses [62, 70–73].

Here, we evaluated sensorimotor recovery, which is considered the foremost neurological recovery parameter after the ischemic insult [46, 74–76]. We also evaluated the performance in behavioral tasks involving habituation to novelty, locomotor/exploratory activity, and anxiety-like behavior. Moreover, we assessed putative long-term astrocytic reactivity in both brain hemispheres.

The ischemic insult profoundly affected the forelimb symmetry; its acute effect was followed by a slow sensorimotor recovery, more evident in the female groups. To determine

if the lesions of male and female groups had similar size or not, we performed the TTC protocol, which indicated no statistical differences between groups, concerning the lesion size. GUO had a significant neuroprotective effect and was more efficient in the female groups, in which it reached a normality of 70%. Our results indicate that females are less sensitive to this model of acute brain ischemic insult and more sensitive to GUO administration, at least during the reproductive period of life.

Previous studies have demonstrated the effect of GUO in recovering the sensorimotor function in male rats [14, 53, 55]. When comparing both genders, however, we showed that GUO administered just after the insult was more efficient in female rats. The GUO effect started at the fifth–seventh days after injury in female and male groups, reaching a late (28–35 days) normality (70%) only in the female groups. The sensorimotor long-term recovery (symmetry) in ischemic groups, and the beneficial effect of guanosine treatment were better in female rats. This differential finding may be related to ovarian hormones, mainly estradiol, which exerts neuroprotective effects [77–83]. However, the biochemical mechanisms and the interaction between GUO and ovarian hormones still require further researches. We believe that, even in the non-estrogenic phase, the central physiological estrogenic environment may be reasonably maintained, unlike what occurs in an ovariectomized rat.

We used OF task to evaluate short and long-term habituation to novelty (spatial memory). All naïve groups presented both short and long-term habituation to novelty. Ischemic insult affected both genders differently. The female groups were affected only in long-term habituation, whereas the male group was not affected in any habituation. The estrous cycle phases did not affect any of the ischemic insult effects. The GUO treatment did not affect the insult consequences (data not shown). This difference in the behavioral response of each gender to ischemia may be attributed to a deficit in habituation memory [84, 85].

Locomotion/exploratory activity was also evaluated in the same OF task, by measuring the distance traveled by the animals in the last 5 min of each session. The normal behavior of rodents is decreasing the locomotor/exploratory activity while presenting habituation to novelty [85]. Our results evidenced that all naïve groups had a normal decrease in the locomotion/exploratory activity, and that the ischemic insult affected this decrease only in female groups. Estrogens are neuroprotective after cerebral ischemia [32], thus, further researches on habituation memory and exploratory activity during estrogenic and non-estrogenic phases should be conducted.

Anxiety-like behavior was evaluated by EPM task. All naïve groups had the same performance in all parameters evaluated. The ischemic insult had no effect in a long-term anxiety-like activity, consequently, GUO did not protect



this behavior. We performed the EPM task at 30 days after surgery aiming to evaluate some long-term effect of the insult on an anxiety-like behavior. The lack of effect may be related to the time in which the task was performed after the ischemia [86]. Another way, previous study [87] observed an anxiogenic-like behavior after 24 h, and anxiolytic-like effects after 5 days post-ischemic surgery. They also observed no differences of anxiety-like activity at the 15th and 30th days after surgery, when comparing the ischemic and control groups.

The resting (no-ramified) astrocytes participate in CNS homeostasis [88], synapse formation [89], and synapse function [90]. Despite the resting (no-ramified) astrocytes present a heterogeneous morphology, this phenotype is characterized by small cell body and low GFAP expression, long and thin processes united by gap junctions, forming a network. Under pathological conditions, as ischemic stroke, astrocytes also change their phenotype from a resting to a reactive form, characterized by hypertrophic cell bodies and novel processes [42, 91]. Astrocytes become reactive about 2 days to 1 week after stroke and they form a scar around the core by approximately 2 weeks [92]. However, a recent stroke study using another surgery protocol found reactive astrocytes even 30 days after stroke [93]. In our work we found most astrocytes in resting phenotype, what could be explained by the long-term evaluation (50 days after ischemic surgery).

Studies have shown that the penumbra zone is modulated after ischemic stroke by processes involving glial cells. Astrocytes, present in the penumbra zone, are converted to hypertrophic shapes, leading these reactive cells to present a more elongated and radial process. Indeed, in a few hours after the ischemic brain injury, astrocytes become reactive, and after 3–5 days the number of astrocytes around the lesion increases significantly [94].

The astrocytic role in brain recovery after an ischemia is controversial. Reactive astrocytes could play beneficial roles in the acute phase of brain injury, by inducing the secretion of neurotrophic factors. These activated cells, however, may also be responsible for inhibiting axonal growth, which impairs the functional recovery of the brain [40, 95, 96]. In our group, it was previously observed [97] that ischemic stroke in male rats could also promote morphological changes in astrocytes after 9 days, characterizing reactive astrogliosis in the ipsilateral brain side.

Ovarian hormones interact with glial cells. Estradiol increases GFAP expression in astrocytes depending on estrous cycle phase [30]. Here, we searched for potential long-term gender dependent effects in astrocytes—astrogliosis—in the penumbra zone after ischemia. We found no effect of brain ischemia or GUO treatment on astrocytic parameters, both in ipsilateral and contralateral brain slices at 50 days after surgery. This long time after the ischemic

surgery for immunohistochemistry analysis could be responsible by the absence of astrogliosis, which is a topic currently under investigation by our group.

As the incidence of ischemic stroke has increased in both men and women worldwide in last decades [98], in vivo experimental studies are increasingly being performed; however, the majority are with male animals and performing the evaluation for short-time after the ischemia, including preclinical researches involving guanosine in ischemic stroke. Thus, we conducted our study using female/male rats, considering the phases of the estrus cycle and administering guanosine as treatment. Considering the different responses observed between female and male rats, we are starting to investigate putative mechanisms involved in these differences.

## Conclusion

We investigated the effects of gender in rats on neurological, behavioral, and cellular outcomes caused by a model of focal permanent brain ischemic injury, as well as the potential neuroprotective effect of GUO. The female rats had a better neurological recovery than male rats, considering the forelimb symmetry, and were more sensitive to the neuroprotective effect of GUO administration. Brain ischemia, however, impaired the long-term habituation to novelty in OFT only in female rats. These distinct results strengthen the need of considering the gender of the animal, aiming a better understanding of the physiopathology of acute brain insults and the potential neuroprotective effects of GUO. The potential mechanisms involved in gender differences require further, promissory studies.

## References

1. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, Moran AE, Sacco RL, Anderson L, Truelsen T, O'Donnell M, Venketasubramanian N, Barker-Collo S, Lawes CM, Wang W, Shinohara Y, Witt E, Ezzati M, Naghavi M, Murray C; Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010 (GBD 2010) and the GBD Stroke Experts Group (2014) Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 383(9913):245–254. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61953-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61953-4)
2. Durukan A, Tatlisumak T (2007) Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87(1):179–197. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.04.015>
3. Brouns R, De Deyn PP (2009) The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 111(6):483–495. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2009.04.001>
4. Olmez I, Ozyurt H (2012) Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int* 60:208–212. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.11.009>

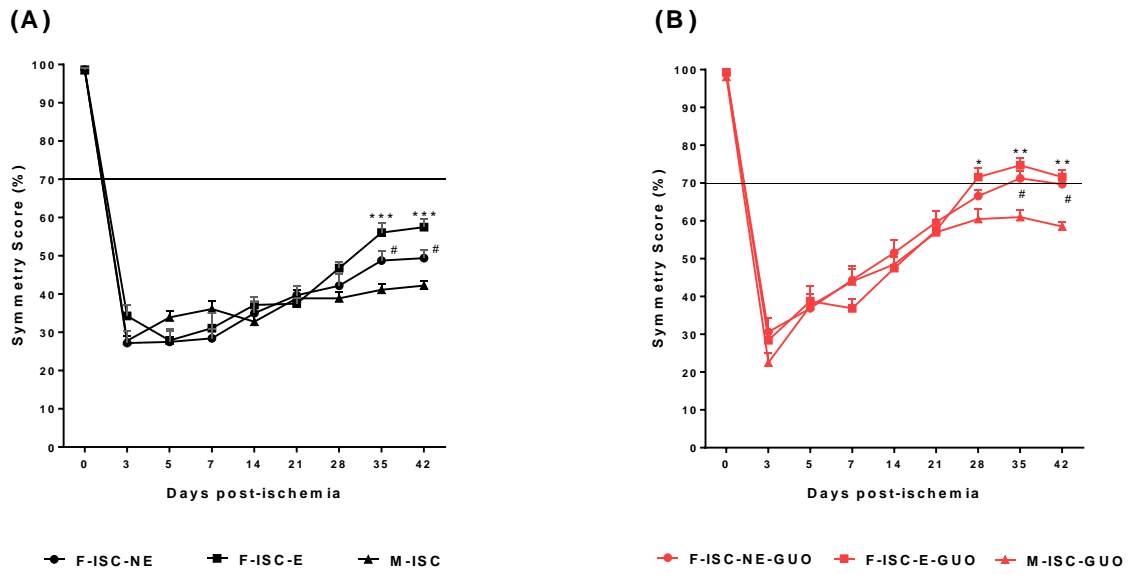
5. Panickar KS, Norenberg MD (2005) Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia* 50:287–298. <https://doi.org/10.1002/glia.20181>
6. Li H, Zhang N, Sun G, Ding S (2013) Inhibition of the group I mGluRs reduces acute brain damage and improves long-term histological outcomes after photothrombosis-induced ischaemia. *ASN Neuro* 5(3):5e00117. <https://doi.org/10.1042/AN20130002>
7. Huang L, Wu Z, Zhu GQ, Zheng W, Shao B, Wang B, Sun F, Jin K (2014) Glial Scar Formation Occurs in the Human Brain after Ischemic Stroke. *Int J Med Sci* 11(4):344–348. <https://doi.org/10.7150/ijms.8140>
8. Zádori D, Klivényi P, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L (2012) Mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation and kynurenines: novel therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *J Neurosci* 32:187–191. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.06.004>
9. Ciruela F (2013) Guanosine behind the scene. *J Neurochem* 126:425–427. <https://doi.org/10.1111/jnc.12328>
10. Schmidt AP, Bohmer AE, Schallenger C, Antunes C, Tavares RG, Wofchuk ST, Elisabetsky E, Souza DO (2010) Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of Guanosine in mice. *Br J Pharmacol* 159:247–263. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00597.x>
11. Tarozzi A, Merlicco A, Morroni F, Bolondi C, Di Iorio P, Ciccarelli R, Romano S, Giuliani P, Hrelia P (2010) Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers. *J Biol Regul Homeost Agents* 24:297–306
12. Giuliani P, Romano S, Ballerini P, Ciccarelli R, Petragiani N, Cicchitti S, Zuccarini M, Jiang S, Rathbone MP, Caciagli F, Di Iorio P (2012) Protective activity of guanosine in an in vitro model of Parkinson's disease. *Panminerva Med* 54:43–51
13. Petronilho F, Perico SR, Vuolo F, Mina F, Constantino L, Comim CM, Quevedo J, Souza DO, Dal-Pizzol L (2012) Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 26:904–910. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.03.007>
14. Hansel G, Ramos DB, Delgado CA, Souza DG, Almeida RF, Portela LV, Quincozes-Santos A, Souza DO (2014) The potential therapeutic effect of guanosine after cortical focal ischemia in rats. *PLoS ONE* 9(2):e90693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090693>
15. Dal-Cim T, Molz S, Egea J, Parada E, Romero A, Budni J, Martín de Saavedra MD, del Barrio L, Tasca CI, López MG (2012) Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. *Neurochem Int* 61(3):397–404. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.05.021>
16. Paniz LG, Calcagnotto ME, Pandolfo P, Machado DG, Santos GF, Hansel G, Almeida RF, Bruch RS, Brum LM, Torres FV, de Assis AM, Rico EP, Souza DO (2014) Neuroprotective effects of guanosine administration on behavioral, brain activity, neurochemical and redox parameters in a rat model of chronic hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 29(3):645–654. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9548-x>
17. Cittolin-Santos GF, de Assis AM, Guazzelli PA, Paniz LG, da Silva JS, Calcagnotto ME, Hansel G, Zenki KC, Kalinine E, Duarte MM, Souza DO (2017) Guanosine exerts neuroprotective effect in an experimental model of acute ammonia intoxication. *Mol Neurobiol* 54(5):3137–3148. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9892-4>
18. Almeida RF, Comassetto DD, Ramos DB, Hansel G, Zimmer ER, Loureiro SO, Ganzella M, Souza OD (2016) Guanosine anxiolytic-like effect involves adenosinergic and glutamatergic neurotransmitter systems. *Mol Neurobiol* 54(1):423–436. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9660-x>
19. Beery AK, Zucker I (2011) Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev* 35(3):565–572. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>
20. McCullough LD, de Vries GJ, Miller VM, Becker JB, Sandberg K, McCarthy MM (2014) NIH initiative to balance sex of animals in preclinical studies: Generative questions to guide policy, implementation, and metrics. *Biol Sex Diff* 5:15. <https://doi.org/10.1186/s13293-014-0015-5>
21. Schierbeck LL, Rejnmark L, Tofteng CL, Stilgren L, Eiken P, Mosekilde L, Køber L, Jensen JE (2012) Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomized trial. *BMJ* 9:345:e6409. <https://doi.org/10.1136/bmj.e6409>
22. Lisabeth LD, Beiser AS, Brown DL, Murabito JM, Kelly-Hayes M, Wolf PA (2009) Age at natural menopause and risk of ischemic stroke: the Framingham Heart Study. *Stroke* 40(4):1044–1049. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.542993>
23. Giroud M, Delpont B, Daubail B, Blanc C, Durier J, Giroud M, Béjot Y (2017) Temporal trends in sex differences with regard to stroke incidence: the dijon stroke registry (1987–2012). *Stroke* 48(4):846–849. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.015913>
24. Bushnell CD (2008) Stroke and the female brain. *Nat Clin Pract Neurol* 4(1):22–31. <https://doi.org/10.1038/ncpneu0686>
25. Arevalo MA, Santos-Galindo M, Acas-Fonseca E, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2013) Gonadal hormones and the control of reactive gliosis. *Horm Behav* 63(2):216–221. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.021>
26. Ishihara Y, Takemoto T, Ishida A, Yamazaki T (2015) Protective actions of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone on oxidative neuronal injury induced by organometallic compounds. *Oxidative Med Cell Longev*. <https://doi.org/10.1155/2015/343706>
27. Ishihara Y, Fujitani N, Sakurai H, Takemoto T, Ikeda-Ishihara N, Mori-Yasumoto K, Nehira T, Ishida A, Yamazaki T (2016) Effects of sex steroid hormones and their metabolites on neuronal injury caused by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation in organotypic hippocampal slice cultures. *Steroids* 113:71–77. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.06.004>
28. Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, Don Carlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM (2005) Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Rev* 48(2):273–286. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.018>
29. McAsey ME, Cady C, Jackson LM, Li M, Randall S, Nathan BP, Struble RG (2006) Time course of response to estradiol replacement in ovariectomized mice: brain apolipoprotein E and synaptophysin transiently increase and glial fibrillary acidic protein is suppressed. *Exp Neurol* 197(1):197–205. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.09.008>
30. Struble RG, Nathan BP, Cady C, Cheng X, McAsey M (2007) Estradiol regulation of astroglia and apolipoprotein E: an important role in neuronal regeneration. *Exp Gerontol* 42(1–2):54–63. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.05.013>
31. Azcoitia I, Santos-Galindo M, Arevalo MA, Garcia-Segura LM (2010) Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *Eur J Neurosci* 32(12):1995–2002. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07516.x>
32. Brown CM, Mulcahey TA, Ffilipek NC, Wise PM (2010) Production of proinflammatory cytokines and chemokines during neuroinflammation: novel roles for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 151(10):4916–4925. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0371>
33. Saraceno GE, Bertolino ML, Galeano P, Romero JI, Garcia-Segura LM, Capani F (2010) Estradiol therapy in adulthood reverses glial and neuronal alterations caused by perinatal asphyxia. *Exp Neurol* 223(2):615–622. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.02.010>



34. Labombarda F, González S, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2011) Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Exp Neurol* 231(1):135–146. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.06.001>
35. Heberden C (2017) Sex steroids and neurogenesis. *Biochem Pharmacol* 141(1):56–62. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.05.019>
36. Carswell HV, Dominiczak AF, Macrae IM (2000) Estrogen status affects sensitivity to focal cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(1):H290–H294
37. Barreto G, Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Garcia-Ovejero D (2007) Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. *Eur J Neurosci* 25(10):3039–3046. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05563.x>
38. Barreto G, Santos-Galindo M, Diz-Chaves Y, Pernía O, Carrero P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2009) Selective estrogen receptor modulators decrease reactive astrogliosis in the injured rat: effects of aging and prolonged depletion of ovarian hormones. *Endocrinology* 150(11):5010–5015. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0352>
39. López Rodríguez AB, Mateos Vicente B, Romero-Zerbo SY, Rodríguez-Rodríguez N, Bellini MJ, Rodríguez de Fonseca F, Bermudez-Silva FJ, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Viveros MP (2011) Estradiol decreases cortical reactive astrogliosis after brain injury by a mechanism involving cannabinoid receptors. *Cereb Cortex* 21:2046–2055. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq277>
40. Pekny M, Pekna M (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev* 94(4):1077–1098. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013>
41. Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32(12):638–647. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
42. Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119(1):7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
43. Ferrer I (2017) Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathol* 27(5):645–674. <https://doi.org/10.1111/bpa.12538>
44. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62(4a):609–614. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>
45. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL (2007) The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Dev Reprod Toxicol* 80:84–97. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
46. De Vasconcelos dos Santos A, da Costa Reis J, Diaz Paredes B, Moraes L, Mendez-Otero R (2010) Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Res* 1306:149–158. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.094>
47. Almeida RF, Ganzella M, Machado DG, Loureiro SO, Leffa D, Quincozes-Santos A, Pettenuzzo LF, Duarte MMMF., Duarte T, Souza DO (2017) Olfactory bulbectomy in mice triggers transient and long-lasting behavioral impairments and biochemical hippocampal disturbances. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 76(2):1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2017.02.013>
48. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res* 25(9–10):1439–1451
49. Viola GG, Rodrigues L, Américo JC, Hansel G, Vargas RS, Biasibetti R, Swarowsky A, Gonçalves CA, Xavier LL, Achaval M, Souza DO, Amaral OB (2009) Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by Environmental enrichment in mice. *Brain Res* 1274:47–54. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.04.007>
50. Ramos DB, Muller GC, Rocha GBM, Dellavia GH, Almeida RF, Pettenuzzo LF, Loureiro SO, Hansel G, Horn ACM, Souza DO, Ganzella M (2016) Intranasal guanosine administration presents a wide therapeutic time window to reduce brain damage induced by permanent ischemia in rats. *Purinergic Signal* 12(1):149–159. <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9489-9>
51. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR (1990) A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metabol* 10(2):290–293. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1990.47>
52. Uemura Y, Miller JM, Matson WR, Beal MF (1991) Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke* 22:1548–1553
53. Chang R, Algird A, Bau C, Rathbone MP, Jiang S (2008) Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo. *Neurosci Lett* 431(2):101–105. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.11.072>
54. Moretto MB, Boff B, Lavinsky D, Netto CA, Rocha JB, Souza DO, Wofchuk ST (2009) Importance of schedule of administration in the therapeutic efficacy of guanosine: early intervention after injury enhances glutamate uptake in model of hypoxia-ischemia. *J Mol Neurosci* 38:216–219. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9154-7>
55. Rathbone MP, Saleh TM, Connell BJ, Chang R, Su C, Worley B, Kim M, Jiang S (2011) Systemic administration of guanosine promotes functional and histological improvement following an ischemic stroke in rats. *Brain Res* 1407:79–89. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.027>
56. Meldrum BS (1994) The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 44:S14–23
57. Schmidt AP, Lara DR, de Faria Maraschin J, da Silveira Perla A, Onofre Souza D (2000) Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res* 864:40–43
58. de Oliveira DL, Horn JF, Rodrigues JM, Frizzo ME, Moriguchi E, Souza DO, Wofchuk S (2004) Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. *Brain Res* 1018:48–54. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.033>
59. Tavares RG, Schmidt AP, Abud J, Tasca CI, Souza DO (2005) In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. *Neurochem Res* 30:439–444
60. Torres FV, da Silva Filho M, Antunes C, Kalinine E, Antoniolli E, Portela LV, Souza DO, Tort AB (2010) Electrophysiological effects of guanosine and MK-801 in a quinolinic acid-induced seizure model. *Exp Neurol* 221(2):296–306. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.11.013>
61. Ganzella M, de Oliveira ED, Comassetto DD, Cechetti F, Cereser VH, Moreira JD, Hansel G, Almeida RF, Ramos DB, Figueredo YN, Souza DG, Osés JP, Worm PV, Achaval M, Netto CA, Souza DO (2012) Effects of chronic guanosine treatment on hippocampal damage and cognitive impairment of rats submitted to chronic cerebral hypoperfusion. *Neurol Sci* 33:985–997. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0872-1>
62. Hansel G, Tonon AC, Guella FL, Pettenuzzo LF, Duarte T, Duarte MM, Osés JP, Achaval M, Souza DO (2015) Guanosine protects against cortical focal ischemia. Involvement of inflammatory response. *Mol Neurobiol* 52:1791–1803. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8978-0>
63. Olanow CW, Tatton WG (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 22:123–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.123>
64. Su C, Elfeki N, Ballerini P, D'Alimonte I, Bau C, Ciccarelli R, Caciagli F, Gabriele J, Jiang S (2009) Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats

- with parkinsonism. *J Neurosci Res* 87:617–625. <https://doi.org/10.1002/jnr.21883>
65. Lanznaster D, Dal-Cim T, Piermartiri TCB, Tasca CI (2016) Guanosine: a neuromodulator with therapeutic potential in brain disorders. *Aging Dis* (7):5:657–679. <https://doi.org/10.14336/AD.2016.0208>
  66. Albrecht J, Jones EA (1999) Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* 170:138–146
  67. Frizzo ME, Lara DR, Prokopiuk Ade S, Vargas CR, Salbego CG, Wajner M, Souza DO (2002) Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol* 22:353–363
  68. Oleskovicz SP, Martins WC, Leal RB, Tasca CI (2008) Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Int* 52:411–418. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.07.017>
  69. Souza DG, Bellaver B, Bobermin LD, Souza DO, Quincozes-Santos A (2016) Anti-aging effects of guanosine in glial cells. *Purinergic Signal* 12(4):697–706. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9533-4>
  70. Li H, Ohishi H, Kinoshita A, Shigemoto R, Nomura S, Mizuno N (1997) Localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR7, in axon terminals of presumed nociceptive, primary afferent fibers in the superficial layers of the spinal dorsal horn: an electron microscope study in the rat. *Neuroscience letters* 223:153–156
  71. Dal-Cim T, Ludka FK, Martins WC, Reginato C, Parada E, Egea J, López MG, Tasca CI (2013) Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. *J Neurochem* 126:437–450. <https://doi.org/10.1111/jnc.12324>
  72. Bellaver B, Souza DG, Bobermin LG, Gonçalves CA, Souza DO, Quincozes-Santos A (2015) Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. *Purinergic Signal* 11(4):571–580. <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9475-2>
  73. Angmo S, Tripathi N, Abbat S, Sharma S, Singh SS, Halder A, Yadav K, Shukla G, Sandhir R, Rishi V, Bharatam PV, Yadav H, Singhal NK (2017) Identification of Guanosine 5'-diphosphate as potential iron mobilizer: preventing the hepcidin-ferroportin interaction and modulating the interleukin-6/Stat-3 pathway. *Sci Rep* 7:40097. <https://doi.org/10.1038/srep40097>
  74. Zhang L, Chen J, Li Y, Zhang ZG, Chopp M (2000) Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments after mild (30 min) and severe (2 h) transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurol Sci* 174:141–146
  75. Schallert T, Woodlee MT (2005) Orienting and placing. In: Whishaw I, Kolb B (eds) *In the Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. Oxford University Press, Oxford, pp 129–140
  76. Balkaya M, Kröber JM, Rex A, Endres M (2013) Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 33(3):330–338. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.185>
  77. Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, Wise PM (1998) Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 18(11):1253–1258. <https://doi.org/10.1097/00004647-199811000-00012>
  78. Suzuki S, Brown CM, Wise PM (2009) Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front Neuroendocrinol* 30(2):201–211. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.04.007>
  79. Cerciati M, Unkila M, Garcia-Segura LM, Arevalo MA (2010) Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro. *Glia* 58(1):93–102. <https://doi.org/10.1002/glia.20904>
  80. Arevalo M, Diz-Chaves Y, Santos-Galindo M, Bellini M, Garcia-Segura LM (2012) Selective oestrogen receptor modulators decrease the inflammatory response of glial cells. *J Neuroendocrinol* 24(1):183–190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02156.x>
  81. Lee E, Sidoryk-W^egrzynowicz M, Wang N, Webb A, Son DS, Lee K, Aschner M (2012) GPR30 regulates glutamate transporter GLT-1 expression in rat primary astrocytes. *J Biol Chem* 287(32):26817–26828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341867>
  82. Barnabas O, Wang H, Gao X-M (2013) Role of estrogen in angiogenesis in cardiovascular diseases. *J Geriatr Cardiol* 10(4):377–382. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-5411.2013.04.008>
  83. Khan MM, Wakade C, de Sevilla L, Brann DW (2014) Selective estrogen receptor modulators (SERMs) enhance neurogenesis and spine density following focal cerebral ischemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 146:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.001>
  84. Dowden J, Corbett D (1999) Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures. *Stroke* 30(6):1240–1246. <https://doi.org/10.1161/01.STR.30.6.1240>
  85. Plamondon H, Khan S (2005) Characterization of anxiety and habituation profile following global ischemia in rats. *Physiol Behav* 84(4):543–552. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.02.001>
  86. Pinto WBVR., Ko GM, Valero-Lapchik VB, Ariza CB, Porcionatto M (2012) Teste de labirinto em cruz elevado: Aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. *R Soc Bras Ci Anim Lab* 1(1):102–120
  87. Milot MR, Plamondon H (2009) Time-dependent effects of global cerebral ischemia on anxiety, locomotion, and habituation in rats. *Behav Brain Res* 200(1):173–180
  88. Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ (2011) Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 34:76–87. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.12.001>
  89. Clarke LE, Barres BA (2013) Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* 14:311–321. <https://doi.org/10.1038/nrn3484>
  90. Halassa MM, Haydon PG (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* 72:335–355. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135843>
  91. Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, Shigetomi E, Gachet C, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S (2017) Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation. *Cell Rep* 19(6):1151–1164. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.047>
  92. Bao Y, Qin L, Kim E, Bhosle S, Guo H, Febbraio M, Haskew-Layton RE, Ratan R, Cho S (2012) CD36 is involved in astrocyte activation and astroglial scar formation. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1567–1577. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.52>
  93. Mestriner RG, Saur L, Bagatini PB, Baptista PPA, Vaz SP, Ferreira K, Machado SA, Xavier LL, Netto CA (2015) Astrocyte morphology after ischemic and hemorrhagic experimental stroke has no influence on the different recovery patterns. *Behav Brain Res* 278:257–261. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.005>
  94. Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, Li Y, Raisman G (2012) Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 349(1):169–180. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1336-5>
  95. Li H, Zhang N, Lin H, Yu Y, Cai QM, Li H, Zhang N, Lin H, Yu Y, Cai QM (2014) Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced

- ischemia in adult mice. *BMC Neurosci* 15:58. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-58>
96. Choudhury GR, Ding S (2016) Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 85:234–244. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.05.003>
97. Nonose Y, Gewehr PE, Almeida RF, Silva JS, Bellaver B, Martins LAM, Zimmer ER, Greggio S, Venturin GT, Da Costa JC, Quincozes-Santos A, Pellerin L, Souza DO, Assis AM (2017) Cortical bilateral adaptations in rats submitted to focal cerebral ischemia: Emphasis on glial metabolism. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0458-x>
98. Feigin VL, Norrving B, Mensah GA (2017) Global burden of stroke. *Circulation Res* 120:439–448. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308413>



**Supplementary Figure 1 - Symmetric score of ischemic animals. Groups were subdivided into female non-estrogenic (F-ISC-NE) (A), female estrogenic (F-ISC-E) (B) and male (M-ISC) (C). GUO – 60 mg/kg or saline i.p. administration was performed 4 times after ischemic induction. The day 0 refers to the symmetry before ischemic induction. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. and were analyzed by two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test. \*,#p<0.05, \*\* p<0.01 \*\*\* p<0.001 comparing between male group in the same day. Animals/group: F-ISC-NE=16; F-ISC-NE-GUO=18; F-ISC-E=14; F-ISC-E-GUO=17; M-ISC=9; M-ISC-GUO=10.**

## Capítulo 2: Metodologias e resultados complementares não publicados

As metodologias dos testes campo aberto, cilindro, labirinto em cruz elevado, bem como as metodologias da imunistoquímica de astrócitos e volume de infarto isquêmico, já foram descritas no artigo publicado. As análises estatísticas também seguem as mesmas descritas no artigo publicado para cada teste comportamental.

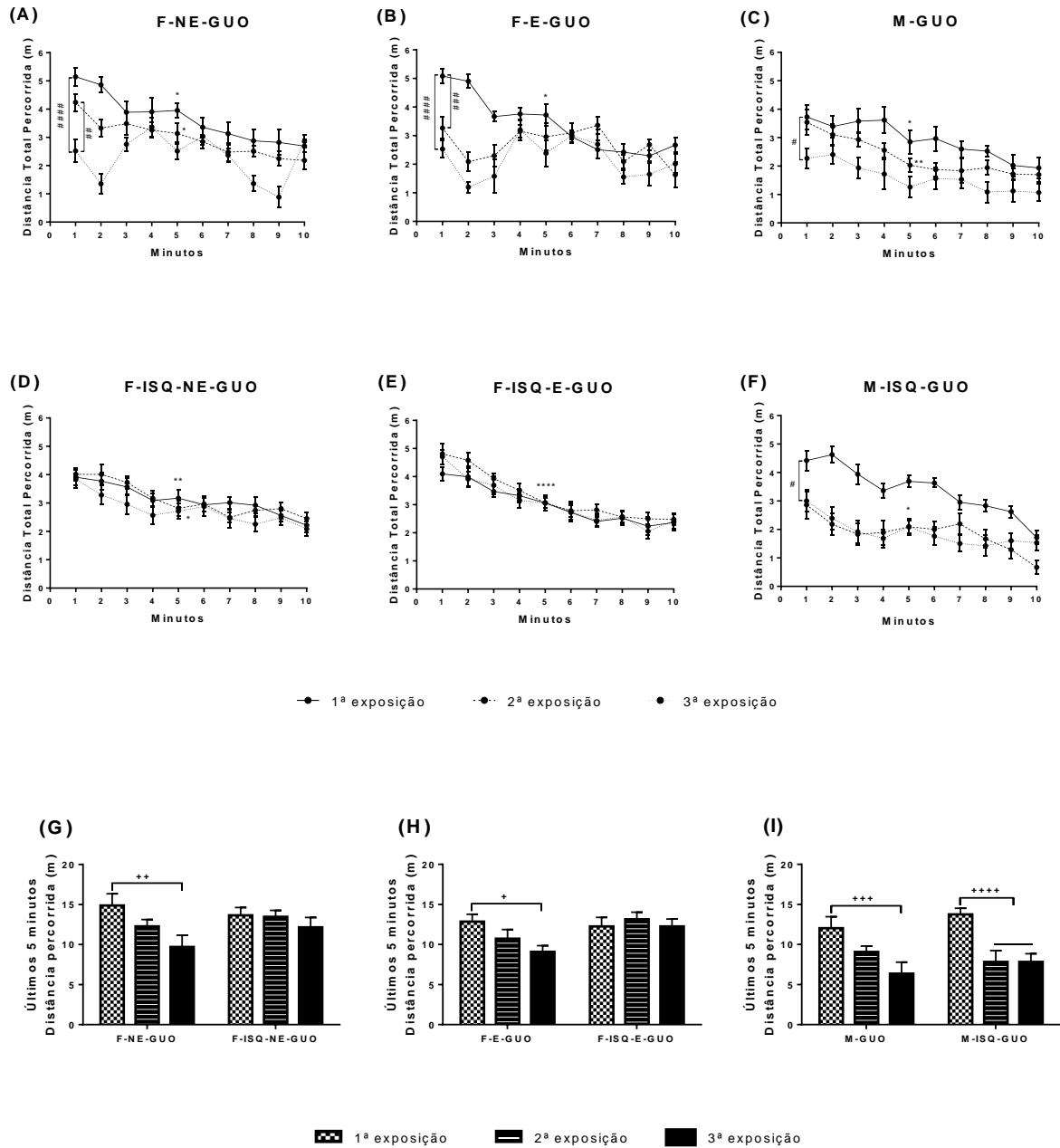
### *Teste do campo aberto*

Assim como nos grupos não tratados, todos os grupos naïves apresentaram memória de habituação de longa duração (diferença entre as sessões no primeiro minuto de cada grupo) (Fig. 6A,  $F(2, 57) = 11,90$ ;  $p < 0,0001$ , Fig. 6B,  $F(2, 54) = 19,26$ ;  $p < 0,0001$ , Fig. 6C,  $F(2, 42) = 19,20$ ;  $p < 0,0001$ ) e de curta duração (diferença entre o primeiro e o quinto minutos em cada sessão do mesmo grupo) (Fig. 6A,  $F(1, 27) = 14,06$ ;  $p < 0,0009$ , Fig. 6B,  $F(1, 27) = 10,58$ ;  $p < 0,0031$ , Fig. 6C,  $F(1, 21) = 24,53$ ;  $p < 0,0001$ ). Os grupos isquêmicos tratados também tiveram o mesmo desfecho dos grupos não tratados: F-ISQ-NE-GUO (Fig. 6D) e F-ISQ-E-GUO (Fig. 6E) não apresentaram diferença estatística quanto a memória de habituação a longo prazo, contudo, o grupo M-ISQ-GUO continuou apresentando (Fig. 6F,  $F(2, 27) = 4,48$ ;  $p < 0,021$ ). Todos os grupos isquêmicos tratados apresentaram memória de habituação de curta duração (Fig. 6D,  $F(1, 51) = 22,01$ ;  $p < 0,0001$ , Fig. 6E,  $F(1, 48) = 48,79$ ;  $p < 0,0001$ , Fig. 6F,  $F(1, 27) = 13,60$ ;  $p = 0,0010$ ).

A locomoção (soma dos últimos 5 minutos da distância percorrida) não foi afetada pelo tratamento com guanosina, pois, assim como nos grupos não tratados, F-ISQ-NE-GUO e F-ISQ-E-GUO não apresentaram diferença estatística entre as exposições. Entretanto, os grupos naïves (Fig. 6G,  $F(2, 52) = 5,749$ ;  $p = 0,0056$ , Fig. 6H,  $F(2, 50) = 2,915$ ;  $p = 0,0635$ , Fig. 6I,  $F(2, 32) = 23,31$ ;  $p = 0,0005$ ) e o grupo M-ISQ-GUO (Fig. 6I,  $F(2, 32) = 23,31$ ;  $p < 0,0001$ ) apresentaram diferença significativa.

A Figura 6J representa a distância total percorrida de todos os grupos, onde não houve diferença significativa. Apenas os grupos naïves sem tratamento apresentaram diferença estatística no parâmetro tempo no centro do aparato, representado pela Figura 6K,  $F(11, 154) = 3,25$ ; F-NE x M ( $p < 0,05$ ); F-E x M ( $p < 0,001$ ), assim como, os grupos de machos isquêmicos sem tratamento

apresentaram diferença estatística no parâmetro distância percorrida no centro do aparato, representado pela Figura 6L,  $F(11, 148) = 2,844$ ; M x M-ISQ ( $p < 0,05$ ).





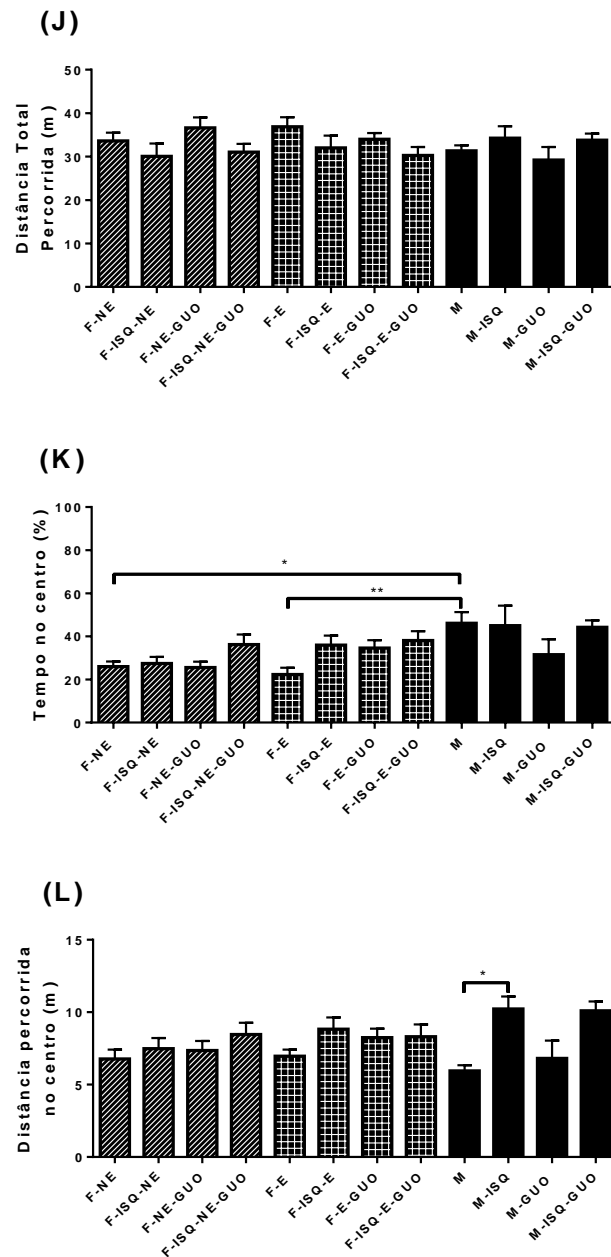
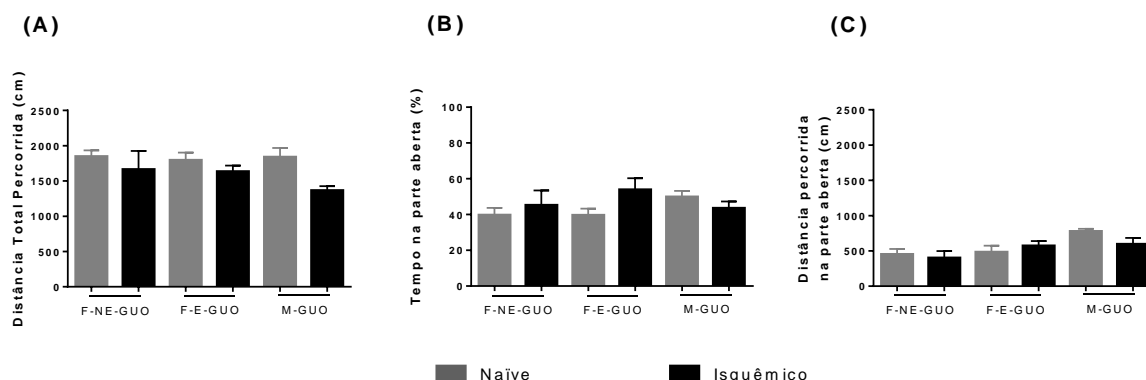


Figura 6 – Teste do campo aberto. Os gráficos de A a F demonstram a memória de habituação a longo prazo (1<sup>o</sup> minuto de cada sessão) e a memória de habituação a curto prazo (diferença entre o 1<sup>o</sup> e o 5<sup>o</sup> minutos de cada sessão). Os gráficos de G a I demonstram a atividade de locomoção/exploração no ambiente (soma dos últimos 5 minutos de cada sessão). O teste foi realizado em três sessões (7, 14 e 28 dias) após a indução isquêmica. Os gráficos de J a L representam a distância total percorrida, o tempo no centro do aparato e a distância percorrida no centro do aparato, respectivamente, de todos os grupos no 7<sup>o</sup> dia após a isquemia. Os dados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. Memória de habituação a longo prazo e atividade de locomoção/exploração no ambiente foram analisadas por one-way ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey, quando comparadas as três sessões no mesmo grupo. Memória de habituação a curto prazo foi analisada por two-way ANOVA seguido de teste *post hoc* de Sidak. Distância total percorrida e tempo no centro foram analisados por one-way ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey (\*, \* $p$ <0.05, \*\*, \*\* $p$ <0.01, \*\*\*, \*\*\*, \*\* $p$ <0.001, \*\*\*, \*\*\*, \*\*\*, \*\* $p$ <0.0001). Animais/grupo: F-NE=20; F-ISQ-NE=16; F-NE-GUO=10; F-ISQ-NE-GUO=18; F-E=19; F-ISQ-E=14; F-E-GUO=10; F-ISQ-E-GUO=17; M=15; M-ISQ=9; M-GUO=8; M-ISQ-GUO=10.

### Teste do labirinto em cruz elevado

Do mesmo modo como nos grupos não tratados, no teste do labirinto em cruz elevado não houve diferença significativa entre os grupos tratados nos parâmetros analisados (Fig. 7A-C).



**Figura 7 – Teste do labirinto em cruz elevado: Distância total percorrida (A), porcentagem de tempo na parte aberta (B) e distância percorrida na parte aberta (C). O teste foi realizado no 30º dia após a isquemia. Os dados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. e foram analisados pelo teste t de student, quando comparados os respectivos grupos naïve GUO e isquêmico GUO. Animais/grupo= F-NE-GUO=10, F-ISQ-NE-GUO=8, F-E-GUO=10, F-ISQ-E-GUO=9, M-GUO=8, M-IS=10.**

### Metodologia e resultados do teste claro/escuro

Este teste foi utilizado para avaliação da ansiedade em roedores (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). O aparato consiste em uma caixa de acrílico retangular, com dois compartimentos, um branco com tampa transparente (claro) e outro preto quase totalmente escuro, com tampa preta. O compartimento claro mede 21 cm de altura x 45 cm de comprimento x 41 cm de largura, iluminado por uma lâmpada com potência de 100 watts a 45 cm acima do centro da caixa e o compartimento escuro mede 21 cm de altura x 35 cm de comprimento x 41 cm de largura. Na parede separatória entre os compartimentos existe uma abertura de 8 cm de altura x 5 cm de comprimento, que permite a passagem do animal para ambos os compartimentos. Para a realização do teste, cada animal foi colocado no compartimento claro e de costas para a abertura, e teve direito a explorar o todo o

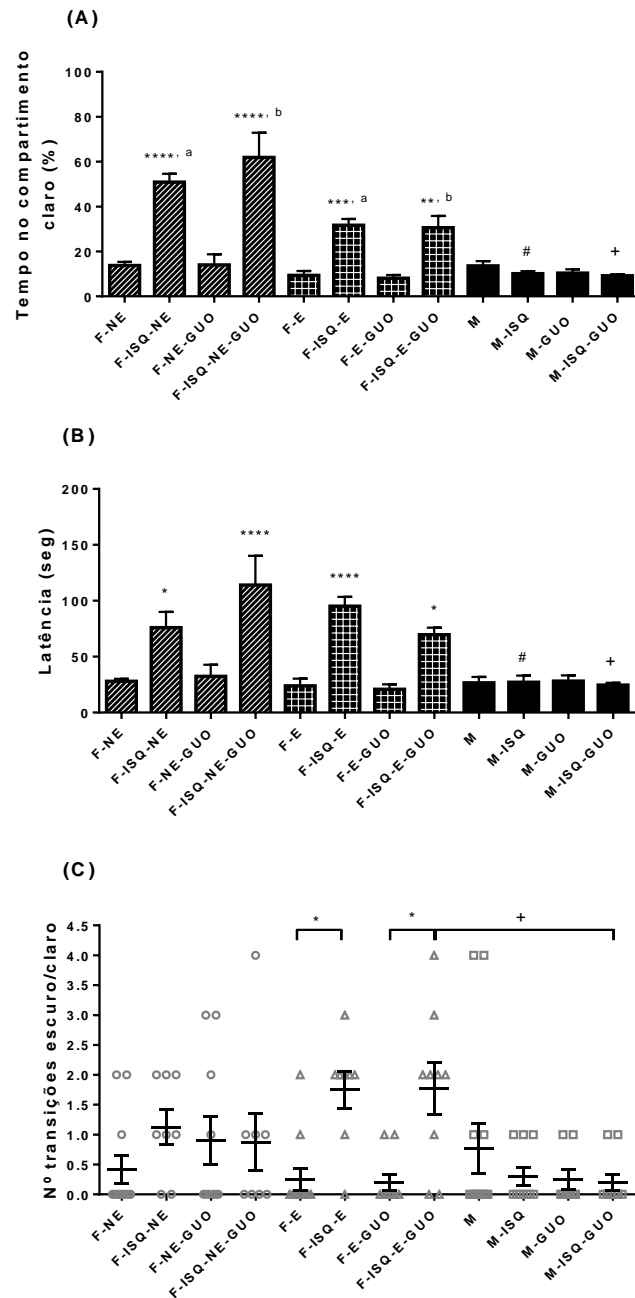


ambiente durante 5 minutos. O teste foi gravado e os parâmetros (tempo no compartimento claro, latência para o lado escuro e número de transições do compartimento escuro para o claro) foram analisados posteriormente. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA seguida por testes *post hoc* no programa Graph Pad Prism 6.0.

O teste claro/escuro é amplamente utilizado para avaliação da ansiedade em roedores adultos, e recentemente, em jovens (STEINBERG, 2008). A Figura 8A representa o tempo gasto no compartimento claro de todos os grupos. Observou-se que as fêmeas isquêmicas, não tratadas e tratadas com guanosina, permaneceram mais tempo no compartimento claro comparadas aos seus respectivos grupos naïves ( $F(11, 131) = 23,68$ ; F-ISQ-NE:  $p < 0,0001$ ; F-ISQ-E:  $p < 0,001$ ; F-ISQ-NE-GUO:  $p < 0,0001$ ; F-ISQ-E-GUO:  $p < 0,01$ ) e aos respectivos grupos isquêmicos de machos (M-ISQ x F-ISQ-NE:  $p < 0,0001$ ; M-ISQ x F-ISQ-E:  $p < 0,001$ ; M-ISQ-GUO x F-ISQ-NE-GUO:  $p < 0,0001$ ; M-ISQ-GUO x F-ISQ-E-GUO:  $p < 0,01$ ). Ainda, quando comparadas fêmeas isquêmicas entre os grupos não estrogênico e estrogênico, não tratado e tratado com guanosina, observou-se que os animais dos grupos não estrogênico permaneceram mais tempo no compartimento claro (F-ISQ-NE x F-ISQ-E:  $p < 0,05$ ; F-ISQ-NE-GUO x F-ISQ-E-GUO:  $p < 0,0001$ ).

A Figura 8B representa a latência (tempo até o animal entrar no compartimento escuro) de todos os grupos. Semelhante ao parâmetro anterior, observou-se que as fêmeas isquêmicas levaram mais tempo até entrar no compartimento escuro comparadas aos seus respectivos grupos naïves ( $F(11, 107) = 11,70$ ; F-ISQ-NE:  $p < 0,05$ ; F-ISQ-E:  $p < 0,0001$ ; F-ISQ-NE-GUO:  $p < 0,0001$ ; F-ISQ-E-GUO:  $p < 0,05$ ) e aos respectivos grupos isquêmicos de machos (M-ISQ x F-ISQ-NE:  $p < 0,05$ ; M-ISQ x F-ISQ-E:  $p < 0,001$ ; M-ISQ-GUO x F-ISQ-NE-GUO:  $p < 0,0001$ ; M-ISQ-GUO x F-ISQ-E-GUO:  $p < 0,05$ ). Entre os grupos não estrogênico e estrogênico não houve diferença significativa.

A Figura 8C representa o número de transições escuro/claro de todos os grupos. Observou-se diferença significativa no grupo F-ISQ-E-GUO quando comparado ao seu respectivo grupo naïve ( $F(11, 106) = 3,093$ ;  $p < 0,05$ ) e quando comparado ao respectivo grupo de machos (F-ISQ-E-GUO x M-ISQ-GUO:  $p < 0,05$ ). Neste gráfico pode-se observar que, apesar da ausência de diferença estatística, os animais que mais transitaram do compartimento escuro para o claro pertencem aos grupos de fêmeas isquêmicas.



**Figura 8 – Teste do claro/escuro: Tempo no compartimento claro (A), latência (B) e número de transições escuro/claro (C). O teste foi realizado no 29º dia após a isquemia. Os dados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. e foram analisados por one-way ANOVA seguido de teste post hoc de Tukey para os parâmetros tempo no compartimento claro e latência, e seguido de teste post hoc de Bartlett para número de transições escuro/claro. <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$ , <sup>\*\*\*\*</sup> $p < 0.0001$  representam a comparação entre o grupo isquêmico e o respectivo grupo naíve, <sup>(a)</sup> representa a comparação entre F-ISQ-NE x F-ISQ-E, <sup>(b)</sup> representa a comparação entre F-ISQ-NE-GUO x F-ISQ-E-GUO, <sup>(#)</sup> representa a comparação entre M-ISQ x F-ISQ-NE e F-ISQ-E, <sup>(+)</sup> representa a comparação entre M-ISQ-GUO x F-ISQ-NE-GUO e F-ISQ-E-GUO. Animais/grupo: F-NE=20; F-ISC-NE=8; F-NE-GUO=10; F-ISQ-NE-GUO=8; F-E=19; F-ISC-E=8; F-E-GUO=10; F-ISQ-E-GUO=9; M=15; M-ISC=19; M-GUO=8; M-ISQ-GUO=10.**

### PARTE III

## **3 DISCUSSÃO**

O AVE (isquêmico e hemorrágico) é uma enfermidade de incidência mundial, de grande relevância clínica pela sua complexidade, em que, não somente o paciente sofre as sequelas, mas também os familiares envolvidos, pois há custos com tratamento e manutenção, além do abalo psicológico (WHO, 2003; BONITA et al., 2004; WARLOW et al., 2008; LANHOME et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Nesta tese, a proposta de trabalho foi estudar a neuroproteção a longo prazo utilizando como tratamento a guanosina, em um modelo de isquemia cerebral cortical focal permanente por termocoagulação em ratos Wistar fêmeas e machos, levando em consideração o ciclo estral das fêmeas. Este estudo foi pioneiro quanto ao tratamento com guanosina em fêmeas neste modelo de AVEI, onde pôde-se comparar os desfechos entre gêneros, entre fêmeas nas fases estrogênica e não estrogênica, entre grupos tratados e controles e entre grupos de animais isquêmicos e não isquêmicos.

Tanto o modelo de AVEI como o tratamento utilizado, já foram previamente estudados em nosso grupo de pesquisa (HANSEL et al., 2014, 2015). Contudo, neste estudo utilizou-se machos e fêmeas, as quais responderam muito bem ao modelo de isquemia e ao tratamento. A maioria dos trabalhos realizados em fêmeas não leva em consideração as fases do ciclo estral. Geralmente, as fêmeas são ovariectomizadas e, dependendo do desenho experimental, estas são tratadas com estrógeno exógeno. Neste estudo, decidiu-se por tentar mimetizar o que realmente ocorre em mulheres, ou seja, verificou-se as fases do ciclo estral das fêmeas através de lavado vaginal no momento da indução isquêmica e estas foram separadas em grupos estrogênico e não estrogênico. Apesar de os resultados de simetria não apresentarem diferença estatística significativa comparando estes grupos de fêmeas, ainda pôde-se observar que as fêmeas da fase estrogênica tiveram melhor recuperação do que as fêmeas da fase não estrogênica.

Independente de os mecanismos bioquímicos da interação da guanosina com os hormônios sexuais de fêmeas não terem sido estudados aqui, pôde-se observar a significativa recuperação sensorimotora (teste do cilindro) em fêmeas comparadas

aos machos, tanto na fase estrogênica como na fase não estrogênica. Sabe-se que o colesterol é o precursor dos hormônios sexuais e há produção destes pelos astrócitos. Ballerini (2006) e colaboradores afirmaram que a guanosina pode modular a homeostase do colesterol no cérebro e aumentar a expressão de apolipoproteína E de astrócitos. Struble (2007) e colaboradores afirmaram que o estradiol estimula o crescimento neural e libera apolipoproteína E pelos astrócitos. Além disso, há envolvimento íntimo entre glia, hormônios sexuais e lipídeos cerebrais. No entanto, esses mecanismos serão estudados futuramente, por isso não serão discutidos nesta tese.

Embora os dados mundiais sobre a epidemiologia do AVE sejam controversos, muitos afirmam que as mulheres apresentam desfechos funcionais inferiores aos homens após um AVEI (PARK et al., 2013). Silva (2010) e colaboradores mostraram que, aos seis meses pós-AVE, as mulheres apresentam pior prognóstico funcional. Além disso, o sexo feminino apresenta função locomotora significativamente pior comparada ao masculino de um a cinco anos após AVEI (FUKUDA et al., 2009). Ainda, já foi relatado que após AVE, as mulheres apresentam maior comprometimento mental (GLADER et al., 2003), depressão (ERIKSSON et al., 2004), fadiga (GLADER et al., 2002) e qualidade de vida geral inferior (FRANZEN-DAHLIN e LASKA, 2012) aos homens. Entretanto, já foi relatado que as mulheres adiam a busca por atendimento aos primeiros sintomas de AVE, o que pode resultar em piores desfechos na recuperação. Ademais, também é necessário considerar se o gênero teve influência no tratamento recebido pelo paciente após o diagnóstico (MANDELZWEIG et al., 2006).

A avaliação comportamental a longo prazo utilizando o modelo focal permanente por termocoagulação dos vasos piais de AVE e o tratamento com guanosina, ambos em fêmeas e machos simultaneamente foi publicada pela primeira vez. Diferentemente do teste do cilindro (recuperação sensorimotora), nos testes campo aberto (avaliação das memórias de habituação, avaliação da locomoção e avaliação da ansiedade), labirinto em cruz elevado (avaliação da ansiedade) e claro/escuro (avaliação da ansiedade), que foram realizados com todos os grupos de animais, o tratamento com guanosina não demonstrou efeito na dose e frequência utilizadas. Tanto os grupos que não receberam tratamento como os grupos tratados responderam igualmente aos testes comportamentais. Em trabalhos anteriores, onde foi utilizada dose muito semelhante de guanosina por via oral

durante duas semanas, os animais tratados apresentaram sinais de amnésia, sem afetar o consumo de água e alimento. Além disso, os animais apresentaram diminuição da locomoção no teste do campo aberto (ROESLER et al., 2000; VINADE et al., 2003). Neste estudo, as fêmeas isquêmicas permaneceram, praticamente, com a mesma taxa de locomoção nas três sessões. Este resultado pode indicar amnésia, pois quando avaliamos memória de habituação em roedores através do teste do campo aberto, normalmente, a locomoção diminui ao longo do tempo e/ou das sessões, como uma manifestação de habituação (SWEATT, 2010).

Interessantemente, neste trabalho as fêmeas isquêmicas de ambos os grupos não estrogênico e estrogênico apresentaram comprometimento da memória de habituação a longo prazo, enquanto que os machos isquêmicos não foram afetados. Estes resultados são contraditórios à literatura, pois muitas pesquisas que utilizaram o estradiol como tratamento em fêmeas ovariectomizadas e machos demonstraram neuroproteção pós-AVEI, melhorando tanto o sistema motor como o sistema cognitivo (HALL et al., 1991; DUBAL et al., 1998; ALKAYED et al., 1998; WESTBERRY et al., 2008). Contudo, diferenças na cognição entre machos e fêmeas foram estudadas por vários pesquisadores, em que descobriram que roedores machos superam as fêmeas em tarefas que requerem memória espacial (WILLIAMS et al., 1990; LUINE e RODRIGUEZ, 1994) e reconhecimento de objeto (BECK e LUINE, 2002; BISAGNO et al., 2003). Em humanos, a literatura não distingue as diferenças cognitivas de acordo com o gênero, porém, a maioria dos estudos relata que após AVE há prejuízo cognitivo agudo e a longo prazo, podendo se estender durante anos. Porém, dependendo da fase do AVE, o comprometimento cognitivo pode variar; em certos casos os indivíduos podem ter progressão dos déficits cognitivos até desenvolverem demência (NYS et al., 2005; LEŚNIAK et al., 2008; PENDLEBURY e ROTHWELL, 2009).

A avaliação da ansiedade pode ser mensurada por uma variedade de testes comportamentais já validados, entretanto, o teste padrão para esta avaliação é o labirinto em cruz elevado (CRUZ e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Neste estudo, não se obteve resultados significativos entre os grupos no labirinto em cruz elevado. Contudo, no parâmetro tempo no centro do teste do campo aberto, os grupos naïve não tratados apresentaram diferença significativa, ou seja, os grupos de fêmeas naïves pareceram apresentar comportamento ansiolítico em relação aos machos naïves. No parâmetro distância percorrida no centro do aparato também existiu

diferença significativa relacionada aos machos, onde o grupo naïve não tratado percorreu menor distância do que os machos isquêmicos não tratados, ou seja, o grupo isquêmico pareceu apresentar comportamento ansiolítico. Apesar da ausência de significância estatística nos grupos de machos tratados, também é notável que os machos isquêmicos tratados pareceram apresentar comportamento ansiolítico em relação ao respectivo grupo naïve tratado.

O teste claro/escuro também avalia a ansiedade e baseia-se na aversão inata que os roedores têm por áreas iluminadas (CRUZ e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). No presente estudo obteve-se uma resposta marcante nos grupos de fêmeas. No parâmetro tempo no compartimento claro, tanto as fêmeas isquêmicas tratadas como as não tratadas permaneceram tempo significativamente maior no centro do aparato comparadas às respectivas naïves e aos machos isquêmicos não tratados e tratados. Além disso, quando comparadas fêmeas isquêmicas não estrogênicas e estrogênicas, com tratamento e sem tratamento, também se observou diferença significativa, ou seja, as fêmeas dos grupos não estrogênicos pareceram apresentar comportamento ansiolítico em relação as fêmeas dos grupos estrogênicos. Em relação ao tempo de latência, obteve-se diferença estatística nos grupos de fêmeas isquêmicas, tratadas e não tratadas, comparados aos respectivos grupos naïves e aos grupos de machos isquêmicos tratados e não tratados, ou seja, novamente as fêmeas pareceram apresentar comportamento ansiolítico. Outro parâmetro analisado foi o número de transições escuro/claro, em que os grupos de fêmeas isquêmicas estrogênicas tratadas e não tratadas apresentaram diferença significativa comparadas aos seus respectivos grupos naïves. Ainda, o grupo de fêmeas isquêmicas estrogênico tratado foi significativamente diferente comparado ao grupo de machos isquêmicos tratado. Além da atividade ansiolítica, o número de transições escuro/claro também está relacionado a locomoção dos animais, quanto menor o número de transições, menos o animal se locomoveu durante o teste (CRUZ e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Ainda neste parâmetro pode-se inferir que os grupos que não fizeram transições escuro/claro permaneceram no compartimento escuro, entretanto, não foi mensurada a distância percorrida dos animais nos diferentes compartimentos.

De acordo com os dados comportamentais obtidos pôde-se observar diferentes respostas. A literatura apresenta uma gama de protocolos sobre testes comportamentais em roedores. Neste trabalho, optou-se por avaliar a ansiedade a

longo prazo, após a cirurgia isquêmica, através de dois principais testes: claro/escuro e labirinto em cruz elevado (29<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias pós-cirurgia, respectivamente). A avaliação da ansiedade através do teste do campo aberto foi realizada somente na primeira sessão (7<sup>o</sup> dia após a indução isquêmica), pois, usualmente, para avaliação desse parâmetro os testes são realizados uma única vez. Embora o teste do labirinto em cruz elevado seja o padrão ouro para avaliação da ansiedade em roedores, a avaliação pelo teste claro/escuro pareceu ser mais sensível neste estudo. Milot e Plamondon (2009) utilizaram o teste do labirinto em cruz elevado e observaram efeito ansiogênico 24 horas após a isquemia, efeito ansiolítico após 5 dias e nenhum efeito na ansiedade após 15 e 30 dias. Entretanto, Nemeth (2014) e colaboradores, utilizando o mesmo teste comportamental, observaram efeito ansiogênico em machos, mas não em fêmeas, 14 dias após a indução isquêmica. Dados da literatura são escassos em relação ao teste claro/escuro em fêmeas, principalmente em modelos de AVE.

Na rotina clínica humana, as mulheres relatam maior incidência de depressão e ansiedade após o AVE (BUSHNELL et al., 2014), e a doença cerebrovascular parece ser mais depressogênica entre mulheres do que homens (WENDELL et al., 2010). Os resultados das variáveis referentes à influência do gênero no resultado da isquemia não permitem generalizações claras, mas indicam que os efeitos observados em homens não podem ser confiavelmente extrapolados para as mulheres.

Os astrócitos desempenham muitos papéis essenciais para a função cerebral normal, agindo como controladores globais no SNC, pois modulam o ambiente local e coordenam as respostas celulares em distâncias maiores (VERKHRATSKY e BUTT, 2013; PEKNY e PEKNA, 2014; ROSSI, 2015). Durante o AVE, a interrupção das funções astrocíticas contribui tanto para um comprometimento inicial rápido da neurotransmissão quanto para o desenvolvimento subsequente do infarto (MOSKOWITZ et al., 2010; TURNER et al., 2013; GEORGE e STEINBERG, 2015). Essas células multifuncionais estão em constante adaptação genética e morfológica, dependendo do tipo e severidade do insulto tecidual. No tecido normal estão dispostos como não-reativos ou não-ramificados, entretanto, no tecido lesado, eles mudam rapidamente seu fenótipo, tornando-se hipertróficos (aumento de GFAP) e ramificados ou estrelados (PEKNY e PEKNA, 2014).

Na análise imunohistoquímica deste estudo, não se obteve resultados significativos quando comparados gênero, tratamento e fases do ciclo estral de fêmeas. A diferença estatística esteve presente apenas na análise quantitativa de astrócitos ramificados e não-ramificados. Bao (2012) e colaboradores afirmaram que após um AVE, os astrócitos se tornam reativos após cerca de dois dias a uma semana, e formam uma cicatriz ao redor do núcleo isquêmico em, aproximadamente, duas semanas. Em outro recente estudo utilizando método diferente de indução isquêmica, Mestriner (2015) e colaboradores observaram astrócitos reativos (ramificados) 30 dias após a lesão. Neste estudo, a maioria dos astrócitos observados apresentou fenótipo não-ramificado, o que pode ser explicado pela avaliação a longo prazo (50 dias após a cirurgia isquêmica).

A proliferação de astrócitos (astrocitose) e a gliose reativa (mudança fenotípica do astrócito) podem aumentar o dano neuronal (AREVALO et al., 2013). Entretanto, Sofroniew e Vinters (2010) demonstraram que a astrogliose reativa ocorre em resposta a uma variedade de doenças e traumas cerebrais, e essa resposta parece ajudar na recuperação após lesão cerebral (LIU et al., 2015).

Vários estudos evidenciaram que o tratamento com estrogênio e progesterona reduziu a proliferação de astrócitos após lesão cerebral (GARCIA-ESTRADA et al., 1993, 1999; DJEBAILI et al., 2005; PEREZ-ALVAREZ et al., 2012). Diferenças na expressão de GFAP do hipocampo de machos e fêmeas adultos foram observadas e o número de células GFAP positivas variou com o ciclo estral (ARIAS et al., 2009). Imagens ao vivo de um cérebro isquêmico apresentaram significativamente maior marcação de GFAP em camundongos fêmeas adultas no diestro comparadas aos machos, e essa sobre regulação de GFAP em resposta à isquemia foi dependente do ciclo estral e consequente nível sérico de estrogênio (CORDEAU et al., 2008).

O efeito neuroprotetor em fêmeas na lesão isquêmica é evidente mesmo na presença de fatores de risco específicos, como diabetes e hipertensão (TOUNG et al., 2000), contudo, esse efeito é abolido pela ovariectomia e pela senescência reprodutiva (declínio nos níveis circulantes de estrogênio e progesterona) (ALKAYED et al., 2000). Uma variedade de trabalhos experimentais revelaram que tanto o estrogênio quanto a progesterona são potenciais hormônios neuroprotetores após um AVEI (GIBSON et al., 2006, 2009). No entanto, ensaios clínicos que examinaram o estrogênio como tratamento após AVEI não obtiveram resultados



positivos e, até o momento, nenhum ensaio clínico foi projetado para examinar especificamente a neuroproteção da progesterona após AVEI (GIBSON, 2013).

Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, apontaram que as diferenças de gênero influenciam o resultado após a indução isquêmica (SIMPSON et al., 2005). O tamanho de infarto é menor em roedores fêmeas comparadas aos machos após um AVE experimental (WISE et al., 2001; CHENG e HURN, 2009). Contrariando os resultados destes autores, neste trabalho não se obteve diferença estatística entre os grupos de machos e fêmeas, entre fases estrogênica e não estrogênica e entre tratado e não tratado no tamanho da lesão isquêmica 48 horas após a cirurgia. Como foi o primeiro trabalho realizado com machos e fêmeas, utilizando o modelo de AVEI por termocoagulação e tratamento com guanosina, futuras pesquisas serão necessárias para o entendimento dos mecanismos abordados nesta tese.

Finalizando, nas últimas décadas, a incidência de AVEI aumentou, afetando homens e mulheres em todo o mundo (FEIGIN et al, 2017). No entanto, a maioria das pesquisas experimentais *in vivo* ainda são realizadas apenas com machos, mesmo que o enfoque do estudo seja no metabolismo de fêmeas. Assim, considerando que pesquisas pré-clínicas envolvendo guanosina em AVEI também sejam realizadas apenas com animais machos, e que estudos epidemiológicos apontem para a relevância do AVE em mulheres, motivou-se em iniciar uma pesquisa sobre AVE em ratas, valorizando as fases o ciclo estral e o uso de guanosina como tratamento. Também foi avaliada a evolução a longo prazo da recuperação pós-AVE, quando na maioria das publicações os animais são avaliados a curto prazo, com o objetivo de identificar possíveis diferenças nas respostas de ratos fêmeas e machos. Como foram observadas diferentes respostas em ratos fêmeas e machos, futuramente investigar-se-ão os mecanismos possivelmente envolvidos nessas diferenças. Em etapas adicionais, pretende-se determinar possíveis alvos para efeitos neuroprotetores da guanosina que poderiam explicar as diferenças observadas entre machos e fêmeas.

#### **4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Com os resultados obtidos nesta tese foi possível concluir que a guanosina agiu a longo prazo, melhorando a recuperação sensorimotora, principalmente em fêmeas. Contudo, as memórias de curto e longo prazo, a locomoção, a ansiedade, a astrogliose, bem como o volume de infarto não foram alterados pelo tratamento com guanosina. Também foi possível concluir que o modelo de AVEI utilizado teve desfechos diferentes de acordo com o gênero e fases do ciclo estral em fêmeas.

Esses resultados permitem que futuras pesquisas acerca do mecanismo de ação da guanosina em fêmeas e machos, a curto e longo prazo, e a implicação dos hormônios sexuais neste metabolismo sejam realizadas, utilizando o mesmo modelo de AVEI.

## 5 REFERÊNCIAS

ADAMS, H. P. JR et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. **Stroke**, v. 24, n. 1, p. 35-41. 1993.

ALBRECHT, J.; JONES, E. A. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. **J Neurol Sci**, v. 170, p. 138-146. 1999.

ALEU, J et al. Guanine nucleotides, including GMP, antagonize kainate responses in *Xenopus* oocytes injected with chick cerebellar membranes. **Journal of neurochemistry**, v. 72, p. 2170-2176. 1999.

ALKAYED, N. J et al. Gender-linked brain injury in experimental stroke. **Stroke**, v. 29, p. 159–165; discussion 166. 1998.

ALKAYED, N. J et al. Neuroprotective effect of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. **Stroke**, v. 31, p. 161–168. 2000.

ALMEIDA, R. F et al. Guanosine anxiolytic-like effect involves adenosinergic and glutamatergic neurotransmitter systems. **Mol Neurobiol**, 2016. doi: 10.1007/s12035-015-9660-x

AMARENCO, P et al. Classification of stroke subtypes. **Cerebrovasc Dis**, v. 27, p. 493–501. 2009.

APPELROS, P.; STEGMAYR, B.; TARENT, A. Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review. **Stroke**, v. 40, p. 1082–1090. 2009.

AREVALO, M. A et al. Gonadal hormones and the control of reactive gliosis. **Horm Behav**, v. 63, p. 216–221. 2013.

ARIAS, C et al. Sex and estrous cycle-dependent differences in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the adult rat hippocampus. **Horm Behav**, v. 55, p. 257–263. 2009.

BACIGALUPPI, M.; COMI, G.; HERMANN, D. M. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. **Open Neurol J**, v. 4, p. 34–38. 2010.

BADDELEY, A. Is Working Memory Still Working? **European Psychologist**, v. 7, n. 2, p. 85-97. 2002.

BADDELEY, A. The episodic buffer: a new component of working memory? **Trends in Cognitive Sciences**, v. 4, n. 11, p. 417-423. 2000.

BADDELEY, A. Working Memory, Thought, and Action. Oxford Psychology Series, Oxford University Press. 2007. 432p.

BADDELEY, A. Working Memory. In: BADDELEY, A.; EYSENCK, M. W.; ANDERSON, M. C. (Eds.) **Memory**. New York: Psychology Press. 2009. p. 41-68.

BADDELEY, A. Working Memory: looking back and looking forward. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 10, p. 829-839. 2003.

BAILEY, A. L.; SCANTLEBURY, D. C.; SMYTH, S. S. Thrombosis and antithrombotic therapy in women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, p. 284–288. 2009.

BALLERINI, P et al. Guanosine effect on cholesterol efflux and apolipoprotein E expression in astrocytes. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 637-649. 2006. doi: 10.1007/s11302-006-9011-5

BAO, Y et al. CD36 is involved in astrocyte activation and astroglial scar formation. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 32, p. 1567–1577. 2012. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.52>

BARON, B. M et al. Guanine nucleotides are competitive inhibitors of N-methyl-D-aspartate at its receptor site both in vitro and in vivo. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 250, p. 162-169. 1989.

BARRETT, K. M et al. Sex differences in stroke severity, symptoms, and deficits after first-ever ischemic stroke. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 16, p. 34–39. 2007.

BARRETT-CONNOR, E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women BASIC KES, V et al. Pro- inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute ischemic stroke and their relation to early neurological deficit and stroke outcome. **Clin Biochem**, v. 41, p. 1330–1334. 2008.

BECK, K. D.; LUINE, V. N. Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: role of housing conditions. **Physiol Behav**, v. 75, p. 661–673. 2002.

BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, n. 3, p. 565–572. 2011. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.07.002

BEKKER, M. H.; VAN MENS-VERHULST, J. Anxiety disorders: sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment. **Gend Med**, v. 4 (Suppl B), S178–S193. 2007.

BERGER, J. S et al. Sex differences in mortality following acute coronary syndromes. **JAMA**, v. 302, p. 874–882. 2009.

BETTIO, L. E et al. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behavioural brain research**, v. 234, p. 137-148. 2012.

BETTIO, L. E. B.; GIL-MOHAPEL, J.; RODRIGUES, A. L. S. Guanosine and its role in neuropathologies. **Purinergic Signalling**, v. 12, p. 411–426. 2016. doi:10.1007/s11302-016-9509-4

BEZZI, P et al. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. **Nat Neurosci**, v. 7, p. 613–620. 2004.

BIDMON, H. J et al. Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. **Neuroscience**, v. 82, p. 397–420. 1998.

BILLECI, A. M. R et al. Hormone replacement therapy and stroke. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 6, n. 2, p. 112–123. 2008.

BISAGNO, V.; FERGUSON, D.; LUINE, V. N. Chronic d-amphetamine induces sexually dimorphic effects on locomotion, recognition memory and brain monoamines. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, p. 859–867. 2003.

BONITA, R et al. The global stroke initiative. **Lancet Neurol**, v. 3, p. 391–93. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde 2014. **Acidente Vascular Cerebral (AVC)**. Disponível em < <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/04/acidente-vascular-cerebral-avc>>. Acesso em: 20/03/2018.

BRIDGES, R et al. Thinking outside the cleft to understand synaptic activity: contribution of the cystine-glutamate antiporter (System xc-) to normal and pathological glutamatergic signaling. **Pharmacol Rev**, v. 64, p. 780–802. 2012. doi:10.1124/pr.110.003889

BROUGHTON, B. R. S.; REUTENS, D. C.; SOBEY, C. G. Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. **Stroke**, v. 40, E331-E9. 2009.

BRUNO, V et al. The impact of metabotropic glutamate receptors into active neurodegenerative processes: A "dark side" in the development of new symptomatic treatments for neurologic and psychiatric disorders. **Neuropharmacology**, v. 15, n. 115, p. 180-192. 2017. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.04.044.

BURGOS, J. S et al. Guanine nucleotides protect against kainate toxicity in an ex vivo chick retinal preparation. **FEBS letters**, v. 430, p. 176-180. 1998.

BURGOS, J. S.; BARAT, A.; RAMIREZ, G. Ca<sup>2+</sup>-dependent kainate excitotoxicity in the chick embryonic neural retina ex vivo. **Neuroreport**, v. 11, p. 3855-3858. 2000b.

BURGOS, J. S.; BARAT, A.; RAMIREZ, G. Guanine nucleotides block agonist-driven <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx in chick embryo retinal explants. **Neuroreport**, v. 11, p. 2303-2305. 2000a.

BURGOS, J. S.; BARAT, A.; RAMIREZ, G. Guanine nucleotides block agonist-driven <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx in chick embryo retinal explants. **Neuroreport**, v. 11, p. 2303-2305. 2000c.

BUSH, T. G et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. **Neuron**, v. 23, p. 297–308. 1999.

BUSHNELL, C et al. Guidelines for the prevention of stroke in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 45, p. 1545–1588. 2014.

BUSKILA Y et al. Rapid and reactive nitric oxide production by astrocytes in mouse neocortical slices. **Glia**, v. 52, p. 169–176. 2005.

BUTCHER, S. P.; ROBERTS, P. J.; COLLINS, J. F. Purine nucleotides inhibit the binding of DL-[3H] 2-amino-4-phosphonobutyrate (DL-[3H] APB) to L-glutamate sensitive sites on rat brain membranes. **Biochemical pharmacology**, v. 35, p. 991-994. 1986.

CARMICHAEL, S. T. Brain excitability in stroke: the yin and yang of stroke progression. **Arch Neurol**, v. 69, p. 161–167. 2012.

CARMICHAEL, S. T. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. **Ann Neurol**, v. 59, p. 735–742. 2006.

CARMICHAEL, S. T. The 3 Rs of stroke biology: radial, relayed, and regenerative. **Neurotherapeutics**, v. 13, p. 348–359. 2016.

CHANG, R et al. Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo. **Neuroscience letters**, v. 431, p. 101-105. 2008.

CHANG, T. R et al. Factor VIII in the setting of acute ischemic stroke among patients with suspected hypercoagulable state. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 20, n. 2. p. 124–128. 2014.

CHELLAPPAN, K et al. Post-stroke Brain Memory Assessment Framework. **Conference:** 2012 IEEE EMBS International Conference on Biomedical Engineering and Science, 2012. doi: 10.1109/IECBES.2012.6498190.

CHEN, X et al. Longitudinal Metabolomics Profiling of Parkinson's Disease-Related alpha-Synuclein A53T Transgenic Mice. **PloS one**, 10:e0136612. 2015.

CHEN, Y.; SWANSON, R. A. Astrocytes and brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 23, p. 137–149. 2003.

CHENG, J.; HURN, P. D. Sex shapes experimental ischemic brain injury. **Steroids**, v. 75, p. 754–759. 2009.

CICCARELLI, R et al. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **Int J Dev Neurosci**, v. 19, p. 395–414. 2001. doi: 10.1016/S0736-5748(00)00084-8

CLARKE, S. R et al. Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. **Neuro Report**, v. 5, p. 1885–1888. 1994.

CONNELL, B. J et al. Guanosine protects against reperfusion injury in rat brains after ischemic stroke. **Journal of neuroscience research**, v. 91, p. 262-272. 2013.

CORDEAU, Jr. P et al. Live imaging of neuroinflammation reveals sex and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury. **Stroke**, v. 39, p. 935–942. 2008.

CRAMER, S. C. Repairing the human brain after stroke, I: mechanisms of spontaneous recovery. **Ann Neurol**, v. 63, n. 3, p. 272–287. 2008.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 13, n. 2, p. 167–170. 1980.

CRUZ, A. P. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FUKUSIMA, S. (org), **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Manole, 2012, p. 192 – 217.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, p. 1–105. 2001.

DANIELS, K.; MOSHER, W. D.; JONES, J. Contraceptive methods women have ever used: United States, 1982–2010. **Natl Health Stat Rep**, v. 62, n. 20. 2013.

DAS NAIR, R et al. Cognitive rehabilitation for memory deficits after stroke. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 9, CD002293. 2016. doi: 10.1002/14651858.CD002293.pub3.

DI LIBERTO, V et al. Identification of GPR23/LPA4 as a candidate G protein-coupled receptor for guanosine. In: THE 63RD NATIONAL CONGRESS OF THE ITALIAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, 206, 2012, Verona, Italia. **Resumos... Acta Physiologica**, supplement 692, 2012.



DIAS, L. B. T.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Neuropsicologia do desenvolvimento da memória: da pré-escola ao período escolar. **Rev Neuropsicol Latinoamericana**, v. 3, n. 1, p. 19-26. 2011.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci**, v. 22, p. 391-397. 1999.

DJEBAILI, M et al. The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. **J Neurotrauma**, v. 22, p. 106–118. 2005.

DUBAL, D. B et al. Estradiol protects against ischemic injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 18, p. 1253–1258. 1998.

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 87, p. 179-197. 2007.

EL MESTIKAWY, S et al. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, p. 204–216. 2011.

ELKINS, J. S et al. Education and the cognitive decline associated with MRI defined brain infarct. **Neurology**, v. 67, p. 435–440. 2006.

ERECINSKA, M.; SILVER, I. A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog Neurobiol**, v. 35, p. 245–296. 1990.

ERIKSSON, M et al. Selfreported depression and use of antidepressants after stroke. **Stroke**, v. 35, p. 936–941. 2004.

FAULKNER, J. R et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 24, p. 2143–2155. 2004.

FEATHERSTONE, D. E. Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond. **ACS Chem Neurosci** v. 1, p. 4-12. 2010.

FISH, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 8, p. 737–744. 2008.

FRANZEN-DAHLIN, A.; LASKA, A. C. Gender differences in quality of life after stroke and TIA: a cross-sectional survey of out-patients. **J Clin Nurs**, v. 21, p. 2386–2391. 2012.

FUCHS, E.; CLEVELAND, D. W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. **Science**, v. 279, p. 514–519. 1998.

FUKUDA, M, et al. Gender differences in long-term functional outcome after first-ever ischemic stroke. **Inter Med**, v. 48, p. 967–973. 2009.

GAGE, F. H et al. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. **Journal of neurobiology**, v. 36, p. 249-266. 1998.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1433-1438. 2000.

GALL, S. L et al. Sex differences in presentation, severity, and management of stroke in a populationbased study. **Neurology**, v. 74, p. 975–981. 2010.

GANZELLA, M et al. Effects of chronic guanosine treatment on hippocampal damage and cognitive impairment of rats submitted to chronic cerebral hypoperfusion. **Neurol Sci**, v. 33, p. 985-997. 2012.

GARCIA-ESTRADA, J et al. Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury. **Int J Dev Neurosci**, v. 17, p. 145–151. 1999.

GARCIA-ESTRADA, J et al. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. **Brain Res**, v. 628, p. 271–278. 1993.

GEARY, G. G.; KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P. Estrogen reduces myogenic tone through a nitric oxide-dependent mechanism in rat cerebral arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 275, n. 1, p. 292–300. 1998.

GEORGE, P. M.; STEINBERG, G.K et al. Novel stroke therapeutics: unraveling stroke pathophysiology and its impact on clinical treatments. **Neuron**, v. 87, 297e309. 2015.

GIBSON, C. L et al. Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 26, p. 1103–1113. 2006.

GIBSON, C. L. Cerebral ischemic stroke: is gender important? **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 33, p. 1355–1361, 2013.

GIBSON, C. L.; COOMBER, B.; RATHBONE, J. Is progesterone a candidate neuroprotective factor for treatment following ischemic stroke? **Neuroscientist**; v. 15, p. 324–332. 2009.

GINSBERG, M. D. The new language of cerebral ischemia. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 18, p. 1435-1445. 1997.

GIULIANI, P et al. Tissue distribution and metabolism of guanosine in rats following intraperitoneal injection. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 26, p. 51-65. 2012.

GLADER, E. L et al. Sex differences in management and outcome after stroke: a Swedish national perspective. **Stroke**, v. 34, p. 1970–1975. 2003.

GLADER, E. L.; STEGMAYR, B.; ASPLUND, K. Poststroke fatigue: a 2-year follow-up study of stroke patients in Sweden. **Stroke**, v. 33, p. 1327–1333. 2002.

GLOBUS, M. Y et al. Intra-ischemic extracellular release of dopamine and glutamate is associated with striatal vulnerability to ischemia. **Neurosci Lett**, v. 91, p. 36–40. 1988.

GLOBUS, M. Y et al. Ischemia induces release of glutamate in regions spared from histopathologic damage in the rat. **Stroke**, v. 21, p. 43–46. 1990.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61-84. 2013.

GREWER, C.; RAUEN, T. Electrogenic glutamate transporters in the CNS: molecular mechanism, pre-steady-state kinetics, and their impact on synaptic signaling. **J Membr Biol**, v. 203, p. 1–20. 2005. doi:10.1007/s00232-004-0731-6

GRILLO, M et al. Brain expression and 3H-guanosine binding analysis of novel G protein-coupled receptor for guanosine (GPR23/LPA4). In: THE 63RD NATIONAL CONGRESS OF THE ITALIAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, 206, 2012, Verona, Italia. **Resumos...** Acta Physiologica, supplement 692, 2012.

GRIS, P et al. Transcriptional regulation of scar gene expression in primary astrocytes. **Glia**, v. 55, p. 1145–1155. 2007.

GUNN, A et al. The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. **J Pain**, v. 12, p. 222-227. 2011.

GURER, G et al. Astrocytes are more resistant to focal cerebral ischemia than neurons and die by a delayed necrosis. **Brain Pathol**, v. 19, p. 630–641. 2009.

GURSOY-OZDEMIR, Y.; CAN, A.; DALKARA, T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 35, p. 1449–1453. 2004.

GUTIÉRREZ PÉREZ, C et al. High frequency of cognitive dysfunction before stroke among older people. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 26, p. 622–629. 2011.

DOUIRI, A.; RUDD, A. G.; WOLFE, C. D. Prevalence of poststroke cognitive impairment: South London Stroke Register 1995–2010. **Stroke**, v. 44, p. 138–145. 2013.

HAAST, R. A.; GUSTAFSON, D. R.; KILIAAN, A. J. Sex differences in stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 32, p. 2100-2107. 2012.

HALL, E. D.; PAZARA, K. E.; LINSEMAN, K. L. Sex differences in postischemic neuronal necrosis in gerbils. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 11, p. 292–298. 1991.

HANSEL, G et al. Guanosine Protects Against Cortical Focal Ischemia. Involvement of Inflammatory Response. **Mol Neurobiol**, v. 52, p. 1791-1803. 2015.

HANSEL, G et al. The potential therapeutic effect of guanosine after cortical focal ischemia in rats. **PLoS ONE**, 9: e90693. 2014.

HEIKAL, N. M et al. Elevated Factor IX activity is associated with an increased odds ratio for both arterial and venous thrombotic events. **Am J Clin Pathol**, v. 140, n. 5, p. 680–685. 2013.

HILLERED, L et al. Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 9, p. 607–616. 1989.

HOLMIN, S et al. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. **Eur J Neurosci**, v. 9, p. 65–75. 1997.

HOOD, W. F et al. Guanine nucleotide modulation of [3H] TCP binding to the NMDA receptor complex. **European journal of pharmacology**, v. 188, p. 43-49. 1990.

IHLE-HANSEN, H et al. Incidence and subtypes of MCI and dementia 1 year after first-ever stroke in patients without pre-existing cognitive impairment. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 32, p. 401–407. 2011.

IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? **The Lancet Neurology**, v. 1, p. 383-386. 2002.  
IZQUIERDO, I. A et al. Memória: Tipos e mecanismos – achados recentes. **Revista USP**, v. 98, p. 9-16. 2013.

IZQUIERDO, I. Mechanism of action of scopolamine as an amnestic. **Trends Pharmacol Sci**, v. 10, n. 5, p. 175-177. 1989.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 2a ed. Porto Alegre, ArtMed, 2011.

IZQUIERDO, L. A et al. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cell Mol Neurobiol**, v. 22, n. 3, p. 269-287. 2002.

JACKSON, E. K.; MI, Z. The guanosine-adenosine interaction exists in vivo. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 350, p. 719-726. 2014.

JACQUIN, A et al. Poststroke cognitive impairment: high prevalence and determining factors in a cohort of mild stroke. **J Alzheimers Dis**, v. 40, p. 1029–1038. 2014.

JIANG, S et al. Metabolism and distribution of guanosine given intraperitoneally: implications for spinal cord injury. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 27, p. 673-680. 2008a.

JIANG, S et al. Remyelination after chronic spinal cord injury is associated with proliferation of endogenous adult progenitor cells after systemic administration of guanosine. **Purinergic signalling**, v. 4, p. 61-71. 2008b.

JORGENSEN, M. B.; DIEMER, N. H. Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: possible role of transmitter glutamate. **Acta Neurol Scand**, v. 66, p. 536–546. 1982.

KAJIHARA, H et al. Activated astrocytes with glycogen accumulation in ischemic penumbra during the early stage of brain infarction: immunohistochemical and electron microscopic studies. **Brain Res**, v. 909, p. 92–101. 2001.

KANDEL, E. R.; JAMES, H. S.; THOMAS, M. J. Principles of Neural Science, 5th Ed. McGraw-Hill Education, 2012. 1760p.

KINGSTON, A. E et al. Neuroprotective actions of novel and potent ligands of group I and group II metabotropic glutamate receptors. **Ann N Y Acad Sci**, v. 890, p. 438–449. 1999.

KRAKAUER, J. W. Motor learning: its relevance to stroke recovery and neurorehabilitation. **Curr Opin Neurol**, v. 19, p. 84–90. 2006.

KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P.; PELLIGRINO, D. A. Influence of sex steroid hormones on cerebrovascular function. **J Appl Physiol**, v. 101, n. 4, p. 1252–1261. 2006.

LAMB, F et al. Predictors of subjective cognitive complaint in postacute older adult stroke patients. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 94, n. 9, p. 1747–52. 2013.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Amnésias. In: BRANDÃO, M. L.; GRAEFF, F. G. (Orgs.), **Neurobiology of Mental Disorders**. Nova York: Nova Publishers. 2006. p. 157-187.

LANGHORNE, P.; SANDERCOCK, P.; PRASAD, K. Evidence-based practice for stroke. **Lancet Neurol**, v. 8, p. 308–09. 2009.

LANZMASTER D et al. Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. **Aging and Disease**, v. 7, n. 5, p. 657-679. 2016. doi: 10.14336/AD.2016.0208

LEŚNIAK, M et al. Frequency and prognostic value of cognitive disorders in stroke patients. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 26, n. 4, p. 356-363. 2008.

LI, Y.; CHOPP, M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. **Brain Res**, v. 838, p. 1–10. 1999.

LINCOLN, N. B et al. **Psychological Management of Stroke**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 1431-568. 1999.

LIU, F et al. VEGF overexpression enhances the accumulation of phospho-S292 MeCP2 in reactive astrocytes in the adult rat striatum following cerebral ischemia. **Brain Res**, v. 1599, p. 32–43. 2015.

LIU, Z.; CHOPP, M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. **Progress in Neurobiology**, v. 144, p. 103-120. 2016. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.008

LOMBROSO, P. Aprendizado e memória. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 3, p. 207-210. 2004.

LUINE, V.; RODRIGUEZ, M. Effects of estradiol on radial arm maze performance of young and aged rats. **Behav Neural Biol**, v. 62, p. 230–236. 1994.

LURIA, A. H. Memória. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentos de Neuropsicologia**, São Paulo, Edusp. 1981. p. 245-265.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis - an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 3-15. 1995.

MANDELZWEIG, L et al. Perceptual, social, and behavioral factors associated with delays in seeking medical care in patient with symptoms of acute stroke. **Stroke**, v. 37, p. 1248–1253. 2006.

MATSUI, T et al. Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part I: Enhanced astrocytic synthesis of s-100beta in the periinfarct area precedes delayed infarct expansion. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 22, p. 711–722. 2002.

MATTSON, M. P. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. **Neurochem Res**, v. 30, p. 883–893. 2005.

MCKEON, R. J et al. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. **J Neurosci**, v. 11, p. 3398–3411. 1991.

MELDRUM, B. S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **Neurology**, v. 44, p. S14-23. 1994.

MESTRINER, R. G et al. Astrocyte morphology after ischemic and hemorrhagic experimental stroke has no influence on the different recovery patterns. **Behav Brain Res**, v. 278, p. 257–261. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.005>

MILLER, B. R.; HEN, R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. **Current opinion in neurobiology**, v. 30, p. 51-58. 2015.

MILOT, M. R.; PLAMONDON, H. Time-dependent effects of global cerebral ischemia on anxiety, locomotion, and habituation in rats. **Behav Brain Res**, v. 200, n. 1, p. 173–180. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de rotinas para atenção ao AVC**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_rotinas\\_para\\_atencao\\_avc.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_rotinas_para_atencao_avc.pdf)

MONAHAN, J. B et al. Effects of guanine nucleotides on N-methylD-aspartate receptor-ligand interactions. **Molecular pharmacology**, v. 34, p. 111-116. 1988.

MORETTO, M. B et al. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. **Exp Neurol**, v.195, p. 400-406. 2005.



MORETTO, M. B et al. Importance of schedule of administration in the therapeutic efficacy of guanosine: early intervention after injury enhances glutamate uptake in model of hypoxia-ischemia. **J Mol Neurosci**, v. 38, p. 216-219. 2009.

MOSCOVITCH, M et al. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. **Journal of Anatomy**, v. 207, n. 1, p. 35-66. 2005.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**, v. 67, 181e198. 2010.

MOZAFFARIAN, D et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics – 2015 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 131, n. 4, p. 434–441. 2015.

MURPHY, T. H.; CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behavior. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 12, p. 861–872. 2009.

NADEL, L et al. Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. **Hippocampus**, v. 10, p. 352-368. 2000.

NAGASAWA, K et al. Characterization of guanine and guanosine transport in primary cultured rat cortical astrocytes and neurons. **Glia**, v. 55, p. 1397–1404. 2007. doi:10.1002/glia.20550.

NAYAK, A. R et al. Time course of inflammatory cytokines in acute ischemic stroke patients and their relation to inter-alfa trypsin inhibitor heavy chain 4 and outcome. **Ann Indian Acad Neurol**, v. 15, p. 181–185. 2012.

NEMETH, C. L et al. Microglial activation occurs in the absence of anxiety-like behavior following microembolic stroke in female, but not male, rats. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 174. 2014. doi: 10.1186/s12974-014-0174-7

NETO, F. L et al. Neurotrophins role in depression neurobiology: a review of basic and clinical evidence. **Curr Neuropharmacol**, v. 9, p. 530-552. 2011.

NEUROPATHOLOGY GROUP OF THE MEDICAL RESEARCH COUNCIL COGNITIVE FUNCTION AND AGEING STUDY (MRC CFAS). Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. **Lancet**, v. 357, p. 169–175. 2001.

NICHOLLS, D. G. The glutamatergic nerve terminal. **Eur J Biochem**, v. 212, p. 613–631. 1993.

NOVITZKE, J. R. N.; QURESHI, Z. Privation of Memory: What can be done to help stroke patients remember? **Journal of Vascular and Interventional Neurology**, v. 1, n. 4, p. 122-123. 2008.

NYS, G. M et al. The prognostic value of domain-specific cognitive abilities in acute first-ever stroke. **Neurology**, v. 64, n. 5, p. 821-827. 2005.

OHTSUKI, S et al. Dominant expression of androgen receptors and their functional regulation of organic anion transporter 3 in rat brain capillary endothelial cells; comparison of gene expression between the blood-brain and -retinal barriers. **J Cell Physiol**, v. 204, p. 896–900. 2005.

OMOTE, H et al. Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. **Biochemistry**, v. 50, p. 5558–5565. 2011.  
doi:10.1021/bi200567k

ORZYLOWSKA, O et al. Prolonged and concomitant induction of astroglial immunoreactivity of interleukin-1beta and interleukin-6 in the rat hippocampus after transient global ischemia. **Neurosci Lett**, v. 263, p. 72–76. 1999.

PAAS, Y et al. Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor. **The EMBO journal**, v. 15, p. 1548-1556. 1996.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, p. 219–233. 2001.

PALMIERI, F. The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. **Mol Aspects Med**, v. 34, p. 465–484. 2013.

PANICKAR, K. S.; NOREMBERG, M. D. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. **GLIA**, v. 50 p. 287–298. 2005.

PANIZ, L. G et al. Neuroprotective effects of guanosine administration on behavioral, brain activity, neurochemical and redox parameters in a rat model of chronic hepatic encephalopathy. **Metabolic brain disease**, v. 29, p. 645-654. 2014.

PARK, S. J et al. Gender differences in emergency stroke care and hospital outcome in acute ischemic stroke: a multicenter observational study. **Am J Emerg Med**, v. 31, p. 178–184. 2013.

PATIL, S. D.; UNADKAT, J. D. Sodium-dependent nucleoside transport in the human intestinal brush-border membrane. **Am J Physiol**, v. 272, p. 1314–1320. 1997.

PAZ, M. M et al. Differential effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase activity in chick optic tectum. **FEBS letters**, v. 355, p. 205-208. 1994.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocytic reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. **Physiol Rev**, v. 94, 1077e1098. 2014.

PENDLEBURY, S. T.; ROTHWELL, P. M. Prevalence, incidence, and factors associated with prestroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 11, p. 1006-1018. 2009.

PENG, L et al. Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. **Glia**, v. 52, p. 25–35. doi:10.1002/glia.20216. 2005.

PEREZ-ALVAREZ, M. J et al. Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. **J Neuroinflammation**, v. 9 (157-2094-9-157). 2012.

PETREA, R. E et al. Gender differences in stroke incidence and poststroke disability in the Framingham heart study. **Stroke**, v. 40, p. 1032–1037. 2009.

PETRONILHO, F et al. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. **Brain Behav Immun**, v. 26, p. 904-910. 2012.

PORCIUNCULA, L. O et al. Guanine based purines inhibit [(3)H]glutamate and [(3)H]AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats. **Brain Research**, v. 928, p. 106-112. 2002.

PRATICO, D.; FITZGERALD, G. A. Testosterone and thromboxane. Of muscles, mice, and men. **Circulation**, v. 91, p. 2694–2698. 1995.

PRIVAT, A.; GIMENEZ-RIBOTTA, M.; RIDET, J-L. Morphology of astrocytes. In: RANSOM, B. R.; KETTENMANN, H. (Eds.) **Neuroglia**. Oxford University Press, New York, 1995, p. 3–22.

RAMOS, M.; SOUZA, D. O.; RAMIREZ, G. Specific binding of [3H]GppNHp to extracellular membrane receptors in chick cerebellum: possible involvement of kainic acid receptors. **FEBS Lett**, v. 406, p. 114-118. 1997.

RANSOM, B. R.; RANSOM, C. B. Astrocytes: multitasking stars of the central nervous system. **Methods Mol Biol**, v. 814, p. 3–7. 2012.

RATHBONE, M. P et al. Systemic administration of guanosine promotes functional and histological improvement following an ischemic stroke in rats. **Brain research**, v. 1407, p. 79-89. 2011.

REEVES, M. J et al. Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 10, p. 915–926. 2008.

REGNER, A et al. Effects of guanine nucleotides on glutamate-induced chemiluminescence in rat hippocampal slices submitted to hypoxia. **Neurochemical Research**, 23:519-524. 1998.

REGNER, A et al. Guanine nucleotides are present in human CSF. **Neuroreport**, v. 8, p. 3771-3774. 1997.

REICHENBACH, A.; WOLBURG, H. Astrocytes and ependymal glia. In: KETTENMANN, H.; RANSOM, B. R. (Eds.) **Neuroglia**. Oxford University Press, New York, 2013, p. 35–49.

RIDET, J. L et al. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neurosci**, v. 20, p. 570–577. 1997.

ROESLER, R et al. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. **Neuroreport**, v. 11, p. 2537–2540. 2000.

ROGER, V. L et al. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, p. 18–209. 2011.

ROLLS, A.; SHECHTER, R.; SCHWARTZ, M. The bright side of the glial scar in CNS repair. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, p. 235-241. 2009.

ROSSI, D. Astrocyte physiopathology: at the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. **Prog Neurobiol**, v. 130, 86e120. 2015.

ROSSOUW, J. E. Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. **Cardiovasc Res**, v. 53, n. 3, p. 550–557. 2002.

ROTTA, L. N et al. Characterization of imido [8-(3)H] guanosine 5'-triphosphate binding sites to rat brain membranes. **Neurochemical research**, v. 29, p. 805-809. 2004.

SACCO, R. L et al. An Updated Definition of Stroke for the 21st Century - A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 44, p. 2064-2089. 2013.

SALIHović, D et al. Cognitive syndromes after the first stroke. **Neurological Sciences**. 2018. doi: 10.1007/s10072-018-3447-6

SAMAI, A et al. Von Willebrand factor drives the association between elevated factor VIII and poor outcomes in patients with ischemic stroke. **Stroke**, v. 4, n. 9, p. 2789–2791. 2014.

SCHAAPSMEERDERS, P et al. Long-Term Cognitive Impairment After First-Ever Ischemic Stroke in Young Adults. **Stroke**, v. 44, n. 6, p. 1621-1628. 2013. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000792

SCHMIDT, A. P et al. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Res**, v. 864, p. 40-43. 2000.

SCHMIDT, A. P et al. Guanosine prevents thermal hyperalgesia in a rat model of peripheral mononeuropathy. **J Pain**, v. 11, p. 131-141. 2010a.

SCHMIDT, A. P et al. Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of guanosine in mice. **Br J Pharmacol**, v. 159, p. 1247-1263. 2010b.

SCHNEIDER, J. A et al. Relation of cerebral infarctions to dementia and cognitive function in older persons. **Neurology**, v. 60, p. 1082–1088. 2003.

SCHNEIDER, J. A et al. Subcortical infarcts, Alzheimer's disease pathology, and memory function in older persons. **Ann Neurol**, v. 62, p. 59–66. 2007.

SHARIF, N. A.; ROBERTS, P. J. Regulation of cerebellar L-[3H]glutamate binding: influence of guanine nucleotides and Na<sup>+</sup> ions. **Biochemical pharmacology**, v. 30, p. 3019-3022. 1981.

SILVA, G. S et al. Gender differences in outcomes after ischemic stroke: role of ischemic lesions volume and intracranial large-artery occlusion. **Cerebrovasc Dis**, v. 30, p. 470–475. 2010.

SILVER, J.; MILLER, J. H. Regeneration beyond the glial scar. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, p. 146–156. 2004.

SIMPSON, C. R et al. Evidence for age and sex differences in the secondary prevention of stroke in Scottish primary care. **Stroke**, v. 36, p. 1771–1775. 2005.

SMITH, G. M.; STRUNZ, C. Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate proteoglycans by astrocytes. **Glia**, v. 52, p. 209–218. 2005.

SNAPHAAN, L.; DE LEEUW, F. E. Poststroke memory function in nondemented patients a systematic review on frequency and neuroimaging correlates. **Stroke**, v. 38, n. 1, p. 198–203. 2007.

SNOWDON, D. A et al. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease: The Nun Study. **JAMA**, v. 277, p. 813–817. 1997.

so superior? The 1995 Ancel Keys lecture. **Circulation**, v. 95, p. 252–264. 1997.  
SOARES, F. A et al. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. **Brain Res**, v. 1005, p. 182-186. 2004.

SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci**, v. 32, p. 638-47. 2009.

SOLDIN, O. P.; MATTISON, D. R. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Clin. Pharmacokinet**, v. 48, p. 143–157. 2009.

SONNEN, J. A et al. Pathological correlates of dementia in a longitudinal, population-based sample of aging. **Ann Neurol**, v. 62, p. 406–413. 2007.

SONTHEIMER, H. A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. **J Neurochem**, v. 105, p. 287–295. 2008.

SOUZA, D. O.; RAMIREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **Journal of molecular neuroscience**, v. 3, p. 39-45. 1991.

STEINBERG, L. A social neuroscience perspective on adolescent risk-taking. **The Development Review**, v. 28, p. 78–106. 2008.

STOLL, G.; JANDER, S.; SCHROETER, M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. **Prog Neurobiol**, v. 56, p. 149–171. 1998.

STRUBLE, R. G et al. Estradiol regulation of astroglia and apolipoprotein E: An important role in neuronal regeneration. **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 54-63. 2007. doi: 10.1016/j.exger.2006.05.013

SU, C et al. Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism. **J Neurosci Res**, v. 87, p. 617-62. 2009.

SU, C et al. Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism. **J Neurosci Res**, v. 87, p. 617-625. 2009.

SU, C et al. Guanosine promotes proliferation of neural stem cells through cAMPCREB pathway. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 27, p. 673-680. 2013.

SUGAWARA, T.; CHAN, P. H. Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, p. 597–607. 2003.

SUNDARAM, R. S.; GOWTHAM, L.; NAYAK, B. S. The role of excitatory neurotransmitter glutamate in brain physiology and pathology. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2012.

SWEATT, J. D. Mechanisms of memory In: \_\_\_\_\_. **Rodent Behavioral Learning and Memory Models**. 2<sup>a</sup> ed. Direct Science, 2010. p. 76-103.

TASCA, C. I et al. Chick kainate binding protein lacks GTPase activity. **Neuroreport**, v. 10, p. 1981-1983. 1999a.

TASCA, C. I et al. Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptor activation. **Neurochemical research**, v. 23, p. 183-188. 1998.

TASCA, C. I et al. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. **Neuroreport**, v. 6, p. 249-252. 1995.

TASCA, C. I.; CARDOSO, L. F.; SOUZA, D. O. Effects of guanine nucleotides on adenosine and glutamate modulation of cAMP levels in optic tectum slices from chicks. **Neurochem Int**, v. 34, p. 213-220. 1999b.

TASCA, C. I.; SOUZA, D. O. Interaction of adenosine and guanine derivatives in the rat hippocampus: effects on cyclic AMP levels and on the binding of adenosine analogues and GMP. **Neurochemical research**, v. 25, p. 181-188. 2000a.

TAVARES, R. G et al. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. **Neurochem Res**, v. 30, p. 439-444. 2005.

TAVARES, R. G et al. Quinolinic acid-induced seizures stimulate glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain: effects prevented by guanine-based purines. **Neurochem Res**, v. 33, p. 97-102. 2008.

THOREN, A. E et al. Astrocytic function assessed from 1-14C-acetate metabolism after temporary focal cerebral ischemia in rats. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 25, p. 440-450. 2005.

TOMLINSON, B. E.; BLESSED, G.; ROTH, M. Observations on the brains of demented old people. **J Neurol Sci**, v. 11, p. 205-242. 1970.

TORRES, F. V et al. Electrophysiological effects of guanosine and MK-801 in a quinolinic acid-induced seizure model. **Exp Neurol**, v. 221, p. 296-306. 2010.

TOUNG, T. J et al. Estrogen decreases infarct size after temporary focal ischemia in a genetic model of type I diabetes mellitus. **Stroke**, v. 31, p. 2701-2706. 2000.



TRAVERSA, U et al. Rat brain guanosine binding site. Biological studies and pseudoreceptor construction. **Bioorg Med Chem**, v. 11, p. 5417-5425. 2003.

TRAVERSA, U et al. Specific [(3)H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. **Br J Pharmacol**, v. 135, p. 969-976. 2002.

TURNER, R. C et al. Neuroprotection for ischemic stroke: moving past shortcomings and identifying promising directions. **Int J Mol Sci**, v. 14, 1890e1917. 2013.

TUTTOLOMONDO, A et al. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. **Curr Pharm Des**, v. 14, p. 3574–3589. 2008.

TZINGOUNIS, A. V.; WADICHE, J. I. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, p. 935–947. 2007. doi:10.1038/nrn2274

UEMURA, Y et al. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. **Stroke**, v. 22, p. 1548-1553. 1991.

VAN NORDEN, A. G et al. Dementia: Alzheimer pathology and vascular factors: from mutually exclusive to interaction. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, p. 340–349. 2012.

VAN RIJSBERGEN, M. W. A et al. Subjective cognitive complaints after stroke: a systematic review. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 23, n. 3, p. 408–420. 2014.

VANDENBERG, R. J.; RYAN, R. M. Mechanisms of glutamate transport. **Physiol Rev**, v. 93, p. 1621–1657. 2013. doi:10.1152/physrev.00007.2013

VAROQUI, H et al. Identification of the differentiation-associated Na<sup>+</sup>/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. **J Neurosci**, v. 22, p. 142–155. 2002.

VENTERS, H. D.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Tumor necrosis factor-alpha induces neuronal death by silencing survival signals generated by the type I insulin-like growth factor receptor. **Ann N Y Acad Sci**, v. 917, p. 210–220. 2000.

VERKHRATSKY, A.; BUTT, A. **Glial Physiology and Pathophysiology**. John Wiley, Chichester. 2013. doi: 10.1002/9781118402061

VINADÉ, E. R et al. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. **Brain Res**, v. 977, p. 97-102. 2003.

VINADE, E. R et al. Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. **J Neurosci Res**, v. 79, p. 248–253. doi:10.1002/jnr.20327. 2005.

VINTERS, H. V et al. Neuropathologic substrates of ischemic vascular dementia. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 59, p. 931–945. 2000.

WANG, F et al. Photolysis of caged Ca<sup>2</sup> but not receptor-mediated Ca<sup>2</sup> signaling triggers astrocytic glutamate release. **J Neurosci**, v. 33, p. 404–412. 2013. doi:10.1523/JNEUROSCI.2178-13.2013

WARLOW, C. P et al. **Stroke: practical management**, 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2008.

WASSTHEIL-SMOLLER, S et al. Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. **JAMA**, v. 289, n. 20, p. 2673–2684. 2003.

WENDELL, C et al. Depressive symptoms are associated with subclinical cerebrovascular disease among healthy older women, not men. **Am J Geriatr Psychiatry**, v. 18, p. 940–947. 2010.

WESTBERRY, J. M.; PREWITT, A. K.; WILSON, M. E. Epigenetic regulation of the estrogen receptor alpha promoter in the cerebral cortex following ischemia in male and female rats. **Neuroscience**, v. 152, p. 982-989. 2008.

WHITE, L et al. Recent clinicalpathologic research on the causes of dementia in late life: update from the Honolulu-Asia Aging Study. **J Geriatr Psychiatry Neurol**, v. 18, p. 224–227. 2005.

WHO. **The World Health Report 2003: shaping the future**. October, 2003. [http://www.who.int/whr/2003/en/overview\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2003/en/overview_en.pdf)

WIEBERS, D. O. Ischemic cerebrovascular complications of pregnancy. **Arch Neurol**, v. 4, n. 11, p. 1106–1113. 1985.

WILLIAMS, C. L.; BARNETT, A. M.; MECK, W. H. Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. **Behav Neurosci**, v. 104, p. 84–97. 1990.

WISE, P. M et al. Estradiol is a neuroprotective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. **Brain Res Rev**, v. 37, p. 313–319. 2001.

WU, J. Q et al. The hippocampus, medial prefrontal cortex, and selective memory retrieval: evidence from a rodent model of the retrieval-induced forgetting effect. **Hippocampus**, v. 24, n. 9, p. 1070-1080. 2014.

YANG, G. Y et al. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood–brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice. **Brain Res Mol**, v. 69, p. 135–143. 1999.

YASUDA, Y et al. Relationship between S100beta and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia. **Brain Res**, v. 1021, p. 20–31. 2004.

ZAKAI, N. A et al. Association of coagulation related and inflammation-related genes and factor VIIc levels with stroke: the Cardiovascular Health Study. **J Thromb Haemost**, v. 9, n. 2, p. 267–274. 2011.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F. H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, p. 645-660. 2008.

ZHENG, Z.; YENARI, M. A. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Neurological Research**, v. 26, p. 884-892. 2004.