



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

JOSELMA MARIA DA SILVA

**AÇÃO DE DIFERENTES DOSES DA GUANOSINA SOBRE O CÉREBRO EM
DESENVOLVIMENTO:** análise comportamental e eletrofisiológica em ratos albinos

Recife

2019

JOSELMA MARIA DA SILVA

**AÇÃO DE DIFERENTES DOSES DA GUANOSINA SOBRE O CÉREBRO EM
DESENVOLVIMENTO:** análise comportamental e eletrofisiológica em ratos albinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Área de Concentração: Neurofisiologia

Orientador: Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Abadie Guedes

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Joselma Maria da

Ação de diferentes doses da guanosina sobre o cérebro em desenvolvimento: análise comportamental e eletrofisiológica em ratos albinos / Joselma Maria da Silva - 2019.

54 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes

Coorientador: Ricardo Abadie Guedes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos

1. Guanosina 2. Depressão Alastrante Cortical 3. Ansiedade
I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (orient.) II. Guedes, Ricardo Abadie (coorient.) III. Título

612.822

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-122

JOSELMA MARIA DA SILVA

**AÇÃO DE DIFERENTES DOSES DA GUANOSINA SOBRE O CÉREBRO EM
DESENVOLVIMENTO:** análise comportamental e eletrofisiológica em ratos albinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Ângela Amâncio dos Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Rosângela Figueiredo Mendes da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

A minha querida mãe Maria Ana da Silva, que é a pessoa que mais amo e sei que seu amor é bem maior por mim,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por todos os momentos que passei até chegar à concretização deste trabalho.

À minha família, de modo particular e especial a minha mãe, Maria Ana, por me proporcionar apoio incondicional e perseverança para realizar meus sonhos sempre com fé e otimismo. À minha irmã Joelma, ter seu apoio para apostar nos meus projetos e seguir o meu caminho é muito importante para mim.

Agradeço de forma especial ao meu orientador Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes pela oportunidade de me iniciar no trabalho científico. Com os seus ensinamentos, dedicação e confiança pude aprender e crescer nesses dois anos no laboratório. Certamente, estou concluindo o mestrado diferente de quando ingressei, pois afinal, foram dois anos de muito trabalho e amadurecimento. E tudo graças ao senhor que é mais que um Mestre na arte de ensinar, é um pai acadêmico que acolhe, dá conforto, faz do seu exercício a mais profunda raiz para o solo da existência de cada um de seus alunos. Dizer: Muito Obrigada, é pouco, quando temos um coração imensamente agradecido e feliz. Sendo assim, ao encerrar esse ciclo de aprendizagem venho homenageá-lo com uma simples oração:

Prece de Madre Teresa de Calcutá

"Que a paz esteja dentro de você hoje. Que você creia estar exatamente onde você deve estar. Que você acredite nas infinitas possibilidades que nascem do destino. Que você usufrua as graças que recebeu e passe adiante o amor que lhe foi dado. Que você seja feliz sabendo que é um filho de Deus. Que você deixe a presença de Deus entrar em teu corpo e permita à tua alma a liberdade de cantar, dançar, orgulhar-se e amar. Ele está lá, para cada um de nós."

Prof. Rubem, receba através dessa prece meu carinho, meu afeto fraterno, meu sorriso acolhedor e, sobretudo, meu coração amigo. Espero que um dia eu possa me tornar uma profissional semelhante ao senhor que acolhe a todos, se dedica com muito amor ao que faz, é prestativo, motivador e amigo. Não há palavras que descrevam a gratidão que sinto por tudo que o senhor fez por mim. Que Deus em sua infinita bondade permaneça ao seu lado lhe abençoando e iluminando seus

caminhos. Receba um abraço do tamanho do amor de Deus, ou seja, infinito. Com todo meu carinho e reconhecimento.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Ricardo Abadie Guedes pela contínua presença, ensinamentos e orientações. Serei sempre grata por sua disponibilidade em ajudar, pela troca de experiências e conhecimentos e pela confiança durante todo o curso.

Às minhas amigas Andréia e Cleopatra, foi um prazer trabalhar com vocês! Vocês são exemplos de dedicação e amizade. Anjos de Deus aqui na terra. Obrigada por me ajudarem na concretização deste sonho tão esperado. Com vocês dividi minhas lutas, vitórias e alegrias. Vocês são muito importantes para mim! A vocês minha eterna gratidão.

Agradeço imensamente às queridas estagiárias de iniciação científica: Aline, Fernanda e Laiana pela dedicação e comprometimento com a pesquisa. Vocês foram a melhor equipe com que alguém poderia trabalhar. Sinto-me abençoada pelo companheirismo, amizade e empenho que vocês demonstraram. Vocês são uma bênção divina!

Obrigada a toda equipe do LAFINNT pela transmissão de conhecimento, disponibilidade e companhia. Durante esse tempo que estive no laboratório vocês foram minha segunda família e tornaram meus dias mais felizes e agradáveis. Levo em mim um pouco de cada um de vocês, pois a cada dia nos tornamos a marcar das lições diárias das pessoas que temos o prazer em conhecer. A vocês meu muito obrigada.

Agradeço, ao técnico do laboratório Fernando Wesley, pessoa extraordinária que sempre está disposto a ajudar. Obrigada por sua amizade, seus conselhos, sua disponibilidade e pela presença constante. Você é sem dúvidas o Menino de Ouro, um anjo na vida de todos aqueles que cruzam o seu caminho.

A toda turma de mestrado em Bioquímica e Fisiologia 2017.1 por fazerem da nossa turma uma grande família.

Aos funcionários do Biotério o Médico-Veterinário Dr. Edeones França e o Biólogo Bruno pela disponibilidade em sempre resolver nossas solicitações durante os períodos de pedidos de animais para os experimentos. Agradeço por orientarem o cuidado correto para com os animais, proporcionando um bom trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior que contribuiu para a realização deste trabalho tirando dúvidas, dando conselhos e pela disponibilidade em me ajudar a seguir na vida acadêmica. Agradeço à Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa que tanto me ajudou durante o meu processo de aprendizagem.

À FACEPE pelo apoio financeiro, muito obrigada!

Agradeço a todos os meus amigos que sempre torceram por mim e me acompanharam ao longo dessa trajetória de desenvolvimento e amadurecimento na ciência.

Espero que esse não seja o fim, mas mais um passo para a continuidade na vida acadêmica, pois acredito que são os sonhos que nos movem no mundo e a partir disso sigo com o desejo de realizar tantos mais. Porque bem sei que aqueles que estão dispostos a aprender estarão ocupados pelo resto de suas vidas. Assim desejo e, por isso, deixo aqui registrado esse propósito em prosseguir, uma vez que “tenho em mim todos os sonhos do mundo” (Fernando Pessoa).

A todos, meu muito obrigada!

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota (TERESA DE CALCUTÁ, 2018).

RESUMO

A guanosina (GUO) é um nucleosídeo endógeno derivado da guanina com grande participação em vias de sinalização celular. Seu efeito no sistema nervoso central parece promover neuroproteção de forma dependente da dose administrada. No presente trabalho avaliou-se, no rato albino, se o tratamento crônico com diferentes doses de guanosina durante o período crítico de desenvolvimento cerebral altera parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos cerebrais na idade adulta. Ratos albinos da linhagem Wistar foram tratados, do dia pós-natal (P) 7 ao 27, com uma injeção intraperitoneal diária de 10, 50 ou 100mg/Kg/d de GUO. Aos 60-65 dias de vida, os animais foram submetidos ao teste comportamental no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e ao completarem 90 a 100 dias, ao registro eletrofisiológico da depressão alastrante cortical (DAC). Em comparação aos dois grupos controle (ingênuo e tratado com o veículo-solução salina), o tratamento com GUO aumentou o peso corporal (aos 95 dias nas doses de 50 e 100 mg/kg/d), bem como alterou os parâmetros da DAC, diminuindo sua amplitude e velocidade de propagação e aumentando a sua duração (nas doses de 50 e 100mg/kg/d). Observou-se também uma ausência de comportamento ansiolítico associado ao tratamento crônico com GUO nessas doses. Esses resultados sugerem um efeito diferencial de distintas doses de GUO sobre o comportamento de ansiedade em ratos machos da linhagem Wistar. Os presentes resultados, pioneiros no que se refere à DAC, sugerem efeito comportamental ansiogênico e demonstram efeito antagônico à propagação da DAC, associados ao tratamento precoce crônico com a GUO. Considerando-se que o tratamento foi realizado no início da vida e os seus efeitos foram avaliados na idade adulta, sugere-se que sua ação seja permanente, ou ao menos duradoura. O tratamento crônico com GUO aumentou levemente o ganho de peso corporal dos animais tratados com as doses de 50 e 100mg/kg/d sem interferir no comportamento semelhante a ansiedade, mas interferiu nos parâmetros da DAC.

Palavras-chave: Guanosina. Depressão Alastrante Cortical. Comportamento de ansiedade. Desenvolvimento cerebral.

ABSTRACT

Guanosine (GUO) is a guanine-derivative endogenous nucleoside with great participation in cell signaling pathways. GUO appears to promote neuroprotection in the central nervous system in a dose-dependent manner. In the present study, it was evaluated in the albino rat whether chronic treatment with different doses of guanosine during the critical period of brain development influences behavioral and electrophysiological parameters in adulthood. Wistar albino rats were treated, from postnatal (P) day 7 to 27, with a daily intraperitoneal injection of 10, 50 or 100mg/kg/d GUO. At P60-65, the animals were behaviorally tested for anxiety-like responses in the Elevated Plus-Maze (EPM). At P90-100 the phenomenon known as cortical spreading depression (CSD) was electrophysiologically recorded over a 4h-period. In comparison with the two control groups (naïve and vehicle [saline]-treated), GUO treatment with 50 and 100 mg/Kg/d increased body weight at P95. Treatment with those two GUO doses also altered CSD parameters (reduced CSD propagation velocity and its DC-shift amplitude, and increased its DC-shift duration). There was also an absence of anxiolytic behavior associated with chronic treatment with GUO at these doses. These results suggest a differential effect of distinct doses of GUO on anxiety-like behavior in male Wistar rats. The present results, which are pioneering with regard to CSD, demonstrated an antagonistic effect on the CSD propagation, which was associated with GUO treatment early in life. In addition, data suggest an anxiogenic behavioral effect, which deserves being further explored. Considering that treatment was performed early in life and its effects were evaluated in adulthood, it is suggested that its action is permanent, or at least long lasting. Chronic GUO treatment slightly increased the body weight gain of animals treated at doses of 50 and 100mg/kg/d without interfering with anxiety-like behavior, but interfered with the parameters of CSD.

Key words: Guanosine. Cortical Spreading Depression. Behavior of anxiety. Development of the Brain.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

Figura 1 -	Catabolismo das bases purínicas da Guanina.....	18
Figura 2 -	Estrutura molecular de um nucleotídeo.....	19
Figura 3 -	Molécula da Guanosina.....	19
Figura 4 -	Estrutura da Família dos Receptores Purinérgicos.....	21
Figura 5 -	Curvas de comparação do desenvolvimento cerebral do homem e do rato.....	22
Figura 6 -	Labirinto em Cruz Elevado.....	23
Figura 7 -	Ciclo de eventos eletrofisiológicos da DAC.....	25

Artigo

Figura 1 -	Time diagram showing the periods of GUO treatment, behavioral test and Cortical Spreading Depression recording....	31
Figura 2 -	Body weight.....	34
Figura 3 -	Behavioral activity of 60-65 days-old rats in the elevated plus maze test.....	34
Figura 4 -	Recording of CSD.....	35
Figura 5 -	Guanosine-associated changes in the three CSD parameters...	36

LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico

Tabela 1 -	Condições que diminuem a propagação da DAC.....	26
Tabela 2 -	Condições que aumentam a propagação da DAC.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AU	Ácido úrico
ADA	Adenina
ADO	Adenosina
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
DAC	Depressão Alastrante Cortical
EEC	Eletroencefalograma
ECoG	Eletrocorticograma
<i>et al</i>	e outros
GUA	Guanina
GUO	Guanosina
GMP	Monofosfato de Guanosina
GDP	Difosfato de Guanosina
GTP	Trifosfato de Guanosina
HYPO	Hipoxantina
INO	Inosina
i.p	Intraperitoneal
SNC	Sistema Nervoso Central
SWDs	Números de descargas de espículas
VLV	Variação Lenta de Voltagem
XAN	Xantina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	JUSTIFICATIVA.....	16
1.2	HIPÓTESE.....	16
1.3	OBJETIVOS.....	17
1.3.1	Objetivo Geral.....	17
1.3.2	Objetivos Específicos.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	GUANOSINA E O SISTEMA PURINÉRGICO.....	19
2.2	PERÍODO CRÍTICO DE DESENVOLVIMENTO CEREBRAL.....	22
2.3	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....	23
2.4	DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL (DAC).....	24
3	RESULTADOS.....	28
3.1	BEHAVIORAL AND ELECTROPHYSIOLOGICAL ACTION OF GUANOSINE ON THE DEVELOPING RAT BRAIN.....	28
4	CONCLUSÃO & PERSPECTIVAS.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXO A - CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	53
	ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	54

1 INTRODUÇÃO

O sistema transmissor purinérgico é composto pelas bases púricas adenina (ADA) e guanina (GUA), representadas por seus nucleotídeos. Estudos demonstram que os nucleotídeos à base de guanina (GBPs), tais como: trifosfato de guanosina (GTP), difosfato de guanosina (GDP), e monofosfato de guanosina (GMP) podem ser convertidos extracelularmente de forma direta por enzimas denominadas ectonucleotidases em guanosina (BETTIO et al., 2016a; DAL-CIM et al., 2016). A guanosina (GUO) é um nucleosídeo purinérgico endógeno cuja estrutura possui uma guanina ligada a um anel de ribose. Ela pode ser liberada por astrócitos e ocorre naturalmente no Sistema Nervoso (SN), exibindo efeitos neuroprotetores tanto em estudos *in vivo* quanto em estudos *in vitro* (BELLAYER et al., 2015; GERBATIN et al., 2016).

É bem estabelecido que a GUO tem como papel no Sistema Nervoso Central (SNC) modular a transmissão glutamatérgica intercelular, podendo atuar como um antioxidante, pois pode neutralizar excitotoxicidade provocada pelo glutamato (LANZMASTER et al., 2016b). Em estudos recentes foi demonstrado que os receptores da adenosina A1R e A2AR podem estar envolvidos com os efeitos neuroprotetores da GUO (DOBRACHINSKI et al., 2018). Esses efeitos podem modular (aumentar ou diminuir) as atividades dos sistemas glutamatérgicos e adenosinérgicos (LAKATOS et al., 2016).

Estudos *in vivo* em ratos Wistar albinos Glaxo RijsWijk, que geram espontaneamente crises epilépticas de ausência, mostrou que o efeito da GUO é dependente da dose. Os animais que receberam GUO nas doses de 20 e 50 mg/Kg via injeção intraperitoneal (i.p) apresentaram menores números de descargas de espículas (SWDs) (KOVÁCS et al., 2015a). Por outro lado, doses mais altas de 100mg/Kg aumentaram essa atividade epiléptica de ausência e esse resultado está relacionado à hipexcitabilidade cortical (LAKATOS et al., 2016).

Distúrbios da excitabilidade cortical podem ser investigados experimentalmente por meio do fenômeno conhecido como depressão alastrante cortical (DAC), que foi utilizado neste trabalho. A DAC foi primeiramente descrita por Aristides Azevedo Pacheco Leão em 1944. Esse fenômeno caracteriza-se pela

redução (depressão) da amplitude do eletroencefalograma (EEG) em uma determinada região cortical, em resposta à estimulação dessa região, mediante estímulo elétrico, mecânico ou químico. Uma vez iniciada, essa depressão eletrocorticográfica se propaga concentricamente atingindo regiões corticais cada vez mais distantes (LEÃO, 1944). Durante a DAC, tanto a redução da atividade elétrica cerebral espontânea, como a provocada, são acompanhadas pelo aparecimento de uma “variação lenta de voltagem” (VLV) na região do cérebro invadida pelo fenômeno (LEÃO, 1947).

Utilizando a DAC como modelo experimental, diversos estudos do “Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio” (LAFINNT), do Departamento de Nutrição do CCS/UFPE têm caracterizado, em animais de laboratório, efeitos cerebrais de variáveis nutricionais (LIMA et al., 2013; MENDES-DA-SILVA et al., 2014), hormonais (ACCIOLY et al., 2012; LOPES-DE-MORAIS et al., 2014; ACCIOLY e GUEDES, 2017), ambientais (BATISTA-DE-OLIVEIRA et al., 2012; SILVA-GONDIM et al., 2017) e farmacológicas (GUEDES et al., 2017; MENDES-DA-SILVA et al., 2018).

Neste trabalho, utilizou-se o registro da DAC para avaliar o efeito da GUO em filhotes de ratos albinos Wistar tratados com três diferentes doses (10, 50 e 100 mg/Kg/dia) durante três semanas (sempre do 7º até o 27º dia de vida).

1.1 JUSTIFICATIVA

Considerando a premissa de que a GUO exerce um efeito neuroprotetor, neurotrófico e antioxidante no cérebro o presente estudo reveste-se de relevância, pois aborda a interação da guanosina no comportamento semelhante à ansiedade e na modulação da propagação da DAC. A investigação desses efeitos pela guanosina representa um fator interessante para a identificação de possíveis mecanismos envolvidos nessa interação.

1.2 HIPÓTESE

Nossa hipótese é a de que, nesses animais, o tratamento crônico com a GUO exerceria um efeito protetor em parâmetros comportamentais (indicativos de

ansiedade) e eletrofisiológicos cerebrais (indicativos da geração e propagação da DAC) na idade adulta. Tendo em vista o acima exposto, decidimos testar, nesta dissertação, que o tratamento crônico com GUO durante o período crítico de desenvolvimento além de reduzir respostas comportamentais indicativas de ansiedade, pode influenciar a propagação da DAC, de maneira dependente da dose.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar, no rato albino, o efeito do tratamento em longo prazo com diferentes doses de guanosina durante o período crítico de desenvolvimento cerebral altera parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos cerebrais na idade adulta.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Acompanhar o peso corporal como indicador de alterações do desenvolvimento dependentes do tratamento com guanosina;
- Detectar alterações comportamentais decorrentes do tratamento crônico com guanosina através do teste do Labirinto em Cruz Elevado;
- Identificar se esse tratamento altera parâmetros (velocidade de propagação, amplitude e duração) da Depressão Alastrante Cortical;
- Avaliar se os efeitos comportamentais e eletrofisiológicos da guanosina são dependentes da dose administrada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GUANOSINA E O SISTEMA PURINÉRGICO

O termo sinalização purinérgica foi introduzido por Burnstock em 1972 e se refere a um complexo sistema que compreende os nucleotídeos da adenina (ADA) e da guanina (GUA). Os nucleotídeos da adenina, tais como adenosina 5'-monofosfato (AMP), adenosina 5'-difosfato (ADP) e adenosina 5'-trifosfato (ATP), vêm sendo bastante estudados, enquanto que os nucleotídeos derivados da GUA são pouco investigados (BETTIO et al., 2016a). As bases púricas derivadas da GUA correspondem ao monofosfato de guanosina (GMP), difosfato de guanosina (GDP) e trifosfato de guanosina (GTP). Além dos nucleosídeos adenosina (ADO), inosina (INO) e guanosina (GUO), o sistema purinérgico também inclui os metabólitos xantina (XAN), hipoxantina (HYPO) e ácido úrico (UA); esses derivados atuam juntamente com receptores, transportadores e enzimas que compreendem a transmissão purinérgica (**Figura. 1**) (LIBERTO et al., 2016).

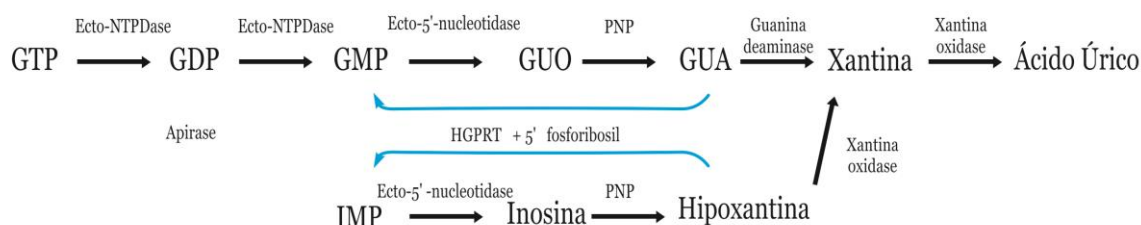


Figura 1: Catabolismo das bases purínicas da Guanina. GTP, GDP e GMP são hidrolizadas sequencialmente por nucleotidasas (ou ecto-nucleotidasas, quando produzidas extracelularmente), gerando guanosina (GUO). EctoNTPDase (ou apirase) metaboliza GTP e GDP para produzir GMP. Guanosina é hidrolizada por PNP gerando uma guanina com base na purina (GUA). Por ação da guanina deaminase, a guanina é convertida em xantina e sequencialmente em ácido úrico por ação da xantina oxidase. As enzimas das vias de salvamento das purinas, enzima HGPRT produzem GMP ou IMP a partir da condensação de GUA ou hipoxantina com 5'-fosforibosil, respectivamente (setas azuis). EctoNTPDase, ecto-nucleotídeo difosfohidrolase; HGPRT, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase; PNP, Purina nucleosídeo fosforilase (Lanznaster et al., 2016b).

Os nucleosídeos consistem de uma base nitrogenada e um açúcar (ribose ou desoxirribose), ao passo em que os nucleotídeos são compostos de um nucleosídeo (uma nucleobase, um açúcar e 5 carbonos), além de um ou mais grupos fosfato (**Figura 2**). Bioquimicamente, os nucleosídeos estão envolvidos na regulação e modulação de vários processos fisiológicos (PHAN et al., 2017).

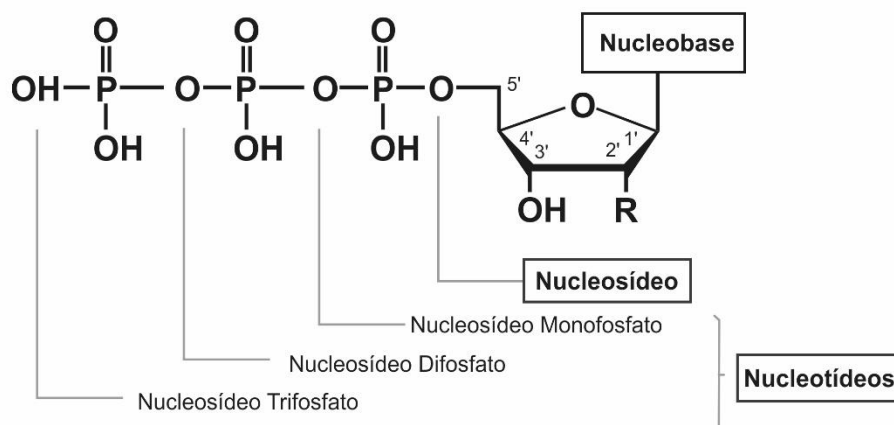


Figura 2: Estrutura molecular de um nucleotídeo. Formado por uma base nitrogenada, um açúcar com cinco átomos de carbono (PHAN et al., 2017).

Estudos demonstram que o nucleosídeo guanosina (GUO) é conhecido por atuar como modulador de sinalização intercelular no SNC (LANZMASTER et al., 2016b). Conforme descrito na introdução, a guanosina (GUO) é um nucleosídeo endógeno que carrega uma guanina ligada a um anel de ribose (**Figura. 3**). É também descrita como uma purina que tem como base a guanina. Ela pode ser liberada por astrócitos e exibe efeitos neuroprotetores (SCHMIDT et al., 2007; THOMAZ et al., 2016; MASSARI et al., 2017) tanto em estudos *in vivo* (QUINCOZES-SANTOS et al., 2014; BELLAVAR et al., 2015; SOUZA et al., 2016; OSTADHADIA et al., 2016) quanto em estudos *in vitro* (DOBRACHINSKI et al., 2017).

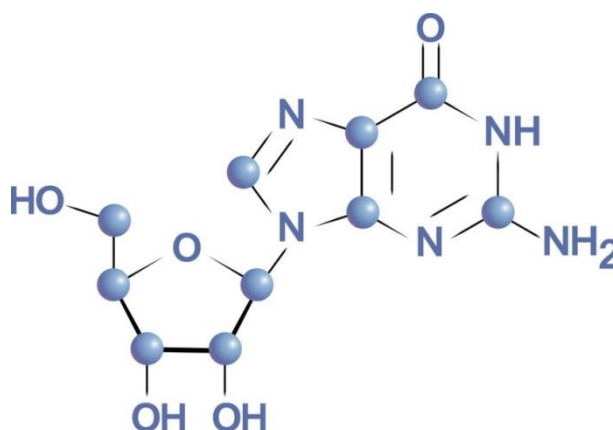


Figura 3: Molécula da Guanosina. Nucleosídeo endógeno com uma guanina ligada a um anel de ribose. Google imagem. Palavra chave: Guanosina. Disponível em: <<https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/guanosine-guanine-and-ribose-vector> 12589367> Acesso em set de 2018.

É importante destacar que os nucleotídeos à base de guanina (GBPs), tais como GTP, GDP e GMP podem ser convertidos extracelularmente de forma direta pelas ectonucleotidases em guanosina (DAL-CIM et al., 2016). Considerando o metabolismo da guanosina, muitos estudos confirmam a sua conversão rápida em guanina (JIANG et al., 2008; GIULIANI et al., 2012).

O estudo de Su *et al.*, (2013) mostraram que o tratamento com guanosina, mas não com guanina, aumenta a proliferação celular em cultura de células tronco neurais, sugerindo que para efeitos neurotróficos, a guanosina é a molécula bioativa (LANZNASTER et al., 2016b).

Já foi demonstrado que após a administração sistêmica de guanosina, os níveis desse nucleosídeo aumentam rapidamente no SNC (SOARES et al., 2004; JIANG et al., 2008). Esse nucleosídeo pode em condições basais ou após diferentes tipos de estimulação proteger células cerebrais contra hipóxia (GIULIANI et al., 2014). Pode também prevenir comportamentos anedônicos, caracterizados pela perda da capacidade de sentir prazer e desinteresse em realizar atividades diárias, sendo típico de um estado seriamente depressivo (LANZNASTER et al., 2017a). Além disso, esses mesmos autores mostraram que a guanosina modula o transporte de glutamato no hipocampo de camundongos induzido pelo peptídeo β -amilóide.

A guanosina pode ainda exercer efeitos extracelulares, agindo como antagonista glutamatérgico na hipoperfusão cerebral crônica (GANZELLA et al., 2012); tende a diminuir os efeitos da isquemia cerebral crônica (HANSEL et al., 2014), além de reduzir respostas inflamatórias em injúrias de traumatismo cerebral (GERBATIN et al., 2016). Essa redução inflamatória provocada pela GUO ocorre devido ao aumento da liberação de glutamato por astrócitos, tendendo a ter uma ação antioxidante, protegendo o cérebro contra a excitotoxicidade glutamatérgica. (CITTOLIN-SANTOS et al., 2016).

Embora os efeitos neuroprotetores da GUO já tenham sido descritos em diversas doenças do SNC, tem-se dado destaque para seus efeitos anticonvulsivos. Em ratos, a GUO protege contra convulsões induzidas pelo ácido quinolínico (TORRES et al., 2010; SCHMIDT et al., 2000; SOARES et al., 2004) e contra a atividade epiléptica evocada por lipopolissacarídeo (LPS) (KOVÁCS et al., 2015b).

Recentemente, Lakatos *et al.*, (2016) administraram sistematicamente via i.p. diferentes doses de GUO em um estudo *in vivo* a fim de demonstrar que o efeito da GUO em crises epiléticas é dependente da dose. Esses estudos mostraram que a

GUO tem o potencial de agir como modulador, exercendo uma comunicação com os receptores da adenosina. (LAKATOS et al., 2016; LANZMASTER et al., 2016b).

Essa comunicação entre GUO e receptores da adenosina, particularmente, com A1R e A2AR é amplamente estudada (OLIVEIRA et al., 2017). Esses receptores exercem importantes funções no SN, modulando as sinapses excitatórias e possivelmente podem contribuir com o tratamento farmacológico de doenças neurológicas (BETTIO et al., 2016a). A **figura 4** descreve a família desses receptores do Sistema Purinérgico cujas principais categorias que influenciam a atuação da GUO são A1R e A2AR.

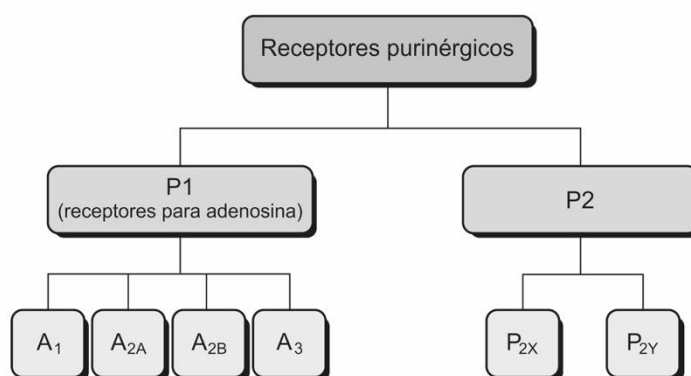


Figura 4: Estrutura da Família dos Receptores Purinérgicos. As famílias dos receptores purinérgicos compreendem dois grandes grupos P1 que possui a adenosina e é subcategorizado nos receptores: A1, A2A, A2B e A3. E P2 que tem diversos nucleotídeos como ligantes e subdivide-se em P2X e P2Y que exercem importantes funções no SN por meio do ATP e do acoplamento às proteínas G respectivamente. Fonte: BETTIO et al., (2016b).

Simultaneamente a esses estudos, dados recentes mostram, de forma controversa, os efeitos cerebrais da GUO em parâmetros comportamentais. A administração sistêmica e aguda da GUO em dose menor (7,5mg/kg) induziu efeitos ansiolíticos (ALMEIDA et al., 2017). Em outro tratamento agudo com dose maior (60mg/kg), sugestão de ansiogênese foi descrita (TEIXEIRA et al., 2018), em alguns paradigmas clássicos relacionados à ansiedade, como por exemplo, nos testes comportamentais de Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto. Estes efeitos da guanosina foram correlacionados com aumento da adenosina e contra a excitotoxicidade glutamatérgica no SNC.

Diante de todos esses estudos é importante levar em consideração que a GUO além de estar associada à neuroproteção possui potencial terapêutico para emprego em doenças do SNC. Isso demonstra a relevância de se estudar os efeitos da GUO durante o período crítico de desenvolvimento do encéfalo, uma vez que o conhecimento sobre o desenvolvimento cerebral é a chave para a compreensão de doenças que aparecem muitas vezes durante a fase adulta.

2.2 PERÍODO CRÍTICO DE DESENVOLVIMENTO CEREBRAL

O período crítico de desenvolvimento é o período em que processos como neurogênese, gliogênese, sinaptogênese e mielinização, dentre outros, acontecem com maior velocidade. Fatores exógenos, de natureza nutricional, ambiental, hormonal e farmacológica podem, nesse período, alterar o desenvolvimento cerebral de maneira duradoura, refletindo-se os seus efeitos funcionais na idade adulta (GUEDES, 2011). Esse período crítico de desenvolvimento, no rato, compreende as três primeiras semanas de vida pós-natal. No ser humano, esse período tem início no terceiro trimestre gestacional e se estende até os 3 ou 4 anos de idade e envolve tanto a gestação quanto a lactação. Uma comparação entre a semelhança desses processos no homem e no rato pode ser vista na **Figura 5**.

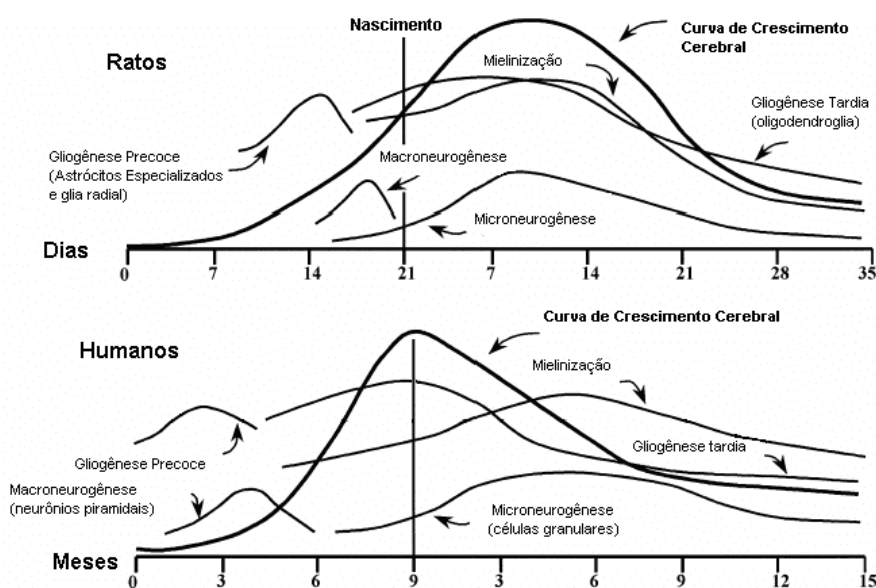


Figura 5: Curvas de comparação do desenvolvimento cerebral do homem e do rato. Curvas comparando diversas fases durante o processo de desenvolvimento, nos cérebros do homem e do rato. Notar que, com exceção das escalas temporais (dias, no rato e meses, no homem), as diversas fases têm distribuição parecida, em relação ao nascimento (Adaptado de MORGANE et al., 2002).

2.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste comportamental utilizado para avaliar comportamentos ansiolíticos e ansiogênicos de acordo com o tratamento farmacológico realizado (PELLOW et al., 1986; WALL e MESSIER., 2001). Nesse teste os ratos são colocados em um aparato elevado a 55 cm do solo que tem um formato em cruz com dois braços abertos (sem proteção lateral) e dois braços fechados (com proteção lateral), perpendiculares aos primeiros, conectados a uma parte central. Cada braço do labirinto mede 49 cm de comprimento x 10 cm de largura. Como esquematizado na **Figura 6**, abaixo. Os animais são colocados ao centro do labirinto para explorar o novo ambiente por 5 min. Esses primeiros 5 min constituem o tempo mais importante para avaliar as respostas dos ratos em evitar explorar os braços que não possuem proteção lateral (WALF; FRYE, 2007).

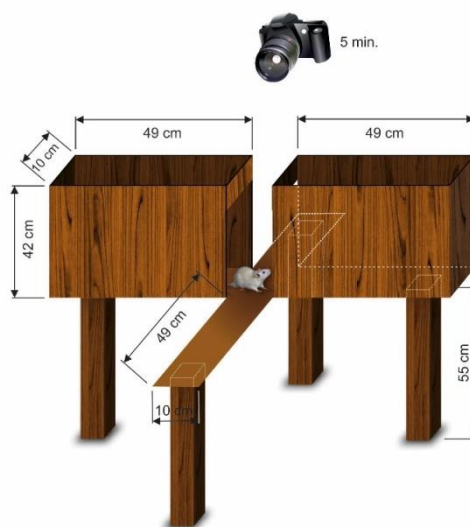


Figura 6: Labirinto em Cruz Elevado. Aparato de madeira em formato de cruz com 55 cm acima do chão, composto por dois braços abertos e dois braços fechados conectados a uma parte central quadrada. É um teste validado para medir os níveis de ansiedade de ratos e camundongos. Foto da autora.

Nesse teste são avaliados os seis seguintes parâmetros:

- 1 - Número de “rearings”, que consiste em um comportamento exploratório relacionado ao levantamento do animal, apoiando-se nas patas traseiras (ALVES et al., 2012; WADIONI et al., 2018);
- 2 - Número de bolos fecais, que corresponde

a quantidade de fezes expelidas. Esse comportamento é diretamente proporcional ao nível de emocionalidade, ansiedade e medo do animal (WALF; FRYE, 2007); 3 - Distância total percorrida; 4 - Tempo de imobilidade. Além disso, avalia-se 5) o número de entradas nos braços abertos e 6) o tempo que os animais permanecem nesses braços do labirinto. Considera-se que quanto mais frequentemente e mais longamente o animal frequentar os braços abertos, menos ansiedade ele terá, e vice-versa (PELLOW et al., 1985; 1986).

1.4 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL (DAC)

Os primeiros estudos sobre a Depressão Alastrante Cortical (DAC) foram descritos por um brasileiro chamado Aristides Azevedo Pacheco Leão em 1944 enquanto realizava seu doutorado na Universidade de Havard. Esses estudos centravam no interesse em compreender por meio de dados experimentais o que ocorre na epilepsia quando havia uma estimulação elétrica no córtex cerebral de coelhos anestesiados. Leão (1944) observou uma redução da atividade eletroencefalográfica que concentricamente se espalhava por todo o córtex cerebral, atingindo regiões cada vez mais distantes desde a região estimulada, em resposta à estimulação elétrica, mecânica ou química de um ponto cortical.

Três anos mais tarde concomitantemente à redução da atividade elétrica cerebral, tanto a espontânea como a provocada, Leão (1947) descreveu uma “variação lenta de voltagem” (VLV) na região do cérebro invadida pelo fenômeno. Assim, em procedimentos experimentais, é possível deflagrar a DAC a partir da estimulação de um ponto da superfície cortical; essa depressão se propaga, atingindo gradualmente regiões corticais mais e mais distantes. Enquanto isso, a área inicialmente deprimida começa a se recuperar, completando-se esse processo em 5 a 10 minutos. Pode-se, pois concluir que a DAC é um fenômeno completamente reversível (**Figura. 7**).

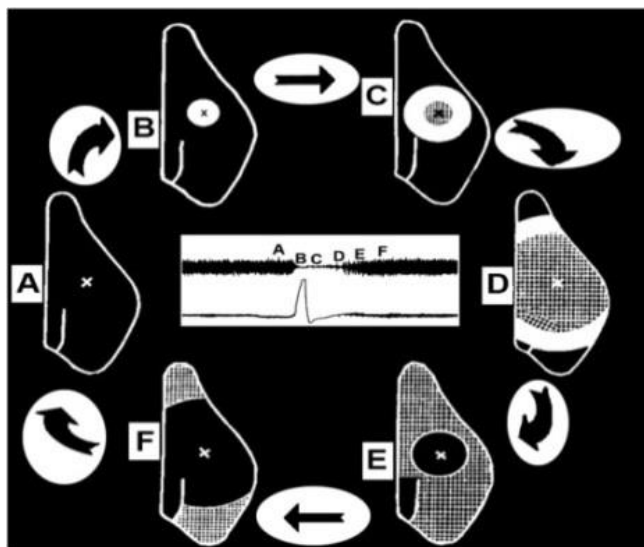


Figura 7: Ciclo de eventos eletrofisiológicos da DAC. Ciclo de eventos eletrofisiológicos reversíveis que ocorrem durante a depressão alaistrante cortical: sequência de passos (A a F) que caracterizam a DAC no córtex cerebral do rato. Em A, o tecido cortical normal é estimulado no ponto marcado com um “x” e um episódio de DAC é deflagrado nesse ponto. O círculo branco em B identifica a área inicialmente deprimida, a partir da qual a DAC se propaga concentricamente para todo o córtex (passos C e D). O círculo preto em E indica a área inicialmente recuperada. O processo de recuperação atinge gradualmente as áreas mais remotas (passo F) e finalmente o córtex inteiro, o que o traz para a condição pré-DAC, como em A. A área quadriculada representa a refratariedade após a DAC, antes da recuperação total. No centro da figura mostra-se o eletrocorticograma e a variação lenta de voltagem da DAC (respectivamente o traçado superior e o inferior). Os pontos temporais correspondendo às condições dos passos A a F estão marcados no eletrocorticograma com as respectivas letras (**adaptado de GUEDES, 2011**).

As tabelas 1 e 2 mostram uma variedade de condições já estudadas, relacionadas aos efeitos que essas variáveis podem causar na DAC. A Tabela 1 apresenta condições nutricionais, hormonais e farmacológicas, que diminuem a propagação da DAC, enquanto que a Tabela 2 destaca as condições que a aceleram.

O estudo desse fenômeno pode fornecer informações valiosas para a compreensão de doenças relacionadas ao SN. A DAC está associada a diversas doenças neurológicas tais como a enxaqueca (VIGGIANO, et al., 2016), traumatismo craniano (TORRENTE et al., 2013), isquemia (DREIER et al., 2011), e epilepsia (GUEDES et al., 2009).

Diante desse contexto, e visando dar continuidade a essa linha de pesquisa do “Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio” (LAFINNT), a presente pesquisa objetivou estudar o efeito, em longo prazo, do tratamento crônico com diferentes doses de GUO, durante o período crítico de desenvolvimento cerebral, sobre o comportamento no Labirinto em Cruz Elevado e sobre a DAC, avaliados na idade adulta.

Tabela 01: Algumas condições que diminuem a propagação da DAC

Condição experimental	Autores	Ano
Tratamento dietético com lítio	Guedes et al	1989
Hiperglicemia	Ximenes-da-Silva e Guedes.; Costa-Cruz et al.	1991; 2001
Anestésicos	Guedes e Barreto	1992
Hipotireoidismo	Guedes e Pereira-da-Silva	1993
Envelhecimento	Guedes et al.	1996
Epilepsia crônica provocada pela pilocarpina	Guedes e Cavalheiro. Costa-Cruz et al.	1997 2006
Estimulação ambiental	Santos-Monteiro et al.	2000
Ativação do Sistema Serotoninérgico	Guedes et al. Amâncio-dos-Santos et al.	2002 2006
Estimulação Elétrica Cerebral direta e trans-craniana	Guedes et al. Fregni et al.	2017 2005; 2007
Condições favoráveis de aleitamento	Rocha-de-Melo et al.	2006
Dieta hiperlipídica	Dieta hiperlipídica	2007
Ácido ascórbico (30 mg/kg/dia)	Mendes-da-Silva et al.	2014
Pilocarpina/Ácido ascórbico	Mendes-da-Silva et al.,	2018

Tabela 02: Algumas condições que aceleram a propagação da DAC

Condição experimental	Autor	Ano
Redução do Cloreto extracelular	Guedes e Do Carmo.	1980
Hipoglicemia	Ximenes-da-Silva e Guedes	1991
Diazepam	al.	1992
Etanol	Guedes e Frade. Bezerra et al.	1993; 2005
Deficiência nutricional pela DBR	Rocha-de-Melo e Guedes.	1997
Hipertireoidismo		
Privação do sono paradoxal	Santos.	2000
Desnutrição por aumento da	Vasconcelos et al.	2004
Ninhada.	Rocha-de-Melo et al.	2006
Antioxidantes	Abadie-Guedes et al.	2008
Privação sensorial	Tenório et al.	
Arginina durante o desenvolvimento	Maia et al.	2009
Hipertermia ambiental	Farias-Santos et al.	2009
Glutamina durante o	Lima et al.	2009
desenvolvimento		
Dipirona no início da vida	Amaral et al.	2009
Cafeína	Chagas, et al.	2018

Os resultados experimentais deste trabalho serão apresentados sob a forma de um artigo científico submetido à publicação em revista de circulação internacional (ver abaixo).

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO SUBMETIDO



Manuscript **Details**
Manuscript **number** BRB_2019_78

Title Behavioral and electrophysiological action of guanosine on the developing rat Brain

Authors: Joselma Maria **da-Silva**, Ricardo **Abadie-Guedes**, Andréia Albuquerque Cunha **Lopes-de-Morais** and Rubem Carlos Araújo **Guedes**

Article type	Research Paper
Taxonomy	Behavioral Neuroscience, Neurophysiology
Manuscript category	Mechanism in Neurological and Neuropsychiatric Diseases
Corresponding Author	Rubem Guedes
Corresponding Author's Institution	Universidade Federal de Pernambuco
Order of Authors	Joselma Maria da-Silva, Ricardo Abadie-Guedes, Andréia Lopes-de-Morais, Rubem Guedes

ABSTRACT

Guanosine (GUO) is a guanine-based purine that has been extensively described in the literature as an endogenous nucleoside with participation in brain cell signalling pathways. Here, we evaluated whether chronic treatment with exogenous guanosine during brain development altered behavioral and electrophysiological parameters in adulthood. Rat pups received a daily intraperitoneal injection of 10, 50 or 100 mg/kg/day GUO, or saline solution or no treatment (naive group) from postnatal (P) day 7 to P27. At P60-65 the animals were behaviorally tested in the Elevated Plus-Maze (EPM). On P90-100, the electrophysiological phenomenon known as cortical spreading depression (CSD) was recorded on the right cortical surface for 4 hours. Regarding to the EPM test, GUO treatment was associated with a non-significant trend towards anxiogenic behavior. In a dose-dependent manner, GUO significantly ($p < 0.01$) increased weight gain on P90, and reduced the CSD propagation velocity from 3.42 ± 0.10 and 3.43 ± 0.10 mm/min in the Naive and Vehicle controls, respectively, to 3.05 ± 0.12 mm/min, 2.87 ± 0.07 mm/min and 2.25 ± 0.25 mm/min in the groups treated with 10, 50 and 100 mg/kg/d GUO, respectively. The results confirmed the hypothesis that the chronic treatment with GUO early in life modulates CSD and body weight. Data on CSD propagation suggest that GUO acts as an antioxidant in the brain, an hypothesis that deserves further exploration.

Key words: Guanosine. Cortical Spreading Depression. Anxiety. Brain development. Redox imbalance.

1. Introduction

Guanosine (GUO) is an endogenous guanine-based purine that has been reportedly considered as having neuroprotective action by increasing brain neurogenesis and angiogenesis in a mouse model of stroke (Deng et al., 2017). Evidence from animal studies suggests that GUO can modulate anxiety-like behavior (Teixeira et al., 2018; Almeida et al., 2017) and brain functions based on neuronal electrical activity, including seizures (Torres et al., 2010; Kovács et al., 2015). However, little is known about the GUO anxiety-related behavioral effects, as well as about the excitability-related anticonvulsive effects of the GUO, in terms of mechanisms and etiologic factors. Anxiety mechanisms appear to involve several neurotransmitter systems, including the glutamatergic (Wieronska et al., 2013) and adenosinergic systems (Almeida et al., 2017). Convulsion mechanisms seem to require the participation of glutamatergic and GABAergic systems (Schmidt et al., 2000) and the adenosinergic system, as well (Lakatos et al., 2016). Recently, it has been suggested that treatment of rats with exogenous GUO could lead to an anxiolytic effect (Almeida et al., 2017), or lead not (Teixeira et al., 2018), depending on the dose of GUO that was used. Accordingly, different doses of GUO have also been associated with anticonvulsant (Schmidt et al., 2000), or proconvulsant activity (Lakatos et al., 2016).

Regarding brain excitability, our group has employed the excitability-related phenomenon known as cortical spreading depression (CSD) to investigate the brain electrophysiological effects of several factors, including drugs (Francisco and Guedes, 2018; Mendes-da-Silva et al., 2018). CSD is a depolarization-based gray matter response, characterized electrophysiologically by EEG depression, which is fully reversed after a few minutes. CSD can be elicited by chemical, electrical or mechanical stimulation of one cortical point, from which it spreads in all directions to remote cortical regions (Leão, 1944). Several studies have confirmed the presence of CSD on a number of animal species (Guedes et al., 2005; Martins-Ferreira et al., 1974; Shatillo et al., 2015), including human species, where it has been documented in association with neuropathological conditions such as epilepsy, stroke and migraine (Dreier, 2011; Lauritzen and Strong, 2016; Nakamura et al., 2010).

Herein, we treated chronically three groups of developing rats with different

doses of GUO, to investigate later in adulthood the dose-response aspects of the GUO effects on the anxiety-like behavior and CSD propagation. Our hypothesis is that chronic GUO administration to developing rats would modulate the investigated anxiety and CSD parameters in a long time.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and GUO treatment

Newborn male and female Wistar rats were suckled in litters with 10 pups (minimum of 5 males) by dams fed on a commercial laboratory chow diet (Purina LTD) containing 23% protein. In each litter, pups were distributed into five groups (1-2 pups per group), according to the treatment they received: 1) Naïve (no treatment), 2) Vehicle (i.p. injection of saline solution), 3) GUO-10, 4) GUO-50 and 5) GUO-100 (i.p. injection of 10mg/kg/d, 50 mg/kg/d and 100 mg/kg/d of GUO, respectively). Intraperitoneal injection was performed from postnatal (P) day 7 to 27. Weaning occurred on P21. After weaning, pups received the maternal chow diet. They were reared in polypropylene cages (51 cm × 35.5 cm × 18.5 cm) in a room maintained at $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, with a 12-hour light/12-hour dark cycle (lights on at 6:00 AM). Behavioral tests occurred from P60 to P65. CSD was recorded over 4 h from P90 to P100. Body weight was evaluated on P8, P17, P27, P62 and P95. **Figure 1** illustrates the time sequence of the various procedures during the experiment. Only the male pups (n = 56, originated from 10 litters) were used in this study.

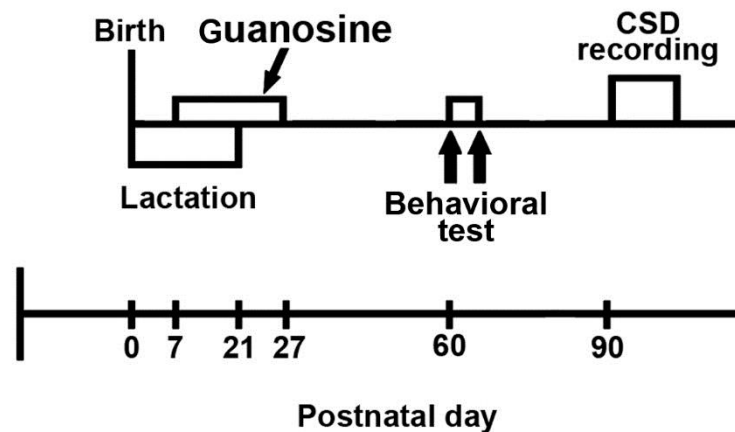


Figure 1: Time diagram showing the periods of GUO treatment, behavioral test and Cortical Spreading Depression recording.

The animals in this study were handled in accordance with the institutional norms of the Ethics Committee for Animal Research of our university (approval protocol n. 23076.052553/2016-35). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.2. Behavioral test in the Elevated Plus Maze (EPM)

The EPM is widely used in research to evaluate anxiety-like behavior in rats and mice (Pellow et al., 1986; Wall and Messier, 2001). EPM is a cross-shaped, varnished wood apparatus with two open arms (without lateral protection) and two closed arms (with 42 cm-high lateral walls), which are elevated about 55 cm above the floor. Each arm is 49 cm long x 10 cm wide. Both open and closed arms were connected by a central squared platform (10 × 10 cm wide). The EPM test was conducted under dim light and in a sound-attenuated room, at P60-65. After a 30 min room adaptation, the 5-min session was started by placing the animal in the central square facing an open arm. The behavioral activity of the animal was recorded by a video camera, and stored in a computer and subsequently analyzed with the software ANYmaze™ (version 4.99 m). In the interval between two consecutive tests, the arms and the central platform were cleaned with a paper cloth soaked with 70% ethanol. The following parameters were analyzed: 1) number of expelled fecal boluses, 2) total distance traveled, 3) immobility time, 4) number of entries into the open arms, 5) time spent in the open arms, and 6) rearing responses. We considered that the animal entered one open or one closed arm when its four paws entered the arm (Francisco and Guedes, 2015).

2.3. Recording of Cortical Spreading Depression (CSD)

On the day of CSD recording (P90–100), the animal was anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of 1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose i.p. (both purchased from Sigma, St. Louis, Mo, USA). Rectal temperature was kept at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ by positioning an electric heating plate under the animal. The animal's head was secured on a stereotaxic apparatus, and three trephine holes were drilled on the right side of the skull. These holes (one in the frontal bone, and two in the parietal

bone) were aligned in the frontal-to-occipital direction and parallel to the midline (see skull diagram of **Figure 4**, section 3.3). A 1-min application of a cotton ball (1–2 mm in diameter) soaked with 2% KCl solution (approximately 270 mM) to the anterior hole drilled at the frontal region elicited CSD consistently at 20 min intervals, over the 4 h-recording session, as previously described (Magalhães et al., 2018). Using two Ag–AgCl agar–Ringer electrodes (one in each hole), both the electrocorticogram and the DC slow potential change accompanying CSD were recorded through a digital recording system (Biopac MP 150, Goleta, CA, USA) against a common reference electrode that was placed on the nasal bones. The calculation of the CSD velocity of propagation was based on the time required for a CSD wave to pass the distance between the two cortical electrodes. The amplitude and duration of the DC slow potential change of CSD were also calculated as previously reported (Lima et al., 2017). After the end of the recording session, the animal was euthanized with an overdose of anesthetic.

2.4. Statistics

Statistical analysis was performed with the aid of the Sigmapstat^(TM) program (version 3.5). Results in all groups are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Data were compared between groups using one way ANOVA, followed when necessary by the Holm-Sidak test. Differences were considered significant where $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Body weight

At P8, 17, 27 and 62, there was no difference in the body weight observed in the GUO-treated rats compared to the age-matched controls (Nv and V). At P95, however, treatment with 50 and 100 mg/kg/d GUO was associated with higher body weights when compared to the control groups ($F_{[4,42]} = 6.836$; $p < 0.05$). Data on body weight are shown in **Figure 2**.

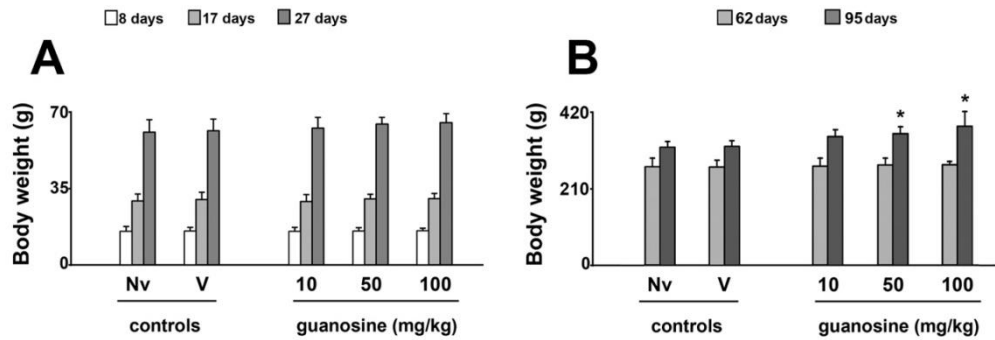


Figure 2. Body weight of the five groups of rats of this study: two control groups (naïve, Nv, without any treatment, and vehicle, V) and three groups treated from P7 to P27 with 10, 50 and 100 mg/Kg/day GUO. In A, Body weight at P8, 17 and 27. In B, Body weight at P62 and 95 (note changes in the ordinate scale). Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 10-13$ animals per group). * Significantly different from the corresponding control groups. (One way ANOVA followed by the Holm-Sidak test; $p < 0.05$).

3.2. Elevated Plus-Maze (EPM) test

In the EPM test, ANOVA revealed no significant intergroup difference in relation to the behavioral parameters, although a non-significant trend towards anxiogenesis could be observed, regarding the number of rearing responses ($F_{[4,37]} = 2.971$; $p = 0.057$), the number of entries into the open arms ($F_{[4,36]} = 1.734$; $p = 0.163$), and the time spent in the open arms ($F_{[4,36]} = 1.712$; $p = 0.168$). Data are shown in **Figure 3**.

Elevated plus maze

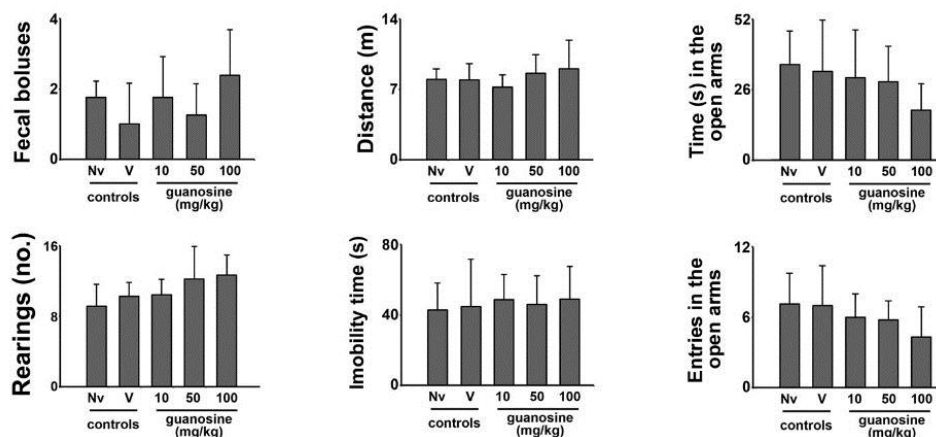


Figure 3. Behavioral activity of 60-65 days-old rats in the elevated plus maze test. From P7 to P27, three experimental groups were treated by intraperitoneal injection with GUO (10 mg/kg/day, 50 mg/kg/day or 100 mg/kg/day). They were compared to two control groups: one that has been treated with the vehicle (saline solution), and one without any treatment (naïve group). The bars represent mean values $\pm$ standard deviation for 8-9 rats per group. No significant differences were observed.

3.3. CSD parameters

Figure 4 illustrates electrophysiological recordings of five rats, representative of the five groups (two controls and three treated with GUO). On a regular basis (at 20 min intervals), the application of 2% KCl to one point of the frontal cortical surface for 1 min depressed the electrocorticographic activity and originated the slow potential change, which is typical of CSD. As CSD propagates, it was recorded by the two electrodes located more posteriorly in the same hemisphere.

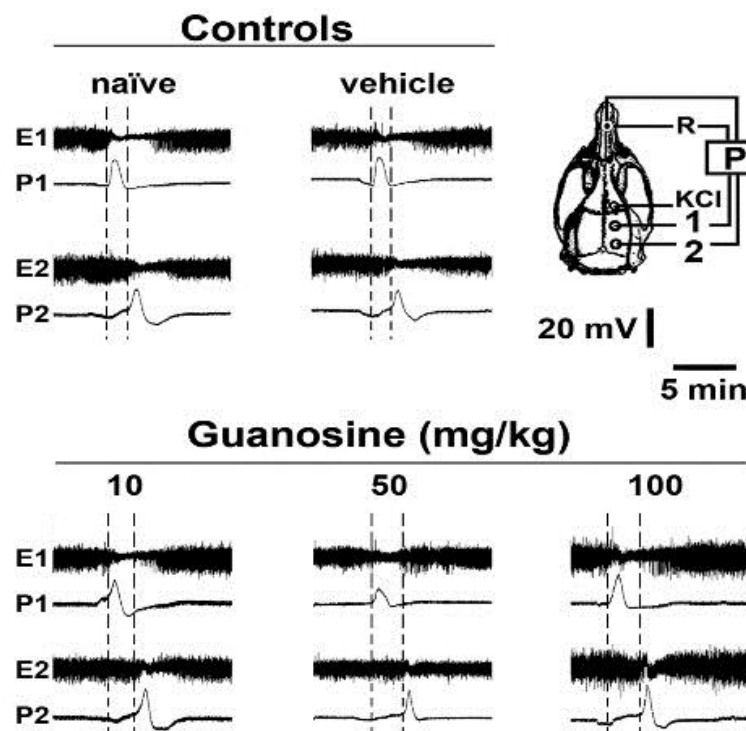


Figure. 4: Recording of CSD. Depression of Electrocorticographic activity (E) and slow DC-potential change (P) recorded during CSD in the right hemisphere of five 90-100-days-old rats, which are representative of the five groups treated chronically by intraperitoneal injection (one injection per day) with vehicle (saline solution), or Guanidine (10 mg/kg/day, or 50 mg/kg/day, or 100 mg/Kg/day), or no treated (naïve group). The vertical dashed lines delimit the time spent for each CSD episode to spread from recording point 1 to point 2. The diagram of the skull indicates the positions of the common reference electrode (R), the place of KCl application to elicit CSD (KCI), and the two recording locations (1 and 2). The distance between the two points for each animal was 5.8 mm.

ANOVA indicated intergroup differences in the three CSD parameters that were evaluated in this study. Regarding CSD propagation velocity and DC-shift amplitude, the ANOVAs ($F[4,51] = 131.45$; $p < 0.001$, and $F[4,43] = 14.06$; $p < 0.001$, respectively), and post-hoc test (Holm-Sidak) indicated that the velocity and amplitude were lower in the GUO-50 (2.87 ± 0.07 mm/min and 5.81 ± 0.92 mV) and GUO-100 (2.23 ± 0.24 mm/min and 5.16 ± 1.14 mV), in comparison with the two

control groups (Nv, 3.43 ± 0.09 mm/min and 10.66 ± 2.61 mV; V, 3.42 ± 0.10 mm/min and 10.42 ± 2.27 mV). Regarding the CSD-DC-shift duration, ANOVA ($F[4,43] = 59.00$; $p < 0.001$) and the Holm-Sidak post-hoc test revealed an increase in the GUO-50 (112.6 ± 8.7 s) and GUO-100 groups (120.8 ± 14.1 s) compared with the NV (68.8 ± 7.1 s) and V (68.7 ± 5.0 s). The CSD parameters for all groups are shown in **Figure 5**.

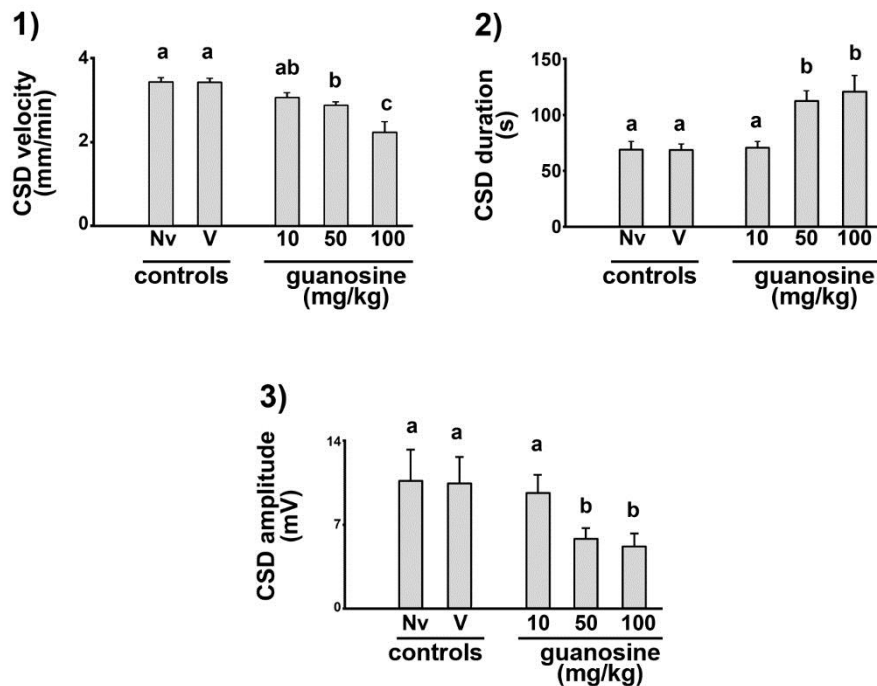


Figure 5: Guanosine-associated changes in the three CSD parameters: velocity of propagation (part 1), and duration (part 2) and amplitude of the negative DC-shift of CSD (part 3) in 90-100-days-old rats. Nv - naïve (did not receive any treatment; $n = 10$), V vehicle (received saline solution; $n = 10$), Guanosine (GUO 10, 50 and 100 mg/Kg/d; $n = 11$; 13 and 12, respectively). For each animal we calculated the mean value of the parameters based on 12 CSD episodes per rat, which were elicited at 20 minute intervals over the 4-hour recording period. Bars are means $\pm$ SD for the respective group. Different lowercase letters represent significant intergroup difference (ANOVA plus Holm-Sidak test; $p < 0.05$).

4. Discussion

This, to the best of our knowledge, is the first study that documents, in the developing rat brain, the CSD effects of chronic treatment with GUO. Since we have treated developing animals, we postulate that chronic GUO administration is causally associated with brain developmental alterations, which might modulate CSD propagation (Rocha-de-Melo et al., 2006; Mendes-da-Silva et al., 2014). The involvement of the stress associated with the intraperitoneal injection on the CSD

effects is unlikely, as the group that was injected with saline presented with CSD features similar to those of the naïve group (Fig. 5). Considering the potential effects of GUO on the behavioral and electrophysiological aspects of brain function, in this study we aimed at investigating in rats the possibility of GUO action on body weight gain, anxiety-like behavior, and CSD parameters. As detailed in the results section, our study suggests that treatment of developing rats with GUO for 21 days resulted in increased weight gain (later in adult life), a non-significant trend to increased anxiety-like behavior, and a significant deceleration of CSD (decreased velocity of propagation), which is suggestive of excitability changes in the cerebral cortex. A slight increased weight gain (Figure 2) was observed only in the groups that were treated with the two higher doses of GUO (50 mg/kg and 100 mg/kg), and just at adulthood (P95). Data about GUO effects on body weight are scarce in the literature. With GUO doses as low as 5 mg/kg or 8 mg/kg, no weight change was detected (Vinadé et al., 2005; Rathbone et al., 2011). In a much higher dose, however (60 mg/kg/day for 7 days), GUO impacted positively body weight of rats (Schmidt et al., 2010). Our GUO treatment paradigm (10 mg/kg/day, 50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day, over 21 days) is close to that of Schmidt et al (2010). It is worthy of note to state that, under our condition, we also observed an increase in body weight. Moreover, these positive data speak against substantial toxic effects of guanosine at our dose range. We speculate that the action of GUO on body weight might be causally related to its stimulating role on the production of trophic factors (Rathbone et al., 1999). Further investigation is needed to test this hypothesis.

The EPM test is widely used in animal models to reveal the effects of different drugs on anxiety-like behavior. EPM helps to evaluate the interaction and exploration of animals to the environment and to perceive the levels of anxiety that these animals have (Pellow et al., 1985). Those animals that spend more time in the closed arms of the EPM are considered more anxious than those that visit more frequently, or for a longer period, the open arms. Regarding the anxiety-like behavioral responses, our data are in line with Teixeira and co-workers (Teixeira et al., 2018), who reported the absence of GUO-related significant changes in anxiety-like behavior in rats that received a dose of GUO (60 mg/kg), which is within the dose range of our study. However, Almeida et al., (2017), who used a much lower GUO dose (7.5 mg/kg), found an anxiolytic effect. Therefore, similarly to the effects on body weight, the GUO effects on anxiety-like behavior seem to be modified as a function of the dose.

The GUO protective effects on brain cells are well documented, both *in vitro* and *in vivo* (Chang et al., 2008; Bellaver et al., 2015; Bettio et al., 2016a), and this includes the participation of GUO antioxidant action (Quincozes-Santos et al., 2014; Tasca et al., 2018). Interestingly, other molecules with redox properties, such as ascorbic acid, have been shown to influence CSD propagation (Mendes-da-Silva et al., 2014). Thus, we are tempted to suggest that GUO could act on CSD via alteration of brain redox balance.

However, considering the complexity in the brain events that promote the effects of GUO (Bettio et al., 2016b), the possibility exists that other mechanisms might contribute to completely explain the GUO neuroprotective actions. One interesting possibility is that the modulation of CSD propagation could involve the action of GUO at the glutamatergic system (Deutsch et al., 2008; Almeida et al., 2017).

In conclusion, the present findings allow us to draw three conclusions. First, GUO treatment in early life increases weight gain at adult life, but did not affect anxiety-like behavior. Second, chronic treatment of developing rats with GUO modulates the excitability-related phenomenon (CSD), decelerating its propagation. Third, as the weight and CSD effects were detected in adulthood, we conclude that these effects are permanent, or at least long-lasting. We consider as very important the development of therapeutic strategies that can protect the brain from behavioral-ischemia- and excitability-related diseases (Moretto et al., 2009; Mendes-da-Silva et al., 2018). In this context, this study used the CSD model as a novel approach to investigate the mechanisms of the protective action of GUO in the developing brain, regarding the relationship between the GUO model, antioxidants and anxiety.

5. Acknowledgements

This work was financially supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE-IBPG-1714-2.08/16), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq no. 445101/2014-8), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção—Edital INCT/MCT/CNPq, and Capes (Edital 043/2013 Ciências Do Mar II and BEX2036/15-0, Finance Code 001). RCA Guedes is research fellow from CNPq (No. 303636/2014-9).

6. References

- Almeida, R.F., Comasseto, D.D., Ramos, D.B., Hansel, G., Zimmer, E.R., Loureiro, S.O., Ganzella, M., Souza, D.O., 2017. Guanosine anxiolytic-like effect involves adenosinergic and glutamatergic neurotransmitter systems. *Mol. Neurobiol.* 54, 423-436. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9660-x>.
- Bellaver, B., Souza, D.G., Bobermin1, L.D., Gonçalves, C.A., Souza, D.O., Santos-Quincozes, A., 2015. Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. *Purinergic Signal.* 11, 571-580. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-015-9475-2>.
- Bettio, L.E.B., Pazini, F.L., Brocardo, P.S., Patten, A.R., Gil-Mohapel, J., Christie, B.R., Neis, V.B., Rodrigues, A.L.S., 2016a. The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 43, 1006-1015. <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.13172>.
- Bettio, L.E., Gil-Mohapel, J., Rodrigues, A.L., 2016b. Guanosine and its role in neuropathologies. *Purinergic Signal.* 12, 411-426. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-016-9509-4>.
- Chang, R., Algird, A., Bau, C., Rathbone, M.P., Jiang, S., 2008. Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo. *Neurosci. Lett.* 431, 101-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2007.11.072>.
- Deng, G., Qiu, Z., Dayong, L., Fang, Y., Zhang, S., 2017. Delayed administration of guanosine improves long-term functional recovery and enhances neurogenesis and angiogenesis in a mouse model of photothrombotic stroke. *Mol. Med. Rep.* 15, 3999-4004. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2017.6521>.
- Dreier, J.P., 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med.* 17, 439–447. DOI: 10.1038/nm.2333.

- Deutsch, S.I., Rosse, R.B., Long, K.D., Gaskins, B.L., Mastropaolo, J., 2008. Guanosine possesses specific modulatory effects on NMDA receptor-mediated neurotransmission in intact mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 18, 299-302. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2007.07.010>.
- Francisco, E.S., Guedes, R.C.A., 2015. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. *Amino Acids.* 47, 2437–2445. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2036-8>.
- Francisco, E.S., Guedes, R.C.A., 2018. Sub-convulsing dose administration of pilocarpine reduces glycemia, increases anxiety-like behavior and decelerates cortical spreading depression in rats suckled on various litter sizes. *Front. Neurosci.* 12:897, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00897>.
- Guedes, R.C.A., Tsurudome, K., Matsumoto, N., 2005. Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. *Brain Res.* 1036, 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.12.033>.
- Kovács, Z., Kékesi, K.A., Juhász, G., Dobolyi, A., 2015. Modulatory effects of inosine, guanosine and uridine on lipopolysaccharide-evoked increase in spike-wave discharge activity in Wistar Albino Glaxo/Rijswijk rats. *Brain Res. Bull.* 118, 46-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.09.003>.
- Lakatos, R.K., Dobolyi, A., Todorov, M.I., Kékesi, K.A., Juhász, G., Alekszah, M., Kovács, Z., 2016. Guanosine may increase absence epileptic activity by means of A2A adenosine receptors in Wistar Albino Glaxo Rijswijk rats. *Brain Res. Bull.* 124, 172-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.05.001>.
- Lauritzen, M., Strong, A.J., 2016. ‘Spreading depression of Leão’ and its emerging relevance to acute brain injury in humans. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 37, 1553-1570. <https://doi.org/10.1177/0271678X16657092>.
- Leão, A.A.P., 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7, 359-390. <https://doi.org/10.1152/jn.1944.7.6.359>
- Lima, D. S. C., Francisco, E.D.S. Lima, C. B., Guedes, R. C. A., 2016. Neonatal l-glutamine modulates anxiety-like behavior, cortical spreading depression,

and microglial immunoreactivity: analysis in developing rats suckled on normal size- and large size litters. *Amino Acids*. 49, 337-346. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-016-2365-2>.

Magalhães, P.C.G., Abadie-Guedes, R., da Costa Mendonça, M.A.B., de Souza, A.D., Guedes, R.C.A., 2018. Behavioral and electrophysiological brain effects of aspartame on well-nourished and malnourished rats. *Metab. Brain Dis.* 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0361-9>.

Martins-Ferreira, H, De Oliveira Castro, G., Struchiner, C.J., Rodrigues, P.S., 1974. Circling spreading depression in isolated chick retina. *J. Neurophysiol.* 37, 773-784. <https://doi.org/10.1152/jn>.

Mendes-da-Silva, R., Lopes-de-Morais, A.A.C., Bandim-da-Silva, M.E., Cavalcanti, G.D.A., Rodrigues, A.R.O., Andrade-da-Costa, B.L.S., Guedes, R.C.A., 2014. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: a cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. *Neuropharmacology*. 86, 155-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.06.027>.

Mendes-da-Silva, R., Francisco, E.D.S., Guedes, R.C.A., 2018. Pilocarpine/ascorbic acid interaction in the immature brain: electrophysiological and oxidative effects in well-nourished and malnourished rats. *Brain Res. Bull.* 142, 414-421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.09.008>.

Moretto, M.B., Boff, B., Lavinsky, D., Netto, C.A., Rocha, J.B.T., Souza, D.O., Wofchuk, S.T., 2008. 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. <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-008-9154-7>.

Nakamura H, Strong AJ, Dohmen C, Sakowitz OD, Vollmar S, Sué M, Kracht, L., Hashemi, P., Bhatia, R., Yoshimine, T., Dreier, J.P., Dunn, Graf, A.K., 2010. Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions. *Brain*. 133, 1994–2006. DOI 10.1093/brain/awq117.

- Pellow S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 14, 149-167.
- Pellow, S., File, S.E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 525-529.
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L.D., Souza, D.G., Bellaver, B., Gonçalves, C.A., Souza, D.O., 2014. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. *J. Neurochem.* 130, 61-74. <https://doi.org/10.1111/jnc.12694>.
- Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A., Reed, J.K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F., 1999. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59, 663- 690. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00017-9).
- Rathbone, M.P., Saleh, T.M., Connell, B.J., 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. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.06.027.
- Rocha-de-Melo, A.P., Cavalcanti J.de B., Barros A.S., Guedes R.C., 2006. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr. Neurosci.* 9, 155-60. <https://doi.org/10.1080/10284150600903602>.
- Schmidt, A.P., Lara, D.R., de Faria, J.M., da Silveira, A.P., Souza, D.O., 2000. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864, 40-43. DOI 10.1016/s0006-8993(00)02106-5.
- Schmidt, A.P., Paniz, L., Schallenberger, C., Böhmer, A.E., Wofchuk, S.T., Elisabetsky, E., Portela, L.V., Souza, D.O., 2010. Guanosine prevents thermal hyperalgesia in a rat model of peripheral mononeuropathy. *J. Pain.* 11, 131-141. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.010>.

- Shatillo, A., Salo, R.A, Giniatullin, R., Gröhn, O.H., 2015. Involvement of NMDA receptor subtypes in cortical spreading depression in rats assessed by fMRI. *Neuropharmacology*. 93, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.028>.
- Tasca, C.I., Lanznaster, D., Oliveira, K.A., Fernández-Dueñas, V., Ciruela, F., 2018. Neuromodulatory effects of guanine-based purines in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 376. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00376>.
- Teixeira, L.V., Almeida, R.F., Rohden, F., Martins, L.A.M., Spritzer, P.M., Souza, D.O.G., 2018. Neuroprotective effects of guanosine administration on in vivo cortical focal ischemia in female and male Wistar rats. *Neurochem. Res.* 43, 1476–1489. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2562-3>.
- Torres, F.V., da Silva Filho, M., Antunes, C., Kalinine, E., Antonioli, E., Portela, L.V., Souza, D.O., Tort, A.B., 2010. Electrophysiological effects of guanosine and MK-801 in a quinolinic acid-induced seizure model. *Exp. Neurol.* 221, 296-306. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.11.013>
- Vinadé, E.R., Schmidt, A.P., Frizzo, M.E., Portela, L.V., Soares, F.A., Schwalm, F.D., Elisabetsky, E., Izquierdo, I., Souza, D.O., 2005. Effects of Chronic Administered Guanosine on Behavioral Parameters and Brain Glutamate Uptake in Rats. *J. Neurosci. Res.* 79, 248-253. <https://doi.org/10.1002/jnr.20327>.
- Wall, P., Messier, C., 2001. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 275-286. [http://dx.doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00013-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00013-6).
- Wierońska, J.M., Pilc, A., 2013. Glutamate-based anxiolytic ligands in clinical trials. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 22, 1007-1022. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.803066>.

4 CONCLUSÃO & PERSPECTIVAS

Nossos resultados permitem formular as seguintes conclusões:

- 1- A administração crônica de guanosina, durante o período crítico do desenvolvimento cerebral do rato, aumentou o ganho de peso corporal e desacelerou a propagação da depressão alastrante cortical na vida adulta, nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia, mas não na dose menor (10 mg/kg/dia).
- 2- Estes efeitos de peso e da DAC foram detectados na vida adulta, portanto concluímos que esses efeitos são permanentes, ou pelo menos de longa duração.
- 3- O comportamento sugestivo de ansiedade, no labirinto em cruz elevado, não foi alterado com a administração de guanosina;
- 4- O efeito diferencial da guanosina (afetando o ganho de peso e a depressão alastrante, mas não o comportamento sugestivo de ansiedade) sugere a possibilidade de que os processos subjacentes ao comportamento de ansiedade dependam de mecanismos distintos dos outros dois e sejam menos sensíveis à ação da guanosina.
- 5- A administração intraperitoneal da guanosina, durante o período crítico do desenvolvimento cerebral, nas doses de 50 e 100 mg/Kg/dia exerceu um efeito, dependente da dose, sobre o peso corporal e a DAC.

Como perspectivas, propõe-se:

1. Prosseguir a linha de investigação das relações entre a guanosina e a depressão alastrante cortical, com vistas a esclarecer os mecanismos dessas relações;
2. Analisar, por métodos bioquímicos e imunohistoquímicos, a modulação guanositérgica sobre o equilíbrio redox e o padrão de ativação de células neuro-gliais;
3. Avaliar os parâmetros acima em animais submetidos previamente à desnutrição.

REFERÊNCIAS

- ABADIE-GUEDES, R.; SANTOS, S.D.; CAHÚ, T.B.; GUEDES, R.C.A.; BEZERRA, R.S. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** v.32, p.1417-1421, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00710.x>.
- ACCIOLY, N.E.; BENEVIDES, R.D.; DA COSTA, B.L.; GUEDES, R.C. Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. **Int J Dev Neurosci.** v.30, p.405-10. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.01.012>.
- ACCIOLY, N.E.; GUEDES, R.C.A. Neonatal treatment with ovarian hormones and suckling among distinct litter sizes: differential effects on recognition memory and spreading depression at adulthood. **Nutritional Neuroscience.** v.10, p.1-11, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/1028415x.2017.1358472>.
- ALMEIDA, R.F.; COMASSETO, D.D.; RAMOS, D.B.; HANSEL, G.; ZIMMER, E.R.; LOUREIRO, S.O.; GANZELLA, M.; SOUZA, D.O. Guanosine Anxiolytic-Like Effect Involves Adenosinergic and Glutamatergic Neurotransmitter Systems. **Mol Neurobiol.** v.54, p.423-436, 2017.
- ALVES, R.; BARBOSA DE CARVALHO, J.G.; VENDITTI, M.A.C. High- and Low-Rearing Rats Differ in the Brain Excitability Controlled by the Allosteric Benzodiazepine Site in the GABAA Receptor. **J. Beh. Brain Sci.** v.2, p.315-325, 2012. <http://dx.doi.org/10.4236/jbbs.2012.23036>.
- AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; MAIA, L.M.; GERMANO, P.C.; NEGRÃO, Y.D.; GUEDES, R.C. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Eur. J. Pharmacol.** v.706, p. 70–75, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.047>.
- AMARAL, A.P.B.; BARBOSA, M.S.S.; SOUZA, V.C.; RAMOS, I.L.T.; GUEDES, R.C.A. Drug/nutrition interaction in the developing brain: dipyrone enhances spreading depression in rats. **Exp. Neurol.** v.219, p.492–498, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.017>.
- BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A.A.; MENDES-DA-SILVA, R.F.; GUEDES, R.C. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: a spreading depression analysis. **Exp Gerontol.** v.47, 452-457, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.03.016>.
- BELLAVER, B.; SOUZA, D.G.; BOBERMINI, L.D.; GONÇALVES, C.A.; SOUZA, D.O.; SANTOS-QUINCOZES, A. Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. **Purinergic Signal.** v. 11, p.571-580, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-015-9475-2>.
- BETTIO, L.E.; Gil-Mohapel, J.; RODRIGUES, A.L. Guanosine and its role in neuropathologies. **Purinergic Signal.** v.12, p.411-426, 2016a. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-016-9509-4>.

BETTIO, L.E.B. Efeito tipo-antidepressivo da guanosina em diferentes modelos animais. 2016b. Tese (Doutorado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2016b.

BEZERRA, R. de S.; ABADIE-GUEDES, R.; MELO, F.R.; PAIVA, A.M.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C. Shrimp carotenoids protect the developing rat cerebral cortex against the effects of ethanol on cortical spreading depression. **Neurosci. Lett.** v.391, p.51-55, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.040>.

CHAGAS, C.L.; BENEVIDES, R.D.L.; BEZERRA, C.M.S.; ABADIE-GUEDES, R.; GUEDES, R.C.A. Ponderal, Behavioral, and Brain Electrophysiological Effects of Caffeine on the Immature Rat. **J. Caff. Aden. Res.** v.8, p.1-9, 2018. <http://dx.doi.org/10.1089/caff.2018.0009>.

CITTOLIN-SANTOS, G.F.; ASSIS, A.M. DE.; GUAZZELLI, P.A.; PANIZ, L.G.; DA SILVA, J.S.; CALCAGNOTTO, M.E.; HANSEL, G.; ZENKI, K.C.; KALININE, E.; DUARTE, M.M.; SOUZA, D.O. Guanosine exerts neuroprotective effect in an experimental model of acute ammonia intoxication. **Mol. Neurobiol.** v.54, p.3137-3148, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-9892-4>.

COSTA-CRUZ, R.R.G.; GUEDES, R.C.A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neurosci. Lett.** v. 303, p. 177-180, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01736-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01736-0).

COSTA-CRUZ, R.R.G.; SANTOS, A.A.; GUEDES, R.C.A. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. **Neurosci. Lett.** v.401, p.271-275, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.029>.

DAL-CIM, T.; MARTINS, W.C.; THOMAZ, D.T.; COELHO, V.; POLUCENO, G.G.; LANZMASTER, D.; VANDRESEN-FILHO, S.; TASCA, C.I. Neuroprotection promoted by guanosine depends on glutamine synthetase and glutamate transporters activity in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. **Neurotox. Res.** v.29, p.460-468, 2016. <http://dx.doi.org/10.9595-1007/s12640-015-z>.

DOBROCHINSKI, F.; DA ROSA GERBATIN, R.; SARTORI, G.; FERREIRA MARQUES, N.; ZEMOLIN, A.P.; ALMEIDA SILVA, L.F.; FRANCO, J.L.; FREIRE ROYES, L.F.; RECHIA FIGHERA, M.; ANTUNES SOARES, F.A. Regulation of mitochondrial function and glutamatergic system are the target of guanosine effect in traumatic brain injury. **J. Neurotrauma.** v. 34, p.1318-1328, 2017. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2016.4563>.

DREIER, J.P. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. **Nat. Med.** v.17, p.439–447, 2011. DOI: 10.1038/nm.2333.

FARIAS-SANTOS, R.C.; LIRA, M.C.A.; PEREIRA, D.E.S.; SÁ, I.R.; PIMENTEL, M.R.F.; ARAÚJO, L.L.; GUEDES, R.C.A. Exposure of developing well-nourished and malnourished rats to environmental heating facilitates cortical spreading depression propagation at adulthood. **Neurosci. Lett.** v.454, p.218-222, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.040>.

FREGNI, F.; MONTE-SILVA, K.K.; OLIVEIRA, M.B.; FREEDMAN, S.; PASCUAL-LEONE, A.; GUEDES, R.C.A. Lasting accelerative effects of 1 Hz and 20 Hz electrical stimulation on cortical spreading depression: relevance for clinical applications of brain stimulation. **Eur. J. Neurosci.** v.21, p.2278-2284, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04064.x>.

FREGNI, F.; LIEBETANZ, D.; MONTE-SILVA, K.K.; OLIVEIRA, M.B.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; NITSCHKE, M.A.; PASCUAL-LEONE, A.; GUEDES, R.C.A. Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. **Exp. Neurol.** v.204, p.462-466, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.09.019>.

GANZELLA, M.; DE OLIVEIRA E.D.; COMASSETTO, D.D.; CECHETTI, F.; CERESER, V.H.JR.; MOREIRA, J.D.; HANSEL, G.; ALMEIDA, R.F.; RAMOS, D.B.; FIGUEREDO, Y.N.; SOUZA, D.G.; OSES, J.P.; WORM, P.V.; ACHAVAL, M.; NETTO, C.A.; SOUZA, D.O. 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. <http://dx.doi.org/10.1007/s10072-011-0872-1>.

GERBATIN, R.D.R.; CASSOL, G.; DOBRACHINSKI, F.; FERREIRA, A.P.O.; QUINES, C.B.; PACE, I.D.D.; BUSANELLO, G.L.; GUTIERRES, J.M.; NOGUEIRA, C.W.; OLIVEIRA, M.S.; SOARES, F.A.; MORSCH, V.M.; FIGHERA, M.R.; ROYES, L.F.F. Guanosine protects against traumatic brain injury-induced functional impairments and neuronal loss by modulating excitotoxicity, mitochondrial dysfunction, and inflammation. **Mol. Neurobiol.** v.54, p.7585-7596, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0238-z>.

GIULIANI, P.; BALLERINI, P.; CICCARELLI, R.; BUCCELLA, S.; ROMANO, S.; D'ALIMONTE, I.; POLI, A.; BERAUDI, A.; PEÑA, E.; JIANG, S.; RATHBONE, M.P.; CACIAGLI, F.; DI IORIO, P. Tissue distribution and metabolism of guanosine in rats following intraperitoneal injection. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents.** v.26, 51-65, 2012.

GIULIANI, P.; BALLERINI, P.; BUCCELLA, S.; CICCARELLI, R.; RATHBONE, M.P.; ROMANO, S.; D'ALIMONTE, I.; CACIAGLI, F.; DI IORIO, P.; POKORSKI, M. Guanosine protects glial cells against 6-hydroxydopamine toxicity. **Adv. Exp. Med. Biol.** v.837, p.23-33, 2015. DOI: 10.1007/5584_2014_73.

GUEDES, R.C.A.; DO-CARMO, R.J. Influence of ionic alterations produced by gastric washing on cortical spreading depression. **Exp. Brain Res.** v. 39, p. 341-349, 1980.

GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.F.; MEDEIROS, M.C.; SILVA, A.T.; TEODÓSIO, N.R. Effect of dietary lithium on cortical spreading depression. **Braz. J. of Med. and Bio. Res.** v. 22, p. 923-925, 1989.

GUEDES, R.C.A.; BARRETO, J. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression. **Braz. J. of Med. and Bio. Res.** v. 25, p. 393-397, 1992.

GUEDES, R.C.A.; FRADE, S.F. Effect of Ethanol on cortical spreading depression. **Braz J Med Biol Res.** v.26, p.1241-1244, 1993.

GUEDES, R.C.A.; PEREIRA-DA-SILVA, M.S. Effect of pre- and postnatal propylthiouracil administration on the propagation of cortical spreading depression of adult rats. **Braz J Med Biol Res.** v.26, p.1123–1128, 1993.

GUEDES, R.C.A.; AMORIM, L.F.; TEODÓSIO, N.R. Effect of aging on cortical spreading depression. **Braz. J. of Med. and Bio. Res.** v.29, p.1407-1412, 1996.

GUEDES, R.C.A.; CAVALHEIRO, E.A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy Res.** v. 27, p. 33-40, 1997.

GUEDES, R.C.A.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; COSTA-CRUZ, R.R.G. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Nutr. Neurosci.** v. 5, n. 2, p.115-123, 2002.

GUEDES, R.C.; DE OLIVEIRA, J.A.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GARCÍA-CAIRASCO, N. Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar audiogenic rat (WAR). **Epilepsy Res.** v.83, p.207-214, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2008.11.003>.

GUEDES, R.C.A. Cortical Spreading Depression: a model for studying brain consequences of malnutrition. Chapter 148. In: Victor R. Preedy, Ronald R Watson and Colin R Martin (eds.), **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**, Springer, London, p. 2343-2355, 2011. DOI 10.1007/978-0-387-92271-3_148,

GUEDES, R.C.A.; ARAÚJO, M.G.R.; VERÇOSA, T.C.; BION, F.M.; DE SÁ, A.L.; PEREIRA, A. Jr., ABADIE-GUEDES, R. Evidence of an inverse correlation between serotonergic activity and spreading depression propagation in the rat cortex. **Brain Research.** v. 1672, p.29-34, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2017.07.011>.

HANSEL, G.; TONON, A.C.; GUELLA, F.L.; PETTENUZZO, L.F.; DUARTE, T.; DUARTE, M.M.M.; OSES, J.P.; ACHAVAL, M.; SOUZA, D.O. Guanosine Protects Against Cortical Focal Ischemia. Involvement of Inflammatory Response. **Mol. Neurobiol.** v. 52, p.1791-1803, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-014-8978-0>.

JIANG, S.; FISCHIONE, G.; GIULIANI, P.; ROMANO, S.; CACIAGLI, F.; DI IORIO, P. Metabolism and distribution of guanosine given intraperitoneally: implications for spinal cord injury. **Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids.** v.27, p.673-680, 2008. <https://doi.org/10.1080/15257770802143962>.

KOVÁCS, Z.; KÉKESI K.A.; DOBOLYI Á.; LAKATOS R.; JUHÁSZ G. Absence epileptic activity changing effects of non-adenosine nucleoside inosine, guanosine and uridine in Wistar Albino Glaxo Rijswijk rats. **Neuroscience.** v. 300, p.593-608, 2015a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.054>.

KOVÁCS, Z.; KÉKESIB, K.A.; JUHÁSZ, G.; DOBOLYI, A. Modulatory effects of inosine, guanosine and uridine on lipopolysaccharide-evoked increase in spike-wave discharge activity in Wistar Albino Glaxo/Rijswijk rats. **Brain Res. Bull.** v. 118, p.46-57, 2015b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.09.003>.

LAKATOS, R.K.; DOBOLYI, A.; TODOROV, M.I.; KÉKESI, K.A.; JUHÁSZ, G.; ALEKSZAH, M.; KOVÁCS, Z. Guanosine may increase absence epileptic activity by

means of A2A adenosine receptors in Wistar Albino Glaxo Rijswijk rats. **Brain Res. Bull.** v.124, p.172-181, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.05.001>.

LANZNASTER, D.; MACK, J.M.; COELHO, V.; GANZELLA, M.; ALMEIDA, R.F.; DAL-CIM, T.; HANSEL, G.; ZIMMER, E.R.; SOUZA D.O.; PREDIGER, R.D.; TASCA, C.I. Guanosine prevents anhedonic-like behavior and impairment in hippocampal glutamate transport following amyloid- β 1–40 administration in mice. **Mol. Neurobiol.** v.54, p.5482-5496, 2016a. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0082-1>.

LANZNASTER, D.; DAL-CIM, T.; PIERMARTIRI, T.C. B.; TASCA, C.I. Guanosine: a neuromodulator with therapeutic potential in brain disorders. **Aging Dis.** v.7, p.657-679, 2016b. <http://dx.doi.org/10.14336/AD.2016.0208>.

LEÃO, A.A.P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **J. Neurophysiol.** v.7, p.359-390, 1944. <https://doi.org/10.1152/jn>.

LEÃO, A.A.P. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. **J Neurophysiol.** v.10, p.409–414, 1947.

LIBERTO, V.D.; MUDÒ, G.; GAROZZO, R.; FRINCHI, M.; FERNANDEZ-DUEÑAS, V.; DI IORIO, P.; CICCARELLI, R.; CACIAGLI, F.; CONDORELLI, D.F.; CIRUELA, F.; BELLUARDI, N. The guanine-based purinergic system: the tale of an orphan neuromodulation. **Front. Pharmacol.** v.7, p.1-15. 2016. DOI:10.3389/fphar.2016.00158.

LIMA, D.S.C.; Maia, L.M.S.S.; Barboza, E.A.; Duarte, R.A.; Sousa, L.S.; GUEDES, R.C.A. L-glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. **Life Sci.** v.85, p.241-247, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.05.017>.

LOPES-DE-MORAIS, A.A.; MENDES-DA-SILVA, R.F.; DOS-SANTOS, E.M.; GUEDES, R.C. Neonatal dexamethasone accelerates spreading depression in the rat, and antioxidant vitamins counteract this effect. **Brain Res.** v. 1591, p.93–101, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.075>.

MAIA, L.M.S.S.; AMANCIO-DOS-SANTOS, A.; DUDA-DE-OLIVEIRA, D.; ANGELIM, M.K.C.; GERMANO, P.C.P.; SANTOS, S.F.; GUEDES, R.C.A. L-Arginine administration during rat brain development facilitates spreading depression propagation: evidence for a dose- and nutrition-dependent effect. **Nutr. Neurosci.** v.12, p.73-80, 2009.

MASSARI, C.M.; LÓPEZ-CANO, M.; NÚÑEZ, F.; FERNÁNDEZ-DUEÑAS, V.; TASCA, C.I.; CIRUELA, F. Antiparkinsonian efficacy of guanosine in rodent models of movement disorder. **Front. Pharmacol.** v. 8, p.1-8, 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2017.00700>.

MENDES-DA-SILVA, R.; LOPES-DE-MORAIS, A.A.C.; BANDIM-DA-SILVA, M.E.; CAVALCANTI, G.D.A.; RODRIGUES, A.R.O.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.S.; GUEDES, R.C.A. Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: a cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology.** 86, 155-160, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.06.027>.

MENDES-DA-SILVA, R., FRANCISCO, E.D.S., GUEDES, R.C.A., 2018. Pilocarpine/ascorbic acid interaction in the immature brain: electrophysiological and oxidative effects in well-nourished and malnourished rats. **Brain Res. Bull.** 142, 414-421, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.09.008>.

MORGANE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v.26, p.471–483, 2002.

OLIVEIRA, K.A.; DAL-CIM, T.A.; LOPES, F.G.; NEDEL, C.B.; TASCA, C.I. Guanosine promotes cytotoxicity via adenosine receptors and induces apoptosis in temozolomide-treated A172 glioma cells. **Purinergic Signal.** v. 13, p.305-318, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-017-9562-7>.

OSTADHADI, S.; KHAN, M.I.; NOROUZI-JAVIDAN, A.; CHAMANARA, M.; JAZAERI, F.; ZOLFAGHARI, S.; DEHPOUR, A.R. Involvement of NMDA receptors and L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of topiramate in mice forced swimming test. **Brain Res Bull.** v.122, p.62-70., 2016. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.004>.

PAIXÃO, A.D.O.; TRINDADE, A.S.; DANTAS, A.C.; BARRETO, I.S.S.; VIEIRA-FILHO, L.D.; MEDEIROS, M.C.; TEODÓSIO, N.R.; GUEDES, R.C.A. Impact of two early malnutrition models on renal and neural functions in rats. In: Vesler LW (Ed) *Malnutrition in the 21st Century* [ISBN 978-1-60021-788-3] Nova Science Publishers, Inc., N.York, Chapter. v. 13, 2007, p. 239-263.

PELLOW S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods.** v.14, p.149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.24, p.525-529, 1986.

PHAN, C.W.; WANG, J.K.; CHEAH, S.C.; NAIDU, M.; DAVID, P.; SABARATNAM, V. A review on the nucleic acid constituents in mushrooms: nucleobases, nucleosides and nucleotides. **Crit. Rev. Biotechnol.** v.38, 762-777, 2018. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1399102>.

QUINCOZES-SANTOS, A.; BOBERMIN, L.D.; SOUZA, D.G.; BELLAVER, B., GONÇALVES, C.A.; SOUZA, D.O. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. **J. Neurochem.** v.130, p.61-74, 2014. <https://doi.org/10.1111/jnc.12694>.

ROCHA-DE-MELO, A.P.; GUEDES, R.C.A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.30: p.663-669, 1997.

ROCHA-DE-MELO, A.P.; CAVALCANTI, J.B.; BARROS, A.S.; GUEDES, R.C.A. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression

after weaning and at adulthood. **Nutr. Neurosci.** v. 9, p. 155-160, 2006. <https://doi.org/10.1080/10284150600903602>.

SANTOS, R. S. Nutrição, hipertireoidismo precoce e desenvolvimento cerebral: estudo em ratos recém-desmamados. Dissertação de Mestrado. Depto de Nutrição, UFPE, 2000.

SANTOS-MONTEIRO, J.S.; TEODÓSIO, N.R.T.; GUEDES, R.C.A. Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. **Nutr. Neurosci.** v. 3, p. 29-40, 2000. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2000.11747301>.

SCHMIDT, A.P.; LARA, D.R.; DE FARIA MARASCHIN, J.; DA SILVEIRA PERLA, A., SOUZA, D.O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Res.** v. 864, p.40-43, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02106-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02106-5).

SCHMIDT, A.P.; LARA, D.R.; SOUZA, D.O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacol Ther.** v.116, p.401-416, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.07.004>.

SILVA-GONDIM, M.B.; DE SOUZA, T.K.M.; RODRIGUES, M.C.A.; GUEDES, R.C.A. Suckling in litters with different sizes, and early and late swimming exercise differentially modulates anxiety-like behavior, memory and electrocorticogram potentiation after spreading depression in rats. **Nutr. Neurosci.** v.28, p.1-10, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/1028415x.2017.1407472>.

SOARES, F.A.; SCHMIDT, A.P.; FARINA, M.; FRIZZO, M.E.; TAVARES, R.G.; PORTELA, L.V.; LARA, D.R., SOUZA, D.O. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. **Brain Res.** v.1005, p.182-186, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2004.01.053>.

SOUZA, D.G.; BELLAYER, B.; BOBERMIN, L.D.; SOUZA, D.O.; QUINCOZES-SANTOS, A. Anti-aging effects of guanosine in glial cells. **Purinergic Signal.** 12, 697-706, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-016-9533-4>.

SU, C.; WANG, P.; JIANG, C.; BALLERINI, P.; CACIAGLI, F.; RATHBONE, M.P.; JIANG S. Guanosine promotes proliferation of neural stem cells through cAMP-CREB pathway. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents.** v.27, p.673-80, 2013.

TEIXEIRA, L.V.; ALMEIDA, R.F.; ROHDEN, F.; MARTINS, L.A.M.; SPRITZER, P.M.; SOUZA, D.O.G. Neuroprotective effects of guanosine administration on in vivo cortical focal ischemia in female and male Wistar rats. **Neurochem. Res.** v.43, p.1476–1489, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2562-3>.

TENORIO, A.S.; OLIVEIRA, I.D.V.A.; GUEDES, R.C.A. Early vibrissae removal facilitates cortical spreading depression propagation in the brain of well-nourished and malnourished developing rats. **Int. J. Dev. Neurosci.** v.27, p.431–437, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.05.005>.

TERESA DE CALCUTÁ, Madre. Madre Teresa de Calcutá: por vezes sentimos que aquilo que.... Disponível em: <https://www.pensador.com/frase/MTIxOQ/>. Acesso em: 26 set. 2018.

THOMAZ, D.T.; DAL-CIM, T.A.; MARTINS, W.C.; CUNHA, M.P.; LANZNASTER, D.; DE BEM, A.F.; TASCA, C.I. Guanosine prevents nitroxidative stress and recovers mitochondrial membrane potential disruption in hippocampal slices subjected to oxygen/glucose deprivation. **Purinergic Signal.** v.12, p.707-718, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-016-9534-3>.

TORRENTE, D.; CABEZAS, R.; AVILA, M.F.; GARCÍA-SEGURA, L.M.; BARRETO, G.E.; GUEDES, R.C. Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: Is there a role for astrocytes?. **Neurosci. Lett.** v. 565, p.2-6, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.058>.

TORRES, F.V.; DA SILVA FILHO, M.; ANTUNES, C.; KALININE, E.; ANTONIOLLI, E.; PORTELA, L.V.; SOUZA, D.O.; TORT, A.B. Electrophysiological effects of guanosine and MK-801 in a quinolinic acid-induced seizure model. **Exp. Neurol.** v.221, p.296-306, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.11.013>.

VASCONCELOS, C.A.C.; OLIVEIRA, J.A.F.; COSTA, L.A.O.; GUEDES, R.C.A. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpine. **Nutr. Neurosci.** v. 7, p. 163-170, 2004. <https://doi.org/10.1080/10284150412331281031>.

VIGGIANO, E.; MONDA, V.; MESSINA, A.; MOSCATELLI, F.; VALENZANO, A.; TAFURI, D.; CIBELLI, G.; DE LUCA, B.; MESSINA, G.; MONDA, M. Cortical spreading depression produces a neuroprotective effect activating mitochondrial uncoupling protein-5. **Neuropsychiatric Dis. Treat.** v.12, p.1705-1710, 2016. <http://dx.doi.org/10.2147/ndt.s107074>.

XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R.C.A. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. **Braz. J. of Med. and Bio. Res.** v. 24, p.1277-1281, 1991.

WADIONI, A.; OSIM, E.E.; NWANKWO, A.A. Using the Elevated plus Maze Task in Assessing Anxiety and Fear in Swiss White Mice. **J. Compl. Med. Alt. Heal.** v.6, WALF, A.A.; FRYE, A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat. Protoc.** v. 2, p.322-328, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.

WALL, P.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v.25, p.275-286, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00013-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00013-6).

ANEXOS

ANEXO A – CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO DO ARTIGO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências da Saúde - Departamento de Nutrição
“Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naide Teodósio” (LAFINNT)
50670-901 Recife/PE Brasil
Phones: +55-81-21268936 // #FAX: +55-81-21268473.

Recife, January 29th, 2019.

To: the Editorial Office of the journal
Brain Research Bulletin

Subject: On line submission of a new manuscript

Dear Sirs,

I am submitting the manuscript entitled " **Behavioral and electrophysiological action of guanosine on the developing rat brain** ", by Joselma Maria da Silva, Ricardo Abadie-Guedes, Andreia Albuquerque Cunha Lopes-de-Morais and myself, to be considered for publication in **this Journal**, if judged acceptable.

I state herewith that the material of this article is not being presently considered for publication in any other journal, that its publication is approved by all authors and by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Finally, I state that the experiments were carried out in accordance with the “Principles of laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, USA) and were approved by the Ethics Committee for Animal research of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, where the experiments were performed. The funding agencies had no role in the experiments and we have no conflict of interest to declare.

Sincerely,



Rubem C. A. Guedes, MD, PhD – Corresponding author
e-mail: guedes.rca@gmail.com or rguedes@ufpe.br

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Ofício nº 22/17

Recife, 04 de abril de 2017.

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. **Rubem Carlos Araujo Guedes**

Departamento de Nutrição

Centro da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **23076.052553/2016-35**

Certificamos que a proposta intitulada "**Ação de diferentes doses da Guanosina sobre o cérebro em desenvolvimento: Análise comportamental e Eletrofisiológica (Depressão Alastrante Cortical) em ratos albinos**" registrada com o nº **23076.052553/2016-35** sob a responsabilidade de Prof.º **Rubem Carlos Araujo Guedes** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 29/03/2017.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/04/2017 até 03/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus/ Albinos/ Wistar
Nº de animais	50
Peso/Idade	Idade inicial de 15 gramas
Sexo	Macho
Origem	Biotério do Departamento de Nutrição

Atenciosamente


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

