

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**GUANOSINA REDUZ A NEUROTOXICIDADE E O
DÉFICIT MOTOR INDUZIDO PELO TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rogério da Rosa Gerbatin

Santa Maria, RS, Brasil

2016

**GUANOSINA REDUZ A NEUROTOXICIDADE E O DÉFICIT
MOTOR INDUZIDO PELO TRAUMATISMO
CRANIOENCEFÁLICO EM RATOS**

Rogério da Rosa Gerbatin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS, Brasil

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de mestrado

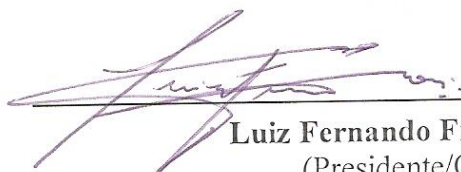
**Guanosina reduz a neurotoxicidade e o déficit motor induzido pelo
traumatismo cranioencefálico em ratos**

elaborada por

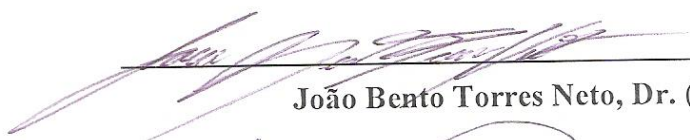
Rogério da Rosa Gerbatin

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora



Luiz Fernando Freire Royes, Dr.
(Presidente/Orientador)



João Bento Torres Neto, Dr. (UFPA)



Gustavo Orione Puntel, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 29 de janeiro de 2016

DEDICATÓRIA

*Esta dissertação é dedica aos meus pais e avós que sempre me deram o suporte necessário à
minha caminhada acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

Apesar de ser considerado um trabalho individual devido a sua finalidade acadêmica, a elaboração desta dissertação de mestrado só foi possível graças à participação direta e indireta de várias pessoas que tornaram meu percurso mais simples e prazeroso. Por essa razão gostaria de expressar aqui meu profundo reconhecimento e sincero agradecimento:

Aos meus pais Jorge e Ângela que sempre apoiaram e respeitaram minhas escolhas, abdicando muitas vezes de seus projetos pessoais com o intuito de proporcionar as melhores condições possíveis para a minha caminhada acadêmica. Muito Obrigado!

Aos meus avós Olmiro e Hipolita pelo apoio, carinho e momentos de descontração que nortearam essa caminhada. Ao meu padrinho Edgar Braz e madrinha Teresinha Braz e família, que mesmo longe sempre torceram pelo meu sucesso Muito Obrigado!

Aos Professores orientadores Nando e Michele (Mi), primeiramente pela oportunidade, pois a partir dela minha caminhada na pesquisa teve um início, pelos ensinamentos, investimento, amizade, confiança e principalmente pelo “livre-arbítrio” concedido para a realização deste trabalho. Muito Obrigado!

A Prof. Cris e Prof. GZ por terem me acolhido como eles chamam de “agregado de outros laboratórios”, de forma muito atenciosa, sempre disponibilizando e viabilizando tudo o que estava ao alcance para me ajudar. Agradeço a vocês pelas dicas de encaminhamento, ensinamentos, amizade, momentos de descontração no corredor e pela bolsa de estudos concedida gentilmente, a qual permitiu o término da realização dos meus experimentos. Muito Obrigado!

Ao Prof. Mauro pela amizade, discussões científicas e ensinamentos nos momentos de dúvida e dificuldade, tua vontade e disposição para a pesquisa foram inspiradoras. A Prof. Ana Flávia pela amizade e carinho. Muito Obrigado!

Ao Prof. Félix pela amizade. Ao Prof. Ademir Morel pela amizade, apoio e incontáveis caronas para Livramento durante toda minha trajetória acadêmica na UFSM. Muito Obrigado!

Aos ex-colegas do BioEx e amigos Maurício, Cabeludo, Mauren, Busa, Bibis, Fê, Lelê, Fred, Mandolate, Álcool Gél, Marla, Maurão, Letícia. Ao Léo e Xará que conduziram meus primeiros passos como I.C no Laboratório. A Aninha pelo carinho, amizade, bondade e paciência em ensinar e repassar seu conhecimento ao longo desses 5 anos e meio em que estive no Laboratório Bioex. Muito Obrigado!

Aos “atuais” colegas de trabalho e amigos, Samurai, Iuri, Vivi, Maurinho, Luiz, Fê (Tiopental), Ale, Vivi e especialmente ao Gustavinho Maça, pela amizade, dedicação e comprometimento com a realização dos experimentos deste trabalho. Muito Obrigado!

Ao Fernando (Pelotinhas), que a partir da parceria formada entre nossos laboratórios, surgiu não apenas ideias para esse e demais trabalhos, mas também se iniciou uma grande amizade. Fui muito gratificante trabalhar e aprender contigo. Muito Obrigado!

A Carolzinha, por todo o carinho, compreensão e apoio imprescindível durante toda minha trajetória do mestrado. Fui muito bom conviver contigo! Muito Obrigado!

Não esquecendo os colegas e amigos dos demais laboratórios:

Do prédio 18. Zé, Marlon, Marcel, Jessie, Gláubia, César, Vini, PC, Suricato, Alegrete e Zé Neto. Do prédio 19, Néelson, Sílvio, Guilherme e Diane. Do prédio 21, Mayara, Cissa, Jéssica e as “alemoas”

Ana e Thaíze. Muito Obrigado!

Aos meus amigos de Livramento, Dudu e Martinha; Rodrigo e Sabrina; Felipe e Sabrina, Fabricio, Vinicius, Paulo e Corpo móI. Muito Obrigado!

A Médica veterinária Ligia pelo fornecimento dos animais necessários para a realização desse estudo. Muito Obrigado!

Aos professores João Bento Torres, Gustavo Puntel e Micheli Pillat pela disponibilidade em avaliar esta dissertação e, sobretudo a UFSM, PPGBTOX e órgãos de fomento pelo auxílio financeiro para executar esse projeto.

EPIGRAFE

Seu trabalho preencherá grande parte de sua vida e o único jeito de estar verdadeiramente satisfeito é fazer o que você acredita ser um excelente trabalho, e um excelente trabalho só nasce do amor pelo que se faz!

Steve Jobs

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

GUANONISA REDUZ A NEUROTOXICIDADE E O DÉFICIT MOTOR INDUZIDO PELO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO EM RATOS

AUTOR: ROGÉRIO DA ROSA GERBATIN
ORIENTADOR: LUIZ FERNANDO FREIRE ROYES

Local e data de defesa: Santa Maria, 29 de janeiro de 2016.

O traumatismo cranioencefálico (TCE) afeta anualmente 10 milhões de pessoas ocasionando mortes e sintomas neurológicos que resultam em um impacto socioeconômico desfavorável a nível mundial. Sua fisiopatologia compreende múltiplos processos neurotóxicos, tais como a excitotoxicidade, disfunção mitocondrial e inflamação que conduzem a morte neuronal e, conseqüentemente a manifestações clínicas, como o déficit motor. Muitos estudos com drogas promissoras em modelos experimentais de TCE reportaram falhas quando testadas clinicamente, assim torna-se importante à busca por novas drogas terapêuticas. Atualmente, muita atenção tem sido dedicada aos efeitos neuroprotetores da guanosina, um nucleosídeo endógeno capaz de reduzir eventos neurotóxicos em modelos experimentais de isquemia *in vivo* e *in vitro*, que ao nosso conhecimento, ainda não foi avaliada no TCE. Portanto, o presente estudo avaliou o potencial terapêutico da guanosina no prejuízo locomotor e neurodegeneração após o TCE por controlar a excitotoxicidade, alterações mitocondriais e inflamatórias. Ratos Wistar machos foram submetidos ao TCE pelo modelo de lesão por percussão de fluido sagital (PFS) e 40 minutos após foi administrado guanosina na dose 7.5mg/kg via intraperitoneal (i.p). Nossos resultados revelam que a guanosina protege contra o prejuízo locomotor induzido pelo PFS 8 horas após o insulto. Do mesmo modo, a guanosina também foi capaz de proteger contra o dano neuroquímico no córtex ipsilateral caracterizado pela inibição da captação de glutamato, Na^+ , K^+ - ATPase e glutamina sintetase, alterações do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) seguido pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumento no conteúdo de proteínas carboniladas. De forma semelhante, a resposta inflamatória induzida pelo PFS evidenciada pelo aumento nos níveis de TNF- α , IL-1 β e edema cerebral também foi reduzida por esse nucleosídeo. Além destas descobertas, a guanosina protegeu contra a morte neuronal e ativação da caspase 3, reforçando seus efeitos neuroprotetores. Dessa forma, o nosso estudo representa uma importante contribuição para o conhecimento dos efeitos neuroprotetores da guanosina no TCE, tornando esta molécula uma atraente candidata para o tratamento desse insulto, embora mais estudos sejam necessários para esclarecer o seu potencial clínico no TCE.

Palavras-chave: Traumatismo cranioencefálico. Excitotoxicidade. Mitocôndria. Inflamação. Déficit motor. Guanosina. Ratos.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicology
Federal University of Santa Maria

GUANOSINE REDUCES THE NEUROTOXICITY AND THE MOTOR DEFICIT INDUCED BY TRAUMATIC BRAIN INJURY IN RATS

AUTHOR: ROGÉRIO DA ROSA GERBATIN
ADVISOR: LUIZ FERNANDO FREIRE ROYES

Date and place of defense: Santa Maria, January 29, 2016.

Traumatic brain injury (TBI) affects annually 10 million of people causing neurological symptoms and deaths resulting in an adverse socio-economic impact worldwide. The pathophysiology of TBI comprises multiple neurotoxic processes, such as excitotoxicity, mitochondrial dysfunction and inflammation leading to neuronal death and consequently clinical manifestations, as motor deficit. Many studies with promising drugs in experimental models of TBI reported failures in clinical tests, so it is important to search for new therapeutic drugs. Currently, much attention has been devoted to the neuroprotective effects of guanosine, an endogenous nucleoside able to reduce neurotoxic events in experimental models of ischemia *in vivo* and *in vitro*, which to our knowledge has not yet been evaluated in the TBI. Therefore, the present study evaluated the therapeutic potential of guanosine in locomotor impairment and neurodegeneration after TBI by controlling excitotoxicity, mitochondrial and inflammatory alterations. Male Wistar rats were subjected to TBI by moderate fluid percussion injury (PFS) parasagittal model and 40 minutes after was administered guanosine (7.5mg / kg intraperitoneally). Our results show that guanosine protects against the locomotor deficit induced by TBI 8 hours after the insult. Similarly, guanosine was also able to protect against the neurochemical damage in the ipsilateral cortex characterized by the inhibition of glutamate uptake, Na⁺, K⁺ - ATPase and glutamine synthetase activity, alterations in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) followed by an increase in production of reactive species oxygen (ROS) and content of protein carbonyls. Furthermore, the inflammatory response induced by TBI evidenced by increased levels of TNF- α , IL-1 β and cerebral edema was also reduced by guanosine. In addition to these findings, guanosine protected against the neuronal death and activation of caspase 3, reinforcing its neuroprotective effects. Thus, our study represents an important contribution to the knowledge of the neuroprotective effects of guanosine in the TBI, making this an attractive candidate molecule for the treatment of this insult, although more studies are needed to clarify their potential in clinical TBI.

Keywords: Traumatic brain injury. Excitotoxicity. Mitochondria. Inflammation. Motor deficit. Guanosine. Rats.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Introdução

Tabela 1 - Escala de coma de Glasgow	17
Figura 1 - Modelos experimentais para o estudo do TCE	18
Figura 2 - Fisiopatologia do TCE	19
Figura 3 - Neurotransmissão glutamatérgica	20
Figura 4 - Captação extracelular de glutamato	21
Figura 5 - Estrutura química da guanosina	25

Conclusão

Figura 6. Representação esquemática simplificada de conclusão da presente dissertação	61
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1R	Receptor de adenosina tipo 1
A2AR	Receptor de adenosina tipo 2
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropionico
AMPA/KA R	Receptor Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropionico e cainato
APAF-1	Fator de ativação de protease associada à apoptose 1
ATP	Adenosina trifosfato
EAAC	Carreador de aminoácidos excitatórios ratos
EAAT 1	Transportador de glutamato e aspartato do tipo 1 em humanos
EAAT 2	Transportador de glutamato do tipo 2 em humanos
EAAT 3	Carreador de aminoácidos excitatórios em humanos
EAAT 4	Transportador de glutamato do tipo 4 em humanos
ECGw	Escala de Coma de Glasgow
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GDP	Guanosina - 5' - difosfato
GLAST	Transportador de glutamato e aspartato em ratos
GLT-1	Transportador de glutamato do tipo em 1 ratos
GMP	Guanosina-5'-monofosfato
GS	Glutamina sintetase
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
i.p.	Intraperitoneal
ICC	Impacto cortical controlado
IL-1 β	Interleucina 1 beta
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KA	Ácido caínico
L-Glu	Glutamato
mGluR	Receptor metabotrópico glutamatérgico
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Sódio/potássio ATPase
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
OME	Onda mecânica de explosão
PFS	Percussão de fluído sagital
PIC	Pressão intracranial
PPMT	Poros de permeabilidade mitocondrial transitório
SNC	Sistema nervoso central
TCE	Traumatismo cranioencefálico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
V-GLUT 1	Transportador vesicular de glutamato do tipo 1
V-GLUT 2	Transportador vesicular de glutamato do tipo 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1. TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO	14
1.1.1 História e definição	14
1.1.2 Cenário da epidemiológico	14
1.1.3 Classificação do TCE	15
<i>1.1.3.1 Classificação quanto ao mecanismo físico da lesão</i>	15
<i>1.1.3.2 Classificação quanto à distribuição da lesão</i>	16
<i>1.1.3.3 Classificação quanto à gravidade clínica da lesão</i>	16
1.1.4 Modelos experimentais de TCE	17
1.1.5 Fisiopatologia	19
1.1.6 Excitotoxicidade	20
1.1.7 Disfunção Mitocondrial	22
1.1.8 Inflamação	23
1.1.9 Déficit neuromotor pós-traumático	24
1.2 GUANOSINA.....	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 RESULTADOS	29
3.1 MANUSCRITO EM FASE DE REDAÇÃO.....	30
Abstract	32
Introduction	33
Materials and methods	35
Results	42
Discussion	46
Conclusion	50
References	51
Legends and figures	55
4 CONCLUSÕES	60
4.1 CONCLUSÃO GERAL.....	61
4.2 CONCLUSÃO FINAL	61
5 REFERÊNCIAS	63

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma breve revisão sobre os temas abordados nesta dissertação seguida pelos itens **OBJETIVOS**.

Os **RESULTADOS** que fazem parte desta dissertação estão sob a forma de um manuscrito em fase de redação contendo suas respectivas seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas que representam a íntegra deste trabalho.

O item **CONCLUSÃO** encontrado no final desta dissertação apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. O item **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** refere-se somente as citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO

1.1.1. História e definição

O Traumatismo cranioencefálico (TCE) acompanha a humanidade desde as suas origens, e com a evolução tornou-se evidente o aumento progressivo de vítimas de traumas mecânicos por diversas causas externas. Segundo Melo *et al.*, (2004) foi a partir do ano de 1682 que o traumatismo craniano (nomenclatura antiga) começou a ser descrito como importante fator de óbito em suas vítimas, até atingir os elevados índices atuais de morbidade e mortalidade.

Em relação a sua definição, o TCE é considerado como uma alteração da função cerebral, manifestada como confusão, alteração do nível de consciência, convulsão, coma ou déficit neurológico sensitivo ou motor que resulta da aplicação de uma força, penetrante ou não, sobre o crânio (Bruns e Hauser, 2003).

1.1.2. Cenário epidemiológico

Estudos epidemiológicos são indispensáveis para o entendimento do TCE com importante finalidade em investigar sobre sua incidência e prevalência na população, apresentando estimativas completas para orientar a prevenção, identificar as melhores práticas terapêuticas e planejar futuros tratamentos que tenham menores custos e sejam mais efetivos (Barker-Collo *et al.*, 2009).

De outro modo, o TCE tem sido denominado mundialmente como uma “epidemia silenciosa” devido ao conhecimento limitado da sociedade sobre essa doença, em virtude da falta de estudos epidemiológicos abrangentes em alguns países e a ausência de registros de muitos casos de TCE nos departamentos de emergências e hospitais.

Segundo Andelic (2013) uma proporção considerável de pessoas idosas e/ou indivíduos que sofrem TCE leve (cerca de 75 %) no seu ambiente familiar são menos propensos a buscar atendimento hospitalar, o qual destina-se a vítimas de TCE moderado e grave (cerca de 25%), que são frequentemente mais estudados por conta dos critérios claros para definição de caso para tais ferimentos. Por outro lado, as lesões leves são mais suscetíveis a erros de diagnóstico ou negligência por profissionais clínicos. Sendo assim, ambos os fatores podem introduzir vieses substanciais nesse cenário epidemiológico.

Alguns dados fornecidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças alertam para a dimensão do TCE nos EUA, indicando sua incidência anual de 1,7 milhões de pessoas, das quais cerca de 52.000 morrem, 275.000 necessitam de tratamento hospitalar intensivo e 1,365 milhões são tratadas e liberadas dos departamentos de emergência (Faul *et al.*, 2010). Segundo Lewis (2007) a cada 7 segundos ocorre um TCE nos EUA e a cada 5 minutos uma pessoa morre e outra fica incapacitada.

Em razão disso, 5,3 milhões de pessoas vivem com algum tipo de sequela, trazendo consigo um alto índice de morbidade e expressivo impacto socioeconômico (Hyder *et al.*, 2007), gerando uma despesa anual de 76,5 bilhões de dólares para os EUA (Faul *et al.*, 2010; Coronado *et al.*, 2011). As principais causas que constitui esse panorama alarmante compreendem as quedas (35%), seguida dos acidentes com veículos automotores (17%), acidentes de trabalho e/ou pratica de esportes (16%), assaltos (10%), além de outras causas desconhecidas (22%) (Faul *et al.*, 2010).

No Brasil, estudos abrangentes abordando o tema são raros, e na sua maioria específicos de uma determinada região, o que dificulta o seu entendimento como um todo, mas alguns estudos disponíveis indicam que 74% dos TCEs ocorram devido a acidentes de trânsito (Oliveira *et al.*, 2012). De forma semelhante aos EUA, a incidência do TCE no Brasil é cerca de 1,6 a 2,8 vezes maiores em homens e constitui a principal causa de morte em pessoas com menos de 45 anos de idade de ambos os gêneros (Silver, J. M 2005; Coronado *et al.*, 2011). Agravando ainda mais esse quadro epidemiológico, um estudo indica que o TCE poderá tornar-se a terceira maior doença global em 2020 (Lopez e Murray, 1998).

1.1.3. Classificação do TCE

De acordo com Franciozi *et al.*, (2008), o TCE é uma patologia dinâmica, tanto no seu aspecto temporal como na coexistência com vários tipos de lesões. Para melhor compreensão podemos classificá-lo quanto: ao mecanismo físico da lesão (trauma penetrante ou fechado), à distribuição da lesão (lesões focais ou difusas) e à gravidade clínica (lesões leves, moderadas ou graves).

1.1.3.1. Classificação quanto ao mecanismo físico da lesão

Com relação aos mecanismos físicos de lesão no TCE, esses podem ser classificados em traumas:

- Penetrantes: Aqueles em que o crânio é atingido ou atinge um objeto (impacto com carga), muitas vezes causando destruição local e exposição do conteúdo craniano ao meio e, dependendo da energia cinética transmitida ao tecido, lesões difusas devastadoras (Saatman *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011).

- Fechado: Nesse caso, não é necessário o impacto do crânio com estruturas externas. Comumente acontecem em vítimas de acidentes de trânsito, onde a diferença de densidade do crânio em relação as estruturas cerebrais, geram cisalhamento, tensão e compressão sobre o tecido cerebral, devido as bruscas forças de aceleração e desaceleração da cabeça no momento do acidente (Gennarelli e Graham, 2005; Ferreira *et al.*, 2009).

1.1.3.2. Classificação quanto à distribuição da lesão

- Lesão Focal: Nesses casos de TCE, a lesão é causada mais frequentemente pelo trauma com contato direto a uma porção do encéfalo, resultando em contusões, lacerações, hemorragias e extensa morte celular local, geralmente é um quadro grave que necessita de tratamento cirúrgico de urgência, bastante comum em vítimas de acidentes por quedas (Dantas Filho, 2004; Silver *et al.*, 2005).

- Lesão Difusa (ou multifocal): Nesses casos de TCE, a lesão acomete o cérebro como um todo através de forças cinéticas que levam à movimentação, rotação e aceleração/desaceleração do encéfalo dentro da caixa craniana, bastante frequente em vítimas de acidente de trânsito. Dentre as lesões difusas, estão a concussão e lesão axonal difusa (Andrade, 2009).

Ainda existe a possibilidade do TCE com lesões mistas, onde lesões focais e difusas estão presentes no mesmo quadro clínico (Martins; Damasceno; Awada, 2008, p. 581).

1.1.3.3. Classificação quanto à gravidade clínica da lesão

Apesar de existir diferentes abordagens tecnológicas para classificar a gravidade do TCE, ainda é amplamente utilizado a Escala de Coma de Glasgow (ECG_w) que avalia a duração e profundidade das alterações de consciência e do coma do paciente, levando em consideração sua manifestação comportamental a partir de níveis crescentes de estímulos oculares, verbais e motores, os quais, geram uma pontuação total que será utilizada para classificar a gravidade do traumatismo em três categorias: leve (15 a 13 pontos), moderado (12 a 9 pontos) e grave (8 a 3 pontos).

Resposta ocular	Resposta verbal	Resposta motora
4 - Espontânea	5 – Orientado	6 - Obedece comandos
3 - Por comando verbal	4 - Desorientado, apropriado	5 - Localiza dor
2 - Por estímulo doloroso	3 - Palavras inapropriadas	4 - Retirada inespecífica
1 - Ausente	2 - Fala incompreensível	3 - Flexão anormal
	1 – Ausente	2 - Extensão anormal
		1 - Ausente

Tabela 1. Escala de Coma de Glasgow (Teasdale e Jennett, 1974).

Entretanto, em alguns casos essa classificação está sujeita a limitações, devido a diferença de idioma (Avaliador x paciente), sedação do paciente, paralisia, ingestão de álcool e outras drogas que acabam mascarando o nível de consciência real do paciente. Independentemente dessas restrições, a ECG_w continua a ser uma das mais consistentes formas imediatas de mensurar a gravidade da lesão cerebral (Silver *et al.*, 2005).

1.1.4. Modelos experimentais de TCE

Estudos pré-clínicos através de modelos experimentais de TCE em roedores são de grande importância para o entendimento dessa doença, pois produzem muitas características que mimetizam a condição humana e fornecem informações válidas para o desenvolvimento de novos tratamentos e condutas para essa condição clínica. Para estes fins, muitos modelos experimentais de TCE são amplamente utilizados atualmente, dentre eles podemos destacar o impacto cortical controlado, lesão em cabeça fechada, onda mecânica de explosão e percussão de fluido (Figura 1). Dentre os quatro modelos acima mencionados, o modelo de percussão de fluido é considerado um dos mais clinicamente relevantes, pois mimetiza em roedores as condições comumente observadas em pacientes com TCE, incluindo:

Alterações fisiológicas: Imediatamente após o TCE, a auto-regulação cerebral torna-se prejudicada, episódios de apnéia, cianose, diminuição na PaO₂ e aumento da PaCO₂ são observadas. A pressão intracraniana (PIC) aumenta nos primeiros minutos após o TCE, acompanhada por uma redução no fluxo sanguíneo e aumento da demanda metabólica (glicose até 150 %) (Thompson *et al.*, 2005).

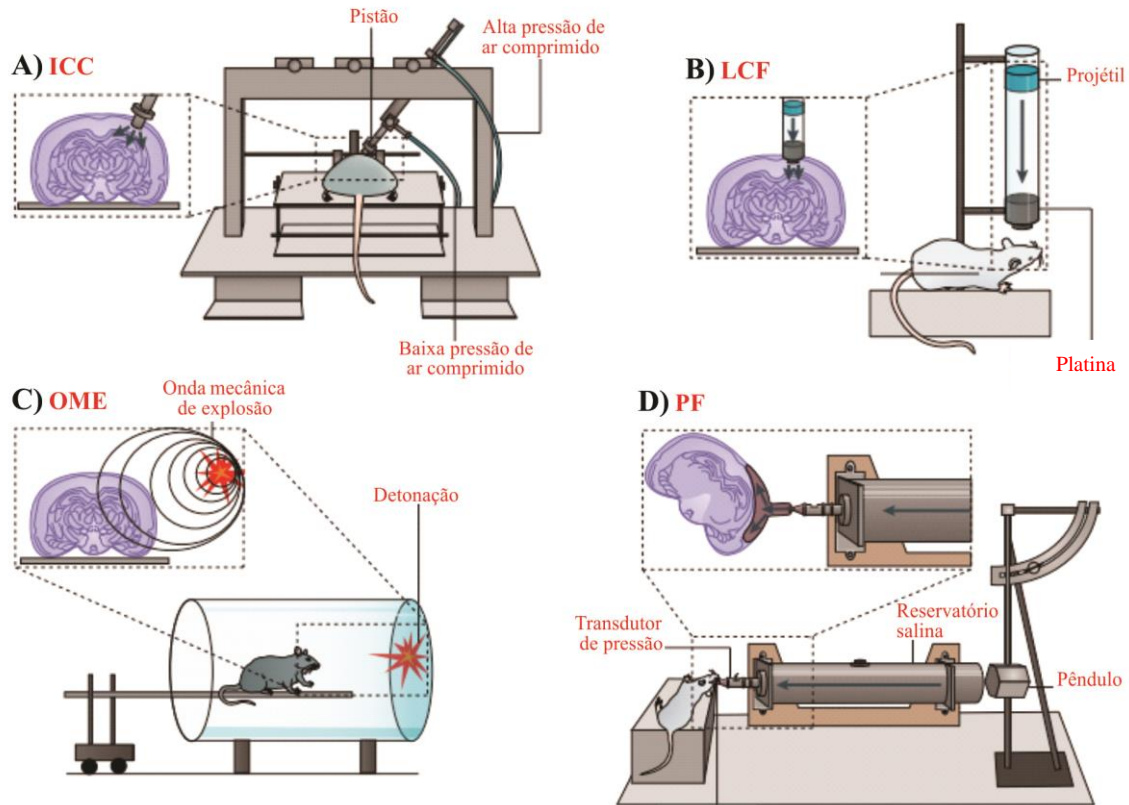


Figura 1. Modelos experimentais para o estudo do TCE. a) Impacto cortical controlado (ICC), esse modelo utiliza um dispositivo de impacto pneumático ou eletromagnético para dirigir um pêndulo rígido sobre a dura-máter (membrana cerebral mais externa) causando lesão predominantemente focal. b) Lesão em cabeça fechada (LCF), conhecido em inglês como “close head injury” ou “weight-drop”, onde um projétil em queda livre atinge o crânio com ou sem craniectomia resultando em uma lesão difusa por ação de forças inerciais ou focais respectivamente. c) Onda mecânica de explosão (OME), esse modelo não envolve impacto direto sobre o crânio, a lesão ocorre através das ondas de choque que se propagam sobre os tecidos cerebrais expostos a uma explosão, mimetizando o conflito de militares em zona de combate. d) Percussão de fluido (PF) envolve a trepanação craniana (linha média, sagital ou lateral) para a realização da craniectomia onde um jato de fluido em alta velocidade promoverá a lesão sobre a dura-máter do animal. Fonte: Adaptado de Xiong *et al.*, (2013).

Alterações histológicas: Conforme a gravidade do TCE fica evidente a perda de massa encefálica diretamente no local da lesão (córtex cerebral), bem como contusões em estruturas cerebrais internas (hipocampo, tálamo, estriado e amígdala) conhecidas por apresentar alterações morfológicas e morte celular (Thompson *et al.*, 2005).

Alterações comportamentais: Comprometimento motor, sensorial e cognitivo. Vários testes comportamentais avaliando esses parâmetros são utilizados para determinar o potencial clínico de vários tratamentos que oferecem intervenções terapêuticas no TCE.

Fisiopatologia: Através do dano focal com características difusas provocadas no momento do insulto, a fisiopatologia do TCE é extremamente semelhante a aquela observada em pacientes como discutida a seguir (Thompson *et al.*, 2005).

1.1.5. Fisiopatologia

A fisiopatologia do TCE é classificada de acordo com a progressão da lesão, basicamente dividida em dois estágios, denominados lesão primária e secundária (Figura 2).

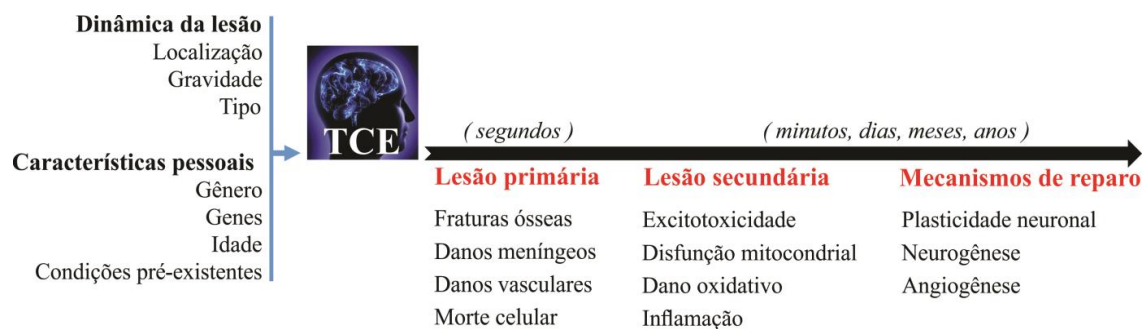


Figura 2. Fisiopatologia do traumatismo cranioencefálico. Adaptado de Hunt *et al.*, (2013).

A lesão primária é caracterizada pelo dano mecânico que ocorre no momento do impacto causando deformação e compressão dos tecidos dentro de segundos. As lesões mais frequentes incluem fraturas ósseas, danos axonais, meníngeos, vasculares e morte celular imediata (Pitkanen e McIntosh, 2006). Dessa forma, a lesão primária não é passível de tratamento, apenas prevenção a partir de políticas socioeducativas de incentivo ao uso do cinto de segurança, capacetes, combate à violência urbana, entre outros (Falavigna *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2013).

Por outro lado, a lesão secundária abrange múltiplos processos fisiopatológicos que ocorrem dentre minutos a anos subsequentemente a lesão primária e inclui vários mecanismos tais como: excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, dano oxidativo e inflamação, os quais podem configurar um quadro de neurotoxicidade (Werner e Engelhard, 2007; Kuffler, 2012). Em seguida, o cérebro também inicia mecanismos de “auto-reparo” do tecido lesado ao longo de dias a meses, período no qual é caracterizado por remodelação de circuitos sinápticos, proliferação de axônios, plasticidade sináptica, gliose, neurogênese e angiogênese (Hunt *et al.*, 2013).

A propagação da lesão secundária ocorre de forma crescente e prolongada,

estabelecendo uma janela temporal que permite intervenções neuroprotetoras. O principal objetivo de algumas dessas medidas consiste no reforço benéfico dos mecanismos de "auto-reparo", seguido da prevenção ou redução na progressão dessa lesão, gerando um "ambiente" propício para uma recuperação sem maiores sequelas para o paciente.

Um dos obstáculos desses estudos clínicos se deve ao caráter heterogêneo do TCE, devido à dinâmica da lesão (localização, gravidade, tipo de lesão) e características pessoais do paciente (idade, gênero, genes, condições pré-existent), que acabam produzindo diferentes prognósticos e desfechos clínicos (Hunt *et al.*, 2013).

1.1.6. Excitotoxicidade

Apesar da estimativa que aproximadamente 50 bilhões de neurônios teriam capacidade para produzir o glutamato (L-Glu), somente nos anos 70 ficou comprovado seu papel como transmissor químico nos mamíferos. Em condições fisiológicas a neurotransmissão glutamatérgica desempenha um papel fundamental em vários processos fisiológicos tais como: o desenvolvimento neural, a plasticidade sináptica, aprendizado e memória (Figura 3).

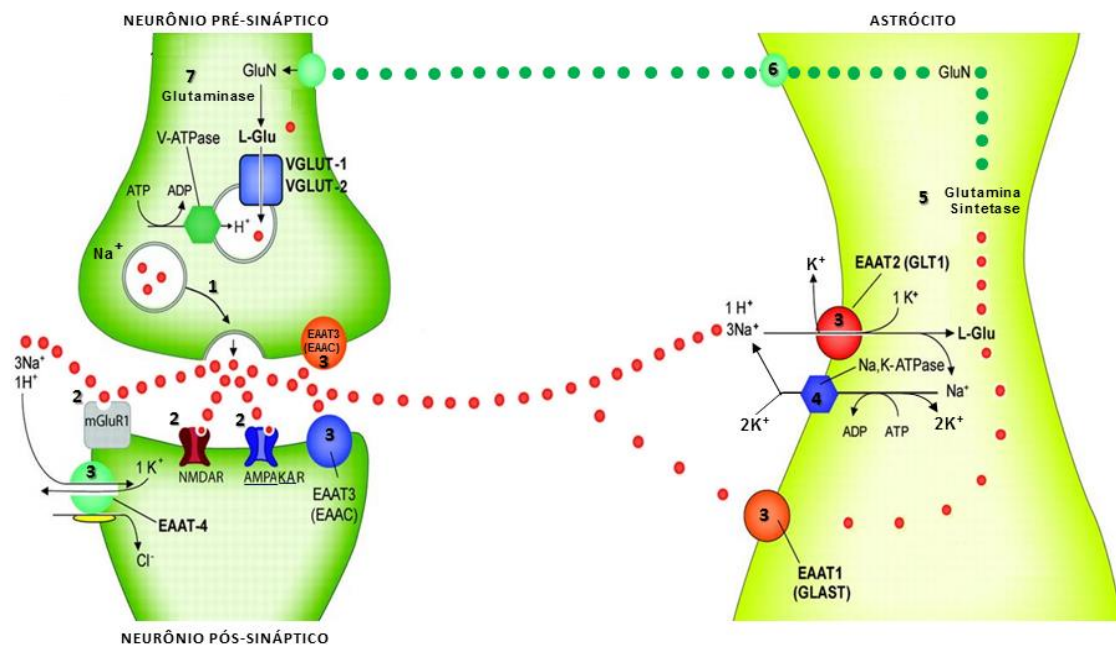


Figura 3. Neurotransmissão glutamatérgica. 1) Ions Na^+ induzem a despolarização de membrana e consequente liberação de glutamato (L-Glu) na fenda sináptica; 2) O L-Glu se liga à receptores ionotrópicos e metabotrópicos; 3) O L-Glu é removido da fenda sináptica através da recaptação pelas células gliais e neurônios mediada pela família de transportadores de alta afinidade dependentes de Na^+ (GLAST/EAAT1, GLT1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 e EAAT5); 4) A enzima de membrana Na^+ , K^+ - ATPase mantém o adequado equilíbrio iônico indispensável para o correto funcionamento dos transportadores de glutamato; 5) O glutamato é convertido em

glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase (GS); 6) A glutamina é transportada da célula glial para o neurônio; 7) Glutamina é convertida em glutamato pela ação da enzima glutaminase, encerrando o ciclo glutamato-glutamina (ciclo de reciclagem do neurotransmissor) disponibilizando o glutamato novamente para ser agregado a vesícula sináptica pela ação dos transportadores VGLUT1 e VGLUT2, para posterior liberação por excitação. (Adaptado de Benarroch, 2010).

Nessas condições a concentração de glutamato varia em torno de: 1-2 μM na fenda sináptica, 10 μM no líquido, 2mM no citoplasma das células astrocíticas, 10 mM no citoplasma de células neuronais e 100 mM nas vesículas sinápticas (Danbolt, 2001; Nedergaard *et al.*, 2002).

Em condições patológicas como observadas no TCE, a transferência de energia sequencial para os tecidos cerebrais gerada no momento do impacto do crânio provoca deformação mecânica nos axônios com consequente despolarização das membranas celulares e uma liberação maciça de neurotransmissores, dentre eles o glutamato (Palmer *et al.*, 1993; Globus *et al.*, 1995; Bullock *et al.*, 1998).

O glutamato também escapa através de membranas danificadas e passa da circulação sanguínea para o local da lesão devido a danos na barreira hematoencefálica. Rapidamente a concentração desse neurotransmissor aumenta no meio extracelular acima dos níveis fisiológicos estabelecendo um processo patológico denominado de excitotoxicidade, termo criado para definir a morte neuronal causada pela administração exógena de altas concentrações de glutamato ou compostos com ação agonista em receptores glutamatérgicos (Olney, 1990).

Dessa forma, o adequado controle das concentrações de glutamato no meio extracelular após o TCE é crucial para a sobrevivência celular. Os astrócitos são os principais responsáveis pela remoção do glutamato extracelular através da atuação sincrônica dos transportadores GLT1 e GLAST com a enzima Na^+ , K^+ - ATPase (Figura 4) (Voutsinos-Porche *et al.*, 2003).

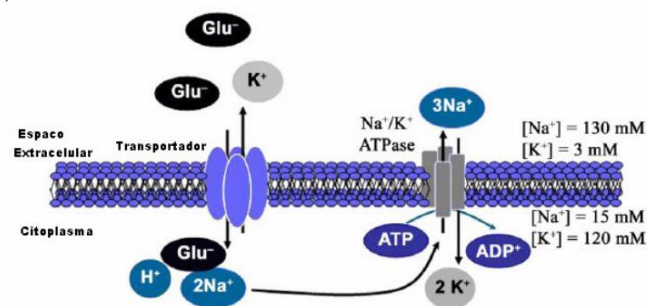


Figura 4. Captação extracelular do glutamato. O glutamato é transportado para o citoplasma dos

astrócitos através do co-transporte de 2 íons Na^+ com o a saída de íons K^+ para o meio extracelular. Este mecanismo depende do equilíbrio iônico celular mantido pela atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase que é fisicamente e funcionalmente acoplada aos transportadores e direciona 3 íons Na^+ para o meio extracelular e 2 íons K^+ para o citoplasma das células, favorecendo o correto funcionamento da captação de glutamato. (Camacho e Massieu, 2006).

Uma vez presente no citoplasma das células astrocíticas, o glutamato é rapidamente convertido em glutamina, um produto menos tóxico ao SNC, através da ação catalítica da enzima específica de astrócitos glutamina sintetase (GS). Dessa forma a glutamina pode retornar para o neurônio para ser convertida novamente a glutamato, o qual é incorporado em vesículas para posterior liberação por exocitose.

Entretanto, um recente estudo realizado pelo nosso laboratório demonstrou que a captação de glutamato em fatias do hipocampo e a atividade da enzima Na^+, K^+ - ATPase nessa estrutura cerebral apresentam diminuição na sua atividade quando analisadas 24 horas após o TCE (Fiorin *et al.*, 2015).

Vale ressaltar também que nos eventos isquêmicos, a atividade da enzima GS é afetada negativamente (Gennarelli, 1993; Gennarelli e Graham, 2005; Oliver *et al.*, 1990). Além disso, nessas condições, alguns estudos sugerem que ainda ocorra uma reversão dos transportadores de glutamato na membrana, que passam a direcionar o glutamato do citoplasma das células gliais para o meio extracelular (Danbolt, 2001).

Tomados em conjunto, todas as alterações mencionadas são relacionadas com o aumento do glutamato na fenda sináptica, que provoca a hiperativação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos pós-sinápticos (AMPA e Cainato) e principalmente o receptor NMDA, causando desequilíbrio iônico através do exacerbado influxo de Na^+ e Ca^{2+} em neurônios e células gliais (Hochstrate e Schlue, 1994; Pandya *et al.*, 2007; Kuffler, 2012).

1.1.7. Disfunção Mitocondrial

Com o intuito de manter o equilíbrio do Ca^{2+} intracelular, a mitocôndria sequestra grandes quantidades desse íon no seu interior. Entretanto, o excesso de Ca^{2+} nessa organela resulta na perda do potencial de membrana mitocondrial e diminuição no transporte de elétrons, favorecendo a excessiva produção de ERO seguido de um colapso bioenergético (Sullivan *et al.*, 2005). Estes dois últimos, são apontados como os principais eventos que conduzem a falência do transporte de glutamato e inibição na atividade das enzimas Na^+, K^+ - ATPase e GS, devido a sensibilidade nas alterações do estado redox celular e dependência de

ATP para esses processos (Oliver *et al.*, 1990; Morel *et al.*, 1998; Trotti *et al.*, 1998).

Nessas condições de baixo aporte de energia pela mitocôndria, o excesso de Ca^{2+} no citoplasma celular desencadeia processos de clivagem de proteínas estruturais através da ativação proteases como a calpaína e catepsina que culminam na morte (Saatman *et al.*, 2010; Schoch *et al.*, 2012). Por outro lado, o excesso Ca^{2+} intramitocondrial provoca a abertura dos poros de permeabilidade mitocondrial transitório (PPMT) e subsequente desenvolvimento do edema osmótico, em razão a um grande influxo de K^{+} decorrente da grande concentração de cargas negativas na matriz mitocondrial. Através desse poro ocorre a liberação do citocromo C para formar um complexo com a APAF- 1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai dar início a apoptose (Sullivan *et al.*, 2002; Macfarlane e Williams, 2004).

1.1.8. Inflamação

O processo inflamatório inclui vários eventos celulares e moleculares iniciados em resposta a danos teciduais cujo objetivo é manter a homeostase do tecido lesado. Entretanto, o seu desenvolvimento após o TCE tem sido implicado como um importante mecanismo de lesão secundária que contribui para a contínua neurodegeneração, prejuízos neurológicos e comportamentais (Clausen *et al.*, 2011). Neurônios, astrócitos e principalmente a micrógliia iniciam o processo inflamatório desencadeando a liberação de vários mediadores inflamatórios tais como as citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e interleucina 1beta ($\text{IL-1}\beta$), ambas relacionadas com vários efeitos nocivos ao SNC horas após o TCE (Moreau *et al.*, 2005).

Por exemplo, estudos farmacológicos e com animais geneticamente modificados apontam efeitos benéficos com a supressão do $\text{TNF-}\alpha$, tais como melhora no desempenho motor e cognitivo, redução da resposta inflamatória e apoptose (Shohami *et al.*, 1996; Shohami *et al.*, 1997; Khuman *et al.*, 2011). Da mesma maneira, a $\text{IL-1}\beta$ tem sido implicada na ocorrência do déficit e motor seguido por alterações neuroquímicas como neurodegeneração e aumento da ativação microglial (Tehrani *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2005). Outro evento comum após o TCE diretamente relacionado com a presença de ambas citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ é a consequente formação de edema, uma das principais preocupações clínicas que pode levar o paciente a danos neurológicos irreversíveis ou até mesmo a morte. Esse processo implica no aumento da pressão intracraniana (PIC) produzindo

compressão e herniações de estruturas vitais como o tronco cerebral seguido por uma persistente redução no fluxo sanguíneo e morte celular (Gaetz, 2004; Unterberg *et al.*, 2004; Donkin e Vink, 2010).

1.1.9. Déficit neuromotor pós-traumático

Embora os índices de mortalidade associados ao TCE tenham reduzido substancialmente nos últimos anos, os casos de incapacidades permanentes ainda são alarmantes em muitos sobreviventes (Shukla *et al.*, 2011). Muitas sequelas tais como problemas comportamentais, emocionais e incapacidades de origem cognitiva e física acabam prejudicando as atividades diárias dessa população caracterizada principalmente por jovens que até então eram produtivos para a sociedade (Dikmen *et al.*, 2001; Pitkanen e McIntosh, 2006).

Uma das frequentes sequelas é a disfunção motora, observadas precocemente após o TCE (Fujimoto *et al.*, 2004). O sistema motor consiste em uma complexa rede neural originária no córtex que se estende até os músculos esqueléticos. Tal rede inclui estruturas (córtex, córtex sensorio-motor, núcleo subcortical, cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal) cuja correta comunicação coordena os movimentos (Vander *et al.*, 2001). Acredita-se que o déficit motor apresentado pelos indivíduos que sofrem TCE ocorra a partir de lacerações e perturbações neuroquímicas em qualquer uma dessas estruturas dificultando o complexo equilíbrio das vias excitatórias e inibitórias que compõe esse sistema (Fujimoto *et al.*, 2004).

Alterações neuroquímicas frequentemente relacionadas ao surgimento de comprometimentos funcionais como o déficit motor após o TCE ocorrem através da resposta inflamatória e morte celular (McIntosh *et al.*, 1998). Dessa forma, mecanismos neurotóxicos como a excitotoxicidade e a disfunção mitocondrial desempenham um papel crucial no estabelecimento dessa condição. Embora o avanço no conhecimento dos mecanismos de lesão secundária induzidos pelo TCE, mais de 30 estudos prospectivos de fase III com drogas terapêuticas que demonstraram potencial em estudos com modelos experimentais de TCE, não conseguiram gerar resultados favoráveis no ambiente clínico. Em parte, muitos ensaios falharam porque o agente proposto para tratamento modulava apenas um único mecanismo da lesão secundária e a terapia por combinação de medicamentos não foi eficaz. Assim, dada a natureza heterogênea do TCE em humanos, a busca por novos tratamentos farmacológicos na pesquisa pré-clínica centra-se em drogas com a capacidade de modular diversas vias

neurotóxicas (múltiplos alvos) para maximizar as chances de desenvolver uma intervenção terapêutica bem sucedida (Loane e Faden, 2010; Kabadi e Faden, 2014).

1.2. GUANOSINA

Recentemente, muita atenção tem sido dedicada aos efeitos neuroprotetores da guanosina, um nucleosídeo endógeno que compreende uma base nitrogenada guanina ligada a um anel de ribose.

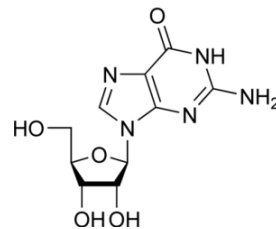


Figura 5. Estrutura química da guanosina. Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Guanosina>.

A guanosina pode ser formada em neurônios e astrócitos e no meio extracelular através da ação de endonucleotidasas que catalisam a transformação de guanosina-5'-trifosfato (GTP) a guanosina-5'-difosfato (GDP) e guanosina-5'-monofosfato (GMP), que é convertido pela ação de enzimas ectonucleotidasas a guanosina (Schmidt *et al.*, 2007). No SNC, os astrócitos são a principal fonte de guanosina que em condições fisiológicas ou patológicas lança esse nucleosídeo ao meio extracelular onde é conhecido por promover seus efeitos neuroprotetores.

Em 15 minutos após a administração intraperitoneal de guanosina, constatou-se um aumento considerável da concentração deste nucleosídeo no córtex total de roedores, indicando sua boa farmacocinética no SNC (Jiang *et al.*, 2008). Alguns estudos indicam que a guanosina exerce efeitos tróficos estimulando o crescimento axonal *in vitro* e diversos tipos celulares como astrócitos e micróglia. A guanosina também estimula a proliferação de astrócitos, síntese e liberação de fatores tróficos como o fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Rathbone *et al.*, 1992; Ciccarelli *et al.*, 2000; Ciccarelli *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2007; Giuliani *et al.*, 2012).

Em modelos experimentais que estabelecem condições excitotóxicas, o efeito da guanosina destaca-se através da modulação dos transportadores de glutamato que implica na possível redução de glutamato na fenda sináptica e subsequente diminuição de eventos neurodegenerativos. Em um modelo de convulsão em ratos, a administração oral de guanosina protegeu contra as convulsões e redução na captação de glutamato induzida por ácido

quinolínico (De Oliveira *et al.*, 2004). Em fatias do hipocampo submetidas à isquemia *in vitro* a guanosina exerce efeitos neuroprotetores por modular a captação de glutamato, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, inibir o fator NFκB e diminuir a expressão da enzima iNOS (Dal-Cim *et al.*, 2013).

Em um modelo celular da doença de Parkinson, a guanosina promove a sobrevivência celular de neurônios dopaminérgicos por atenuar a disfunção mitocondrial através da estabilização do potencial de membrana mitocondrial, diminuir a produção de ERO e modular os níveis de proteínas envolvidas nos mecanismos de apoptose intrínsecos. (Li *et al.*, 2014).

De acordo com Dal-Cim *et al.*, (2013) a guanosina também impede a alteração do potencial mitocondrial induzida por deprivação de oxigênio e glicose (DOG) em fatias do hipocampo e protege cultura de células SHSY5Y de neuroblastoma contra danos oxidativos induzidos pelo comprometimento da atividade mitocondrial (Dal-Cim *et al.*, 2012). Em cultura de astrócitos, a guanosina protege contra o dano oxidativo e inflamação induzido por azida através de um possível efeito antioxidante (Quincozes-Santos *et al.*, 2014).

No que diz respeito a parâmetros de inflamação, em um modelo *in vivo* de isquemia em ratos, a guanosina reduziu o número de células microgliais e o nível de citocinas pró-inflamatórias e aumentou o nível das citocinas anti-inflamatórias no cérebro, promovendo redução na morte neuronal e melhora no comportamento exploratório desses animais (Hansel *et al.*, 2015). Em um modelo de inflamação induzido por lipossacarídeo em cultura primária de astrócitos, a guanosina inibe a resposta pró-inflamatória e estresse oxidativo via Heme-oxigenase-1 (Bellaver *et al.*, 2015).

Nesse contexto, devido às evidências citadas acima e a importância de um tratamento mais adequado, considera-se necessário avaliar a hipótese de que a guanosina possa ter um efeito neuroprotetor ao dano iniciado pelo TCE. Assim, dado o elevado grau de limitação motora e/ou cognitiva que o TCE ocasiona ao paciente, o entendimento dos mecanismos de toxicidade cerebral envolvidos nas alterações neurológicas é importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para essa condição clínica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da guanosina na neurotoxicidade e prejuízo motor induzido pelo TCE em ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Considerando os aspectos mencionados, os objetivos específicos deste estudo compreendem avaliar o efeito da guanosina após o TCE:

- nas alterações comportamentais (motoras e exploratórias);
- nos parâmetros do sistema glutamatérgico;
- na função mitocondrial (potencial de membrana e geração de ERO) e apoptose (caspase 3);
- na morte celular;
- nas alterações inflamatórias;
- na formação de edema cerebral

3.1 MANUSCRITO EM FASE DE REDAÇÃO

Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas do manuscrito estão dispostos de acordo com a recomendação do periódico científico no qual será submetido.

Guanosine protects against traumatic brain injury-induced functional impairments and neurodegeneration by modulating excitotoxicity, mitochondrial dysfunction and inflammation

Rogério R. Gerbatin^{a*}, Gustavo Cassol^a; Fernando Dobrachinski^b; Ana Paula. O. Ferreira^a;
Caroline B. Quines^c; Iuri D. Della Pace^a; Guilherme L. Busanello^a; Jessié M. Gutierrez^b;
Cristina W. Nogueira^c; Mauro S. Oliveira^d; Félix A. Soares^b; Vera M. Morsch^b; Michele R.
Fighera^{a,c}; Luiz Fernando F. Royes^a;

^a Laboratório de Bioquímica do Exercício, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^c Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^d Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^e Departamento de Neuropsiquiatria, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

*Correspondence should be sent to:

Rogério Gerbatin

Laboratório de Bioquímica do Exercício, Centro de Educação Física e Desportos,

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail: rogeriogerbatin@hotmail.com

Abstract

Traumatic brain injury (TBI) is one of the most common types of brain injuries that cause death or persistent neurological disturbances to survivors. Most of the promising experimental drugs were not effective in clinical trials and therefore developing TBI drugs represents a huge unmet need. In this context, arises the guanosine, an endogenous neuroprotective nucleoside that, to our knowledge, has not been evaluated in TBI. Therefore, the present study evaluated the effect of guanosine on TBI-induced neurological damage. Our findings showed that a single dose of guanosine (7.5 mg/kg, i.p) injected 40 min after fluid percussion injury (FPI) in rats protected against the locomotor and exploratory impairments induced by this model of TBI 8 hours after injury. In this same way, the treatment with guanosine was also able to protect against the neurochemical damage induced by FPI in the ipsilateral cortex, such as inhibition of glutamate uptake, Na⁺, K⁺ - ATPase and glutamine synthetase activity, alterations in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), mitochondrial ROS production and the increase in protein carbonyl content. The inflammatory response caused by FPI, characterized here as TNF- α , IL-1 β , and brain edema, was also reduced by this nucleoside. In addition to these findings, guanosine similarly protected against neuronal death and caspase 3 activation, reinforcing its protective effects. Therefore, this study suggests for the first time that guanosine plays a neuroprotective role in TBI that can be exploited as a new pharmacological strategy.

Key-words: traumatic brain injury, functional impairments, neurodegeneration, glutamate, mitochondria, inflammation, cerebral edema, guanosine.

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a critical public health problem with strong socio-economic impact worldwide. It is estimated that 10 million of people are affected annually by TBI followed by an expectation to become a major cause of death and disability by the year 2020 (Hyder et al., 2007).

TBI results in several neurological disorders characterized by the combination of both the primary (caused at impact) and secondary damage that can be prevented for therapeutic interventions because of delayed onset after the initial insult (Mustafa and Alshboul, 2013). In this context, common functional impairments observed precociously after TBI occur in course with multiple secondary pathophysiological mechanisms responsible for the activation of pathways for neuronal death, such as excitotoxicity, mitochondrial dysfunction and inflammation (Mustafa and Alshboul, 2013; Yang et al., 2015).

In the central nervous system (CNS) glutamate is involved in essential brain functions, such as memory, learning and neural development (Danbolt, 2001). For these benefits, a suitable balance between release, uptake and recycling of glutamate is crucial to maintain this neurotransmitter below the toxic levels (Danbolt, 2001). However, TBI induces a disruption in the glutamatergic system homeostasis, resulting in the accumulation of extracellular glutamate, as well as a massive influx of Na^+ and Ca^{2+} into neurons and glial cells (Hochstrate and Schlue, 1994; Yi and Hazell, 2006).

In this perspective, the balance of mitochondrial respiration that is essential for cell survival becomes impaired, resulting in excessive production of reactive oxygen species (ROS), oxidative damage and bioenergetic collapse (Pandya et al., 2007). These events contribute to failure in astrocytic glutamate transporters and inhibition in the activity of the enzymes Na^+ , K^+ - ATPase and Glutamine Synthetase (GS) being accompanied by extensive neurodegeneration (Morel et al., 1998; Oliver et al., 1990; Trotti et al., 1998).

In order to repair the injured tissue, TBI also triggers a wide variety of inflammatory mediators including cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) (Su et al., 2014). However, this process could be harmful to healthy cells exacerbating the initial damage and contributing to the development of brain edema, one of the main clinical concerns that cause irreversible neurological damage or even death hours after TBI (Gaetz, 2004; Su et al., 2014).

Although TBI it is considered a devastating disease that commonly causes death or persistent neurological disturbances to survivors, there are currently no available treatment (Kabadi and Faden, 2014). In this context, guanosine appears as an endogenous molecule that has neuroprotective effects against different neuronal insults, however, to our knowledge, no studies have evaluated its effects on TBI (Schmidt et al., 2007).

The guanosine is released from astrocytes in basal and toxic conditions or alternatively formed from extracellular hydrolysis of derivatives of guanine nucleotides (Schmidt et al., 2007). Recent studies in experimental models of brain injury *in vitro* and *in vivo* showed the neuroprotective effect of guanosine, by the ability to modulate mechanisms involved in excitotoxic events, oxidative stress, inflammation and consequent neuronal death (Bellaver et al., 2015; Dal-Cim et al., 2013; Hansel et al., 2014; Paniz et al., 2014).

Therefore, it is reasonable to propose that this molecule may offer neuroprotection in TBI. For this purpose, in this study we used a clinically relevant model of TBI (Fluid percussion injury-FPI) that reproduces many of the key pathophysiological features exhibited in humans (Thompson et al., 2005), to investigate the hypothesis that guanosine attenuates the development of neurodegeneration and functional impairment after TBI by controlling the excitotoxic, mitochondrial and inflammatory alterations.

2. Materials and methods

The manuscript was written in accordance with the ARRIVE guidelines.

2.1 Animals, ethics statement and reagents

Male Wistar rats (217) with 120 days of age (290-340 g) supplied from our own breeding colony were used in this study. The animals were housed in groups of 4 animals per cage of polypropylene (41 cm×34 cm×16 cm, 1394 cm² total: LxWxH) with the floor covered with autoclaved shavings under controlled conditions (12:12 h light-dark cycle, lights turned on at 07:00 a.m.; 24 ± 1°C; 55% relative humidity) for a ventilated rack, with access to water and food (Puro Lab 22PB) *ad libitum*. All procedures with animals followed guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of Federal University of Santa Maria, Brazil (#process number 141/2014). All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) except for [³H]-glutamic acid, 1 mCi/37MBq, which was purchased from American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA).

2.2 Drug treatment

The solution of guanosine dissolved in 0.9% saline was maintained at 37°C during injections to prevent drug precipitation. The dose used in this study was selected based in our previous study with a dose-response curve (Soares et al., 2004) and others (Paniz et al., 2014; Tavares et al., 2008) in which the guanosine (7.5 mg/kg) confers neuroprotection when intraperitoneally (i.p) administered to rats in different experimental models.

2.3 Experimental design

Initially, the animals are habituated to the rotarod and after was performed the surgical procedure for fixing TBI cannula. Twenty-four hours later, the rotarod test was performed and only animals who obtained success (6 animals failed and were excluded from the study) were randomly assigned to either control (Sham) or TBI groups. TBI group was submitted to lesion

induction and together with its control (Sham) received one single injection of guanosine or its vehicle 0.9 % saline, i.p. 40 min later the brain injury. This procedure generate four groups; Sham-saline, Sham-guanosine, TBI-saline or TBI-guanosine analyzed in this study. Finally, 8 hours after TBI, period in which all investigated neurotoxic events are underway with functional impairment, the behavioral evaluation (tests of exploratory behavior and rotarod) was performed followed by the subsequent neurochemical analyzes (Figure1).

2.4 Surgical Procedure and induction of TBI

FPI model was performed as previously described (Silva et al. 2013) with minor modifications. In brief, with the animals anesthetized (equithesin 4 mL/kg i.p), a craniotomy 3 mm in diameter was drilled 2 mm posterior to the bregma and 3 mm lateral (right) to the midline. A plastic injury cannula was fixed with cyanoacrylate, stabilized with dental cement waiting to become hardened to fill with saline and closed by plastic cap. After 24 hours, the animals were anesthetized (isoflurane 1% inhaled) and the injury cannula attached to the FPI device (Amscien Instrument, model FP302). TBI was induced by a transient fluid pressure ($1.40 \text{ atm} \pm 0.09$) applied against the dura exposed causing apnea (30-70 seconds) and unconsciousness (6-9 min) measured through the righting reflex restoration (Thompson et al., 2005). Overall mortality after TBI was 22.68% (27 animals from 119, where 22 of these animals died before they regain consciousness and other 5 rats died in their home cages before the end of the protocol). From the parameters collected we conclude that was produced a moderate TBI (Kabadi et al., 2010; Thompson et al., 2005). Sham-operated animals underwent an identical procedure, with the exception of the fluid percussion injury.

2.5 Behavior Tests

2.5.1 Spontaneous locomotor activity

Rats were placed in the center of the apparatus (activity monitor EP 149-IR-Insight, Brazil) and allowed to freely explore the arena (50cm x 48cm x 50cm: L x W x H). The number of crossings, rearings, average velocity (mm/s) and total distance traveled (mm) were recorded for a 4 min period. After each test, all cubic arena was cleaned with 30% ethanol solution to avoid bias based on olfactory cues.

2.5.2 Rotarod test

The rotarod test (EFF 411, Insight, Brazil) involves both forelimb and hindlimb motor coordination (Whishaw et al., 2003). Before surgery for TBI, the animals were habituated and trained to remain in the rotarod under a constant speed of 8 rpm for 300 s, criteria used for the following tests. Before TBI, after habituation for one minute on the rotarod, the animals who failed to stay in the rotarod according to the criteria mentioned above were disqualified in order to avoid a false positive. Finally, 8 hours after TBI, the rotarod test was repeated again and the results of latency to fall were measured and expressed in seconds (s). After each test, the equipment was cleaned with 30% ethanol solution.

2.6 *Ex vivo* assays

Focus of our interest for *ex vivo* assays was the ipsilateral cerebral cortex (right hemisphere) because besides being a brain structure involved in neuromotor control, also is the most severely affected by the primary and secondary damage caused by TBI (Fujimoto et al., 2004).

2.6.1. Tissue processing

For histochemistry assay, the animals (n = 4 per group) under deep anesthesia (thiopental sodium 100 mg/kg i.p) were transcardially perfused with 800 mL of heparinized saline followed by 600 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PBS) pH 7.4.

After, the brains were removed and post-fixed as described previously (Cunha et al., 2006). The coronal sections (40 μ m-cryostat) of the brain and its mounting on slides were performed as described previously (Carvalho et al., 2015). After drying at room temperature, the mounted sections were stored at -20 °C for subsequent analysis. For other analysis mentioned below, the animals were euthanized by decapitation to quickly dissect ipsilateral cerebral cortex on an inverted ice-cold Petri dish.

Brain structure for dot blot, western blot and cytokines immunoassay (n = 6 per group) were homogenized 1:5 (w/v) in ice-cold T-PER (tissue protein extraction reagent - Thermo Scientific) containing phosphatase inhibitors (25 mM NaF, 50 mM Na₃VO₄, 250mM sodium β -glycerophosphate pentahydrate) and proteases as previously described (V. R. Funck et al 2014). After protein quantification by Pierce BCA protein kit (Thermo Scientific) the samples were diluted in Laemmli buffer (0.5M Tris HCl, 10% SDS, 2% bromophenol blue, 50% glycerol, 5% β -mercaptoethanol) to adjust the protein concentration to 2 μ g / μ L.

For enzyme assays the brain structure were homogenized 1:10 (w/v) in Tris-HCl buffer (pH 7.4). All samples were maintained at -80°C for one month until day of the analysis. The assays with the fresh tissue [glutamate uptake (n=7 per group), glutamate release (n=7 per group), mitochondrial isolation (n=7 per group) and brain edema (n=8 per group)] were performed in accordance with the guidelines described in their respective sections.

2.6.2 Release and [³H] glutamate uptake

For assay of [³H] glutamate release, crude synaptosomes were obtained based on a previous method described (Gray and Whittaker, 1962). The [³H] glutamate release assay was carried out according to a method described previously (Migues et al., 1999). Results were expressed in percentage of released [³H] glutamate.

The [³H] glutamate uptake assay was carried out in coronal slices (0.4 mm) of ipsilateral cerebral cortex using a McIllwain chopper. Three triplicates (9 slices) totaling 18

slices per animal were used to perform glutamate uptake as described previously (Thomazi et al., 2004). Results were expressed as pmol of [³H] glutamate uptake/mg protein/min.

2.6.3 Na⁺, K⁺ - ATPase and Glutamine synthetase (GS) activity

Na⁺, K⁺- ATPase activity was determined according to previously described (Rambo et al., 2013). Results were expressed as nmol of Pi min/mg protein. The glutamine synthetase activity was performed as described previously by (Petito et al., 1992). Results were expressed as nmol of γ glutamyl hydroxamate /mg protein/ min.

2.6.4 Protein carbonyl content

Dot blot analysis was performed according Wehr and Levine, (2012) with some modifications. During 30 min, samples (30 μ g) were incubated 25C° in the dark with 2,4 dinitrophenylhydrazine 20 mM in a final volume of 300 μ L. Then 30 μ L of the reaction medium was transferred to the dot blot preassembled system (filter and nitrocellulose membrane) followed by addition of 600 μ L of 10 mM PBS. After the membrane was processed as follows: (1) Blocking with 5% Molico in PBS-T (10 mM PBS containing 0.04% Tween 80) for 1 hour; (2) Incubation with primary antibody overnight [Anti-DNP 1: 150 in 2.5% Molico in PBS-T]; (3) Three washes of 15 min in PBS-T; (4) Incubation with secondary antibody anti-rabbit secondary antibody (1:10000, Sigma Aldrich A0545/lot 015M4816V) in 2.5 % Molico in PBS-T for 3 hours; (4) Three washes of 15 min in PBS-T and finally chemiluminescence (Pierce ECL kit - Thermo Scientific) was detected and scanned using an imaging system (Gel Logic 6000 PRO). The blots were quantified with Image J software and the results were expressed in percent of control levels.

2.6.5 Mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) and reactive oxygen species (ROS) production

Brain mitochondria were isolated as previously described (Navarro et al., 2002). Both assays were performed according to Dobrachinski et al., (2014) based on the original method previously described. The $\Delta\Psi_m$ determination was estimated by fluorescence changes in safranine-O assayed (Akerman and Wikstrom, 1976). Results were expressed as arbitrary fluorescence units per second (A.F.U/s). The estimated mitochondrial ROS production was determined spectrofluorimetrically by oxidation of dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) (Garcia-Ruiz et al., 1997). Results were expressed as A.F.U of oxidized DCFH-DA.

2.6.6 Western Blot (Cleaved caspase 3)

Western blot analysis was performed according to (Funck et al., 2014) with some modifications. Samples (20 μ g protein) were then subjected to an 17% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane processed as follow: (1) Blocking with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline (TBS) for 1 h; (2) Incubation with primary antibody overnight at 4 °C in TBS containing 1% BSA [(1:1000) polyclonal anti-caspase 3 active (cleaved) anti rabbit (Millipore, AB3623/lot 2458957)]; (3) Three washes of 15 min TBS containing 0.01% (v/v) Tween 20 (TBS-T); (4) Incubation with anti-rabbit secondary antibody (1:10000, Sigma Aldrich A0545/lot 015M4816V) in TBS containing 1% BSA for 4 h and finally chemiluminescence (ECL kit) was detected and scanned using an imaging system (Gel Logic 6000 PRO). The bands were quantified with Image J software and the results were expressed in percent of control levels.

2.6.7 Fluoro-Jade C (FJC) Staining

FJC stain was used to investigate neurodegeneration as previously described with some modifications (Schmued et al., 2005). Slides were immersed in a solution of 0.1% NaOH in 80% ethanol for 5 min, 70% ethanol for 2 min, distilled water for 2 min, 0.06%

potassium permanganate for 10 min and were gently shaken on a rotating platform. The slides were rinsed for 1 min in distilled water and then transferred to the FJC (Millipore AG325/lot 2523209) staining solution 0.0001% in 0.1% acetic acid vehicle gently agitated for 10 min. After staining, the sections were rinsed three times for 1 min with distilled water. Excess water was drained off, and the slides were rapidly air dried on a slide warmer or with a hot air gun. When dried, the slides were immersed in xylene and then coverslipped with D.P.X. Sections were examined under a transmission and fluorescence Olympus IX71 microscope, quantitative analysis of cells dead/field was performed by three analyzers using ImageJ software for each slice (Five consecutive slices covering the impact zone TBI per animal).

2.6.8 Cytokine immunoassay

Cytokine levels, TNF α and IL-1 β , were measured using a commercially available ELISA kit from Milipore and Sigma-Aldrich respectively, in accordance with the manufacturer's protocol. The concentration of cytokines was normalized by the protein concentration contained in the samples and the results were expressed in pg / mg protein.

2.6.9 Cerebral edema

Cerebral edema was evaluated by determination of brain water content (Toklu et al., 2009). To increase the sensitivity of the technique, the assay was performed in perilesional area of ipsilateral cerebral cortex. The results were obtained as water content and expressed in percentage of the total wet weight.

2.6.10 Protein determination

The protein concentration was measured using bovine serum albumin (1 mg/mL) as a standard (Bradford, 1976) except for the dot blot, western blot and cytokines immunoassay analyses.

2.7 Statistical analysis

The normality of data was analyzed using a D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Data are expressed as means \pm standard error medium (SEM) and were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls test, except the FJC Staining analyzed by unpaired t test and Rotarod test analyzed using a Scheirer-Ray-Hare test (an extension of Kruskal–Wallis test) followed by Dunn's post-hoc test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Behavioral tests

3.1.1. Protective effect of guanosine against the damage in locomotion and exploratory behaviors induced by TBI

Fig. 2 shows a representative image of spontaneous locomotor activity of rats from Sham-saline (A), Sham-guanosine (B), TBI-saline (C) TBI-guanosine (D) groups.

The two-way ANOVA showed a TBI \times guanosine interaction for the number of crossings ($F_{1,36}=5.0693$, $p < 0.05$), rearings ($F_{1,36}=6.2449$, $p < 0.05$), total distance traveled ($F_{1,36}=4.4417$, $p < 0.05$) and the average velocity ($F_{1,36}=4.7592$ $p < 0.05$). Post hoc analyses revealed a decrease in the locomotor and exploratory parameters induced by TBI, which were characterized by a decrease in the number of crossings ($p < 0.0001$) (Figure 2E), rearings ($p < 0.001$) (Figure 2F), total distance traveled ($p < 0.01$) (Figure 2G) and the average velocity ($p < 0.01$) (Figure 2H) when compared to those of the sham-saline group. In addition, the guanosine was effective against the decrease in the number of crossings ($p < 0.01$), rearings ($p < 0.001$), total distance traveled ($p < 0.05$) and the average velocity ($p < 0.01$) in TBI-treated rats.

3.1.2. Protective effect of guanosine against the damage in motor coordination induced by TBI in rotarod test

Fig 2I shows the latency to fall during the rotarod test. Statistical analysis revealed a decrease in latency to fall induced by TBI ($H_1=14,303$; $p<0.0001$) when compared to sham-saline group and guanosine protected against this damage in motor coordination in TBI-treated rats ($H_1=4,115$; $p<0,05$). Post hoc analyses indicated a decrease in in latency to fall induced by TBI ($p<0.001$) when compared to that of the sham-saline group and the guanosine protected against this decrease in TBI-treated rats ($p<0.05$). Reinforcing the results, we also observed by one sample t test that TBI decreases the latency to fall compared to the reference values of the control animals sham (cutoff latency of 300 s) ($p< 0,0005$) and that guanosine protects against this reduction in TBI-treated rats ($p =0,2852$, data not shown).

3.2. Ex vivo assays

3.2.1. Protective effect of guanosine against alterations in parameters of glutamatergic system induced by TBI

The two-way ANOVA of [^3H] glutamate release revealed a main effect of TBI ($F_{1,24}=17,714$, $p<0.001$) shown in Fig 3A. TBI increase in the percentage of [^3H] glutamate release ($p<0.05$) when compared to the sham-saline group. However, the guanosine did not protect against the increase induced by TBI ($p=0.557$) when compared to the TBI-saline group.

On the other hand, the two-way ANOVA showed a TBI \times guanosine interaction in the [^3H] glutamate uptake ($F_{1,24}=9,896$, $p<0.01$) (Fig 3B). Post hoc analyses revealed a decrease in the [^3H] glutamate uptake induced by TBI ($p<0.01$) when compared to that of the sham-saline group and the guanosine was effective against this reduction in TBI-treated rats ($p<0.01$).

In Fig. 4A, the two-way ANOVA of Na⁺, K⁺ - ATPase activity demonstrated a TBI × guanosine interaction ($F_{1,24}=7,852$, $p<0.01$). Post hoc analyses showed a decrease in Na⁺, K⁺ - ATPase activity induced by TBI ($p<0.01$) when compared to that of the sham-saline group and the guanosine protected against this reduction in TBI-treated rats ($p<0.01$).

Furthermore, in Fig. 4B the two-way ANOVA of GS activity revealed a TBI × guanosine interaction ($F_{1,24}=5,233$, $p<0.05$). Post hoc analyses demonstrated a decrease in GS activity induced by TBI ($p<0.01$) when compared to the sham-saline group and the guanosine was effective against this reduction in TBI-treated rats ($p<0.001$).

3.2.2. Protective effect of guanosine against the increase in protein carbonyl content induced by TBI

In Fig. 4C, the two-way ANOVA of protein carbonyl data showed a TBI × guanosine interaction ($F_{1,20}=6,8733$, $p<0.05$) with post-hoc analysis indicating an increase in protein carbonyl content induced by TBI ($p<0.01$) when compared to that of the sham-saline group and the guanosine protected against this increase in TBI-treated rats ($p<0.05$).

3.2.3. Protective effect of guanosine on alterations in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and ROS production induced by TBI

Two-way ANOVA demonstrated a TBI × guanosine interaction in the $\Delta\Psi_m$ ($F_{1,24}=5,613$, $p<0.05$) (Fig.5A). Post hoc analyses showed a decrease in $\Delta\Psi_m$ induced by TBI ($p<0.001$) when compared to that of the sham-saline group and guanosine protected against this decrease in $\Delta\Psi_m$ on TBI-treated rats ($p<0.01$), but not to the sham-saline group levels ($p<0.05$).

Similarly in Fig. 5B, the two-way ANOVA revealed a TBI × guanosine interaction in the ROS production ($F_{1,24}=18,206$, $p<0.001$). Post hoc analyses demonstrated an increase in ROS production induced by TBI ($p<0.001$) when compared to that of the sham-saline group

and the guanosine protected against this increase in ROS production on TBI-treated rats ($p < 0.001$), but not to the sham-saline group levels ($p < 0.001$).

3.2.4. Protective effect of guanosine against the increase in levels of cleaved caspase 3 induced by TBI

In Fig. 5C, the two-way ANOVA of cleaved caspase 3 revealed a TBI \times guanosine interaction ($F_{1,20}=14,8772$, $p < 0.001$) with post-hoc analysis revealing an increase in cleaved caspase 3 levels induced by TBI ($p < 0.001$) when compared to the sham-saline group. The guanosine protected against the increase in cleaved caspase 3 levels on TBI-treated rats ($p < 0.001$), but not to the sham-saline group levels ($p < 0.01$).

3.2.5. Protective effect of guanosine on neurodegeneration induced by TBI

The effect of guanosine in cellular neurodegeneration is demonstrated in Fig. 6. Quantification of degenerating neurons (I), TBI-guanosine group had a significant reduction in the number of FJC-positive neurons in the lesion injury site ($p < 0.05$) when compared to TBI-saline group.

3.2.6. Protective effect of guanosine against the increased in inflammatory parameters induced by TBI

Two-way ANOVA revealed a TBI \times guanosine interaction in TNF- α levels ($F_{1,20}=7,0145$, $p < 0.05$) (Fig.7A). Post hoc analyses showed an increase in TNF- α levels induced by TBI ($p < 0.001$) when compared to the sham-saline group and guanosine protected against this increase in TBI-treated rats ($p < 0.01$), but not to the sham-saline group levels ($p < 0.001$).

In relation to IL-1 β levels (Fig. 7B), the two-way ANOVA revealed a TBI \times guanosine interaction ($F_{1,20}=4,633$, $p < 0.01$). Post hoc analyses demonstrated an increase in IL-1 β levels

induced by TBI ($p < 0.01$) when compared to the sham-saline group and guanosine protected against this increase in TBI-treated rats ($p < 0.01$).

Finally, the effect of guanosine on cerebral edema is revealed in Fig. 7C, the two-way ANOVA showed a significant TBI \times guanosine interaction ($F_{1,28}=6,000$, $p < 0.05$) with post-hoc analysis indicating an increase in percentage of water content induced by TBI ($p < 0.001$) when compared to the sham-saline group and administration of guanosine protected against this increase in TBI-treated rats ($p < 0.01$).

4. Discussion

In accordance with our hypothesis, the findings of the present study indicate for the first time that the administration of guanosine after TBI promotes neuroprotective effects against functional impairment and neurodegeneration through a modulation in glutamatergic system parameters, mitochondrial dysfunction and decrease in pro-inflammatory cytokines with subsequent reduction in the development of cerebral edema.

Behavioral alterations related to motor function observed early after TBI in rodents are important indicators of the degree of preservation of neurological capabilities (Fujimoto et al., 2004). Accordingly, we demonstrated that TBI decreased motor coordination and exploratory parameters (crossing, rearing, distance and velocity). Furthermore, guanosine protected against alterations in motor and exploratory performance in TBI-treated rats. These findings agree with previous studies that demonstrate the pharmacological effects of guanosine in functional recovery after spinal cord injury in rats (Jiang et al., 2007). Our present results suggest that guanosine can attenuate the development of secondary injury following by TBI, an event responsible for the progression and emergence of disabilities related to this pathology (Mustafa and Alshboul, 2013).

Although different mechanisms are involved in the pathogenesis of TBI, the imbalance of glutamatergic system represents an important mechanism of injury that can cause

irreversible damage to the CNS (Mustafa and Alshboul, 2013). In fact, compelling evidence suggests the increase of extracellular glutamate levels as a key factor in the progression of various neurological disorders (Mehta et al., 2013). In our study, we demonstrated an increased release of synaptosomal glutamate accompanied by a decrease in glutamate uptake in brain slices after TBI, reinforcing the idea that hours after the traumatic initial insult an increase in extracellular glutamate occurs (Folkersma et al., 2011). Interestingly, in our study guanosine attenuates the development of neuronal excitotoxicity specifically by modulating the glutamate uptake in TBI-treated rats. These results are consistent with those of some authors that reported the glutamate uptake as a target of guanosine to protect against excitotoxic conditions (de Oliveira et al., 2004; Moretto et al., 2005; Schmidt et al., 2007).

It is well established in the literature that gradients of Na^+ extracellular and K^+ cytoplasmic maintained by the enzyme Na^+ , K^+ - ATPase are crucial for cell osmotic equilibrium and adequate functioning of astrocytic glutamate transporters, mainly responsible for the removal of glutamate synapses (Danbolt, 2001; Unterberg et al., 2004). The extracellular glutamate is directed to the inside of astrocytes through a co-transport with high affinity for Na^+ ions with the output of K^+ ions maintained in constant cell equilibrium by the enzyme Na^+ , K^+ - ATPase (Danbolt, 2001). Therefore, the inhibition of the enzyme Na^+ , K^+ - ATPase after TBI is associated with the development of cytotoxic edema and a decline in glutamate transport (Fiorin et al., 2015; Unterberg et al., 2004). In our study TBI decreased Na^+ , K^+ - ATPase activity and guanosine protected against this reduction in TBI-treated rats, an effect that might contribute to reduce astrocytic swelling and maintain glutamate uptake.

Another important aspect to be considered in this context is the correct synchronization between the glutamate uptake activity followed by recycling performed in astrocytes by the GS enzyme that converts glutamate into glutamine (Danbolt, 2001). Our experimental results showed that TBI reduced the activity of GS, affecting the metabolism of

glutamate (Jorgensen et al., 1997). As observed in an experimental model of focal ischemia in rats, treatment with guanosine increased the activity of this enzyme, which could be associated with a possible increase in the recycling glutamate in the astrocytes attenuating its harmful effects on the CNS (Hansel et al., 2014).

Furthermore, some studies suggest that changes in cellular redox state as oxidation of proteins by free radicals, can decrease the glutamate transport activity, the enzyme Na^+ , K^+ - ATPase and glutamine synthetase due to the presence of sulfhydryl groups in its structure (Hachimori et al., 1975; Morel et al., 1998; Trotti et al., 1998). In line with this view, in our study we showed that TBI induced oxidative damage to proteins measured by protein carbonyl content, and that guanosine protected against this damage in TBI-treated rats. Thus, one possibility that cannot be ruled out is that the effect of guanosine in attenuate the oxidative damage can favors the restoration in the activity of the glutamatergic system parameters discussed so far, contributing to the maintaining the extracellular glutamate concentration below the potentially toxic levels.

In this context, it has been demonstrated that high extracellular concentrations of glutamate after TBI cause overstimulation of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) and kainate resulting an increase in Ca^{2+} and Na^+ influx into neuronal and glial cells (Faden et al., 1989; Luo et al., 2011). In order to maintain the cytoplasmic Ca^{2+} homeostasis, mitochondria begin to sequester this ion into the mitochondrial matrix (Pandya et al., 2007). However, the excess of Ca^{2+} resulting in dysfunction of mitochondria causes loss of mitochondrial membrane potential and excessive production of ROS with subsequent oxidative damage (Pandya et al., 2007). According, in our study TBI decreased the mitochondrial membrane potential and increased the ROS production, and guanosine protected against these changes in TBI-treated rats. Corroborating our results, it has been demonstrated that guanosine prevents the

mitochondrial alteration induced by a cellular model of Parkinson's disease and *in vitro* ischemia simulated by deprivation of oxygen and glucose in hippocampal slices (Dal-Cim et al., 2013).

The homeostasis of the mitochondria is closely related to cell survival and thus its dysfunction can result in cell death, by apoptotic or necrotic events (Sullivan et al., 2002). Therefore, we investigated the expression of cleaved caspase 3, an effector protein which initiates programmed cell death processes from mitochondrial stimuli (via intrinsic) or cytoplasmic (extrinsic pathway) after TBI (Kovesdi et al., 2007). In our study, TBI increased the expression of cleaved caspase 3 and guanosine protected against this alteration, suggesting an antiapoptotic effect of guanosine. Corroborating this finding, we observed that guanosine was effective in reducing the spread of neurodegeneration induced by TBI, providing enough evidence of the protective effect of guanosine against harmful conditions that lead to neuronal death.

Another important event in TBI pathophysiology is inflammation (Yang et al., 2015). Studies suggest that the presence of inflammatory mediators in chronic phase after TBI is necessary to restore the tissue damaged by regenerative processes (Helmy et al., 2011; Scherbel et al., 1999). On the other hand, exacerbated presence of these mediators in the acute phase may be harmful causing damage to surrounding healthy cells. For example, it has been demonstrated an increase of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β hours after TBI and these are associated with apoptotic events, neurodegeneration and formation of cerebral edema, an important event which produces a decrease in blood flow, crushing and herniation of vital structures (Helmy et al., 2011; Shojo et al., 2010; Su et al., 2014). In agreement with these studies, we demonstrated that TBI increased the content of TNF- α and IL-1 β and cerebral edema. Administration of guanosine protected against the increased in TNF- α , IL-1 β and edema, providing evidence that the neuroprotective effect of guanosine in

TBI-treated rats also involves the maintenance of the inflammatory response. In accordance with our findings, an elegant study (Hansel et al., 2015) also demonstrated the neuroprotective effects of guanosine in focal cortical ischemia by modulating the inflammation after this pathology.

Current studies report that the most of the drugs that have success in the treatment of TBI in experimental models, fail when tested clinically (Kabadi and Faden, 2014; Loane and Faden, 2010). In fact, many trials have failed because the agent proposed for the treatment regulates only a single mechanism of injury. Thus, now the search for new pharmacological treatments in the pre-clinical research focuses on multi-targets drugs to maximize the likelihood of developing a successful therapeutic intervention. (Kabadi and Faden, 2014; Loane and Faden, 2010). Although the mechanisms by which guanosine acts are not fully known, it was demonstrated that the guanosine protects against the loss of acute motor function and limits the neurodegeneration after TBI by modulating parameters of the glutamatergic system, attenuating the mitochondrial dysfunction and the increased in levels of cytokines with subsequent reduction in development of cerebral edema.

5. Conclusion

In summary, the present work indicates that post injury treatment with guanosine may provide a new therapeutic approach to the control of neurological injuries induced by TBI. Although more studies are necessary to determine the clinical potential of this molecule, we believe that our study adds to the knowledge regarding the putative "multi-target" neuroprotective effect of guanosine in the FPI model in rats, making this molecule an attractive therapeutic candidate for the treatment of TBI.

Acknowledgements

We gratefully acknowledged the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 441405/2014-2) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; 2239-2551/14) for the financial support. L.F.F.R. is recipient of CNPq fellowship.

Conflict of interest

The authors declare they have no conflicts of interest to disclose.

6. References

- Akerman, K.E., Wikstrom, M.K., 1976. **Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. FEBS Lett 68, 191-197.**
- Bellaver, B., Souza, D.G., Bobermin, L.D., Goncalves, C.A., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2015. **Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. Purinergic Signal 11, 571-580.**
- Bradford, M.M., 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254.**
- Carvalho, F.B., Gutierrez, J.M., Bohnert, C., Zago, A.M., Abdalla, F.H., Vieira, J.M., Palma, H.E., Oliveira, S.M., Spanevello, R.M., Duarte, M.M., Lopes, S.T., Aiello, G., Amaral, M.G., Pippi, N.L., Andrade, C.M., 2015. **Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. J Nutr Biochem 26, 378-390.**
- Cunha, G.M., Canas, P.M., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., 2006. **Increased density and synapto-protective effect of adenosine A2A receptors upon sub-chronic restraint stress. Neuroscience 141, 1775-1781.**
- Dal-Cim, T., Ludka, F.K., Martins, W.C., Reginato, C., Parada, E., Egea, J., Lopez, M.G., Tasca, C.I., 2013. **Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. J Neurochem 126, 437-450.**
- Danbolt, N.C., 2001. **Glutamate uptake. Prog Neurobiol 65, 1-105.**
- de Oliveira, D.L., Horn, J.F., Rodrigues, J.M., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S., 2004. **Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. Brain Res 1018, 48-54.**
- Dobrachinski, F., da Silva, M.H., Tassi, C.L., de Carvalho, N.R., Dias, G.R., Golombieski, R.M., da Silva Loreto, E.L., da Rocha, J.B., Figuera, M.R., Soares, F.A., 2014.

Neuroprotective effect of diphenyl diselenide in a experimental stroke model: maintenance of redox system in mitochondria of brain regions. *Neurotox Res* 26, 317-330.

Faden, A.I., Demediuk, P., Panter, S.S., Vink, R., **1989. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244, 798-800.**

Fiorin, F., Ferreira, A.P., Ribeiro, L.R., Silva, L.F., Castro, M.R., Silva, L.R., Silveira Junior, M.E., Zemolin, A.P., Dobrachinski, F., Marchesan, S., Franco, J.L., Soares, F.A., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Figuera, M.R., Royes, L.F., **2015. The impact of previous physical training on redox signaling after traumatic brain injury in rats: behavioral and neurochemical approach. *J Neurotrauma*. 10.1089/neu.2015.4068.**

Folkersma, H., Foster Dingley, J.C., van Berckel, B.N., Rozemuller, A., Boellaard, R., Huisman, M.C., Lammertsma, A.A., Vandertop, W.P., Molthoff, C.F., **2011. Increased cerebral (R)-[(11)C]PK11195 uptake and glutamate release in a rat model of traumatic brain injury: a longitudinal pilot study. *J Neuroinflammation* 8, 67.**

Fujimoto, S.T., Longhi, L., Saatman, K.E., Conte, V., Stocchetti, N., McIntosh, T.K., **2004. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 365-378.**

Funck, V.R., Ribeiro, L.R., Pereira, L.M., de Oliveira, C.V., Grigoletto, J., Figuera, M.R., Royes, L.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., **2014. Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. *Epilepsy Res* 108, 1705-1710.**

Gaetz, M., **2004. The neurophysiology of brain injury. *Clin Neurophysiol* 115, 4-18.**

Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A., Fernandez-Checa, J.C., **1997. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 272, 11369-11377.**

Gray, E.G., Whittaker, V.P., **1962. The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat* 96, 79-88.**

Hachimori, A., Takeda, A., Nagaoka, T., Suzuki, H., Nosoh, Y., Samejima, T., **1975. The modification of sulfhydryl groups of glutamine synthetase from *Bacillus stearothermophilus* with 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *J Biochem* 78, 1235-1240.**

Hansel, G., Ramos, D.B., Delgado, C.A., Souza, D.G., Almeida, R.F., Portela, L.V., Quincozes-Santos, A., Souza, D.O., **2014. The potential therapeutic effect of guanosine after cortical focal ischemia in rats. *PLoS One* 9, e90693.**

Hansel, G., Tonon, A.C., Guella, F.L., Pettenuzzo, L.F., Duarte, T., Duarte, M.M., Oses, J.P., Achaval, M., Souza, D.O., **2015. Guanosine Protects Against Cortical Focal Ischemia. Involvement of Inflammatory Response. *Mol Neurobiol* 52, 1791-1803.**

Helmy, A., De Simoni, M.G., Guilfoyle, M.R., Carpenter, K.L., Hutchinson, P.J., **2011. Cytokines and innate inflammation in the pathogenesis of human traumatic brain injury. *Prog Neurobiol* 95, 352-372.**

Hochstrate, P., Schlue, W.R., **1994. Ca²⁺ influx into leech glial cells and neurones caused by pharmacologically distinct glutamate receptors. *Glia* 12, 268-280.**

- Hyder, A.A., Wunderlich, C.A., Puvanachandra, P., Gururaj, G., Kobusingye, O.C., 2007. **The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. NeuroRehabilitation 22, 341-353.**
- Jiang, S., Bendjelloul, F., Ballerini, P., D'Alimonte, I., Nargi, E., Jiang, C., Huang, X., Rathbone, M.P., 2007. **Guanosine reduces apoptosis and inflammation associated with restoration of function in rats with acute spinal cord injury. Purinergic Signal 3, 411-421.**
- Jorgensen, O.S., Hansen, L.I., Hoffman, S.W., Fulop, Z., Stein, D.G., 1997. **Synaptic remodeling and free radical formation after brain contusion injury in the rat. Exp Neurol 144, 326-338.**
- Kabadi, S.V., Faden, A.I., 2014. **Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation. Int J Mol Sci 15, 1216-1236.**
- Kabadi, S.V., Hilton, G.D., Stoica, B.A., Zapple, D.N., Faden, A.I., 2010. **Fluid-percussion-induced traumatic brain injury model in rats. Nat Protoc 5, 1552-1563.**
- Kovesdi, E., Czeiter, E., Tamas, A., Reglodi, D., Szellar, D., Pal, J., Bukovics, P., Doczi, T., Buki, A., 2007. **Rescuing neurons and glia: is inhibition of apoptosis useful? Prog Brain Res 161, 81-95.**
- Loane, D.J., Faden, A.I., 2010. **Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. Trends Pharmacol Sci 31, 596-604.**
- Luo, P., Fei, F., Zhang, L., Qu, Y., Fei, Z., 2011. **The role of glutamate receptors in traumatic brain injury: implications for postsynaptic density in pathophysiology. Brain Res Bull 85, 313-320.**
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., Sharma, P.L., 2013. **Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. Eur J Pharmacol 698, 6-18.**
- Migues, P.V., Leal, R.B., Mantovani, M., Nicolau, M., Gabilan, N.H., 1999. **Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. Neuroreport 10, 67-70.**
- Morel, P., Tallineau, C., Pontcharraud, R., Piriou, A., Huguet, F., 1998. **Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺-ATPase in rat striatal synaptosomes. Neurochem Int 33, 531-540.**
- Moretto, M.B., Arteni, N.S., Lavinsky, D., Netto, C.A., Rocha, J.B., Souza, D.O., Wofchuk, S., 2005. **Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. Exp Neurol 195, 400-406.**
- Mustafa, A.G., Alshboul, O.A., 2013. **Pathophysiology of traumatic brain injury. Neurosciences (Riyadh) 18, 222-234.**
- Nancy B. Wehr and Rodney L. Levine 2012. **Quantitation of protein carbonylation by dot blot. Anal Biochem 423 (2), 241-245.**
- Navarro, A., Sanchez Del Pino, M.J., Gomez, C., Peralta, J.L., Boveris, A., 2002. **Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 282, R985-992.**
- Oliver, C.N., Starke-Reed, P.E., Stadtman, E.R., Liu, G.J., Carney, J.M., Floyd, R.A., 1990. **Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 5144-5147.**

- Pandya, J.D., Pauly, J.R., Nukala, V.N., Sebastian, A.H., Day, K.M., Korde, A.S., Maragos, W.F., Hall, E.D., Sullivan, P.G., **2007. Post-Injury Administration of Mitochondrial Uncouplers Increases Tissue Sparing and Improves Behavioral Outcome following Traumatic Brain Injury in Rodents. J Neurotrauma 24, 798-811.**
- Paniz, L.G., Calcagnotto, M.E., Pandolfo, P., Machado, D.G., Santos, G.F., Hansel, G., Almeida, R.F., Bruch, R.S., Brum, L.M., Torres, F.V., de Assis, A.M., Rico, E.P., Souza, D.O., **2014. Neuroprotective effects of guanosine administration on behavioral, brain activity, neurochemical and redox parameters in a rat model of chronic hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis 29, 645-654.**
- Petito, C.K., Chung, M.C., Verkhovsky, L.M., Cooper, A.J., **1992. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. Brain Res 569, 275-280.**
- Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Della-Pace, I.D., Stamm, D.N., da Rosa Gerbatin, R., Prigol, M., Pinton, S., Nogueira, C.W., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Figuera, M.R., Royes, L.F., **2013. Acute creatine administration improves mitochondrial membrane potential and protects against pentylene-tetrazol-induced seizures. Amino Acids 44, 857-868.**
- Scherbel, U., Raghupathi, R., Nakamura, M., Saatman, K.E., Trojanowski, J.Q., Neugebauer, E., Marino, M.W., McIntosh, T.K., **1999. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 8721-8726.**
- Schmidt, A.P., Lara, D.R., Souza, D.O., **2007. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. Pharmacol Ther 116, 401-416.**
- Schmued LC., Stowers CC., Scallet AC., Xu L **2005. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. Brain Res 1035:24-31.**
- Shojo, H., Kaneko, Y., Mabuchi, T., Kibayashi, K., Adachi, N., Borlongan, C.V., **2010. Genetic and histologic evidence implicates role of inflammation in traumatic brain injury-induced apoptosis in the rat cerebral cortex following moderate fluid percussion injury. Neuroscience 171, 1273-1282.**
- Silva, L.F., Hoffmann, M.S., Gerbatin Rda, R., Fiorin Fda, S., Dobrachinski, F., Mota, B.C., Wouters, A.T., Pavarini, S.P., Soares, F.A., Figuera, M.R., Royes, L.F., **2013. Treadmill exercise protects against pentylene-tetrazol-induced seizures and oxidative stress after traumatic brain injury. J Neurotrauma 30, 1278-1287.**
- Soares, F.A., Schmidt, A.P., Farina, M., Frizzo, M.E., Tavares, R.G., Portela, L.V., Lara, D.R., Souza, D.O., **2004. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. Brain Res 1005, 182-186.**
- Su, Y., Fan, W., Ma, Z., Wen, X., Wang, W., Wu, Q., Huang, H., **2014. Taurine improves functional and histological outcomes and reduces inflammation in traumatic brain injury. Neuroscience 266, 56-65.**
- Sullivan, P.G., Keller, J.N., Bussen, W.L., Scheff, S.W., **2002. Cytochrome c release and caspase activation after traumatic brain injury. Brain Res 949, 88-96.**
- Tavares, R.G., Schmidt, A.P., Tasca, C.I., Souza, D.O., **2008. Quinolinic acid-induced seizures stimulate glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain: effects prevented by guanine-based purines. Neurochem Res 33, 97-102.**
- Thomazi, A.P., Godinho, G.F., Rodrigues, J.M., Schwalm, F.D., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S.T., **2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. Mech Ageing Dev 125, 475-481.**

- Thompson, H.J., Lifshitz, J., Marklund, N., Grady, M.S., Graham, D.I., Hovda, D.A., McIntosh, T.K., **2005. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. J Neurotrauma 22, 42-75.**
- Toklu, H.Z., Hakan, T., Biber, N., Solakoglu, S., Ogunc, A.V., Sener, G., **2009. The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. Free Radic Res 43, 658-667.**
- Trotti, D., Danbolt, N.C., Volterra, A., **1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? Trends Pharmacol Sci 19, 328-334.**
- Unterberg, A.W., Stover, J., Kress, B., Kiening, K.L., **2004. Edema and brain trauma. Neuroscience 129, 1021-1029.**
- Whishaw, I.Q., Li, K., Whishaw, P.A., Gorny, B., Metz, G.A., **2003. Distinct forelimb and hind limb stepping impairments in unilateral dopamine-depleted rats: use of the rotarod as a method for the qualitative analysis of skilled walking. J Neurosci Methods 126, 13-23.**
- Yang, L.Y., Chu, Y.H., Tweedie, D., Yu, Q.S., Pick, C.G., Hoffer, B.J., Greig, N.H., Wang, J.Y., **2015. Post-trauma administration of the pifithrin-alpha oxygen analog improves histological and functional outcomes after experimental traumatic brain injury. Exp Neurol 269, 56-66.**
- Yi, J.H., Hazell, A.S., **2006. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. Neurochem Int 48, 394-403.**

Figure legends

Figure 1: Experimental design

Figure 2: Effect of guanosine in locomotor activity, exploratory behaviors and motor coordination. The representative image of spontaneous locomotor activity of rats from Sham-saline (A), Sham-guanosine (B), TBI-saline (C) TBI-guanosine (D) groups and number of crossings (E), number of rearings (F), distance traveled (G) and the average velocity (H). Values are expressed as mean \pm SEM for ten animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ (two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test). Latency to fall (I) during the rotarod test were analyzed by Scheirer-Ray-Hare test followed by the Dunn's post-hoc test * $p < 0.001$. *** $p < 0.001$.

Figure 3: Effect of guanosine on [³H] glutamate release (A) and [³H] glutamate uptake (B) in ipsilateral cortex of rats. Values are expressed as mean ± SEM for seven animals per group. *p < 0.05, ** p < 0.01 (two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test).

Figure 4: Effect of guanosine on Na⁺, K⁺ - ATPase activity, GS activity and protein carbonyl content in ipsilateral cortex of rats. Na⁺, K⁺ - ATPase activity (A), GS activity (B) and protein carbonyl content (C) (SS=Sham-saline, SG=Sham-guanosine, TS=TBI-saline, TG=TBI-guanosine). Values are expressed as mean ± SEM for seven animals per group. *p < 0.05, ** p < 0.01 *** p < 0.001 (two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test).

Figure 5: Effect of guanosine on mitochondrial function and apoptosis in ipsilateral cortex of rats. Mitochondrial membrane potential (A), ROS production (B) and cleaved caspase 3 (C). Values are expressed as mean ± SEM for mitochondrial function seven animals per group; for cleaved caspase 3 six animals per group. *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test).

Figure 6: Effect of guanosine on neurodegeneration in the injury site in ipsilateral cortex of rats. Animals Sham-saline (A) and Sham-guanosine (B) without FJC positive cells. Note that neurodegeneration was greater in TBI-Saline animals (C) demonstrated by counting the number of FJC-positive cells (E) and magnified representative image (G) compared to TBI guanosine-treated animals (D, F and H). Quantification of degenerating neurons (I). Values are expressed as mean ± SEM for number of FJC-positive cells/field four animals per group. *p < 0.05 (unpaired t test).

Figure 7: Effect of guanosine on inflammatory parameters in ipsilateral cortex of rats. TNF-α levels (A), IL-1β levels (B) and percentage of water content (C). Values are expressed as

mean \pm SEM for TNF- α levels and IL-1 β levels six animals per group; for percentage of water content eight animals per group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test).

Figure 1

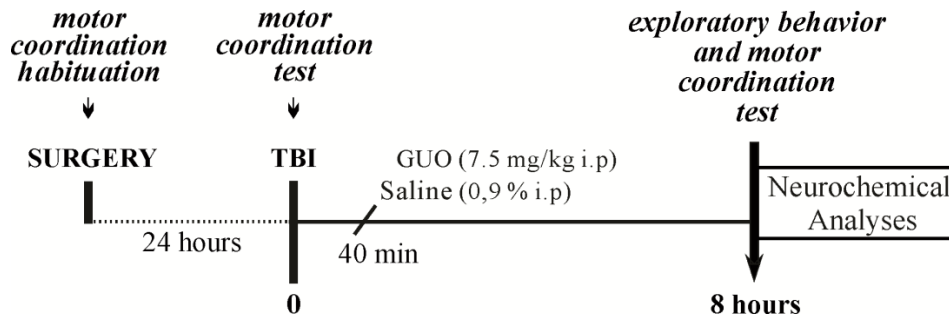


Figure 2

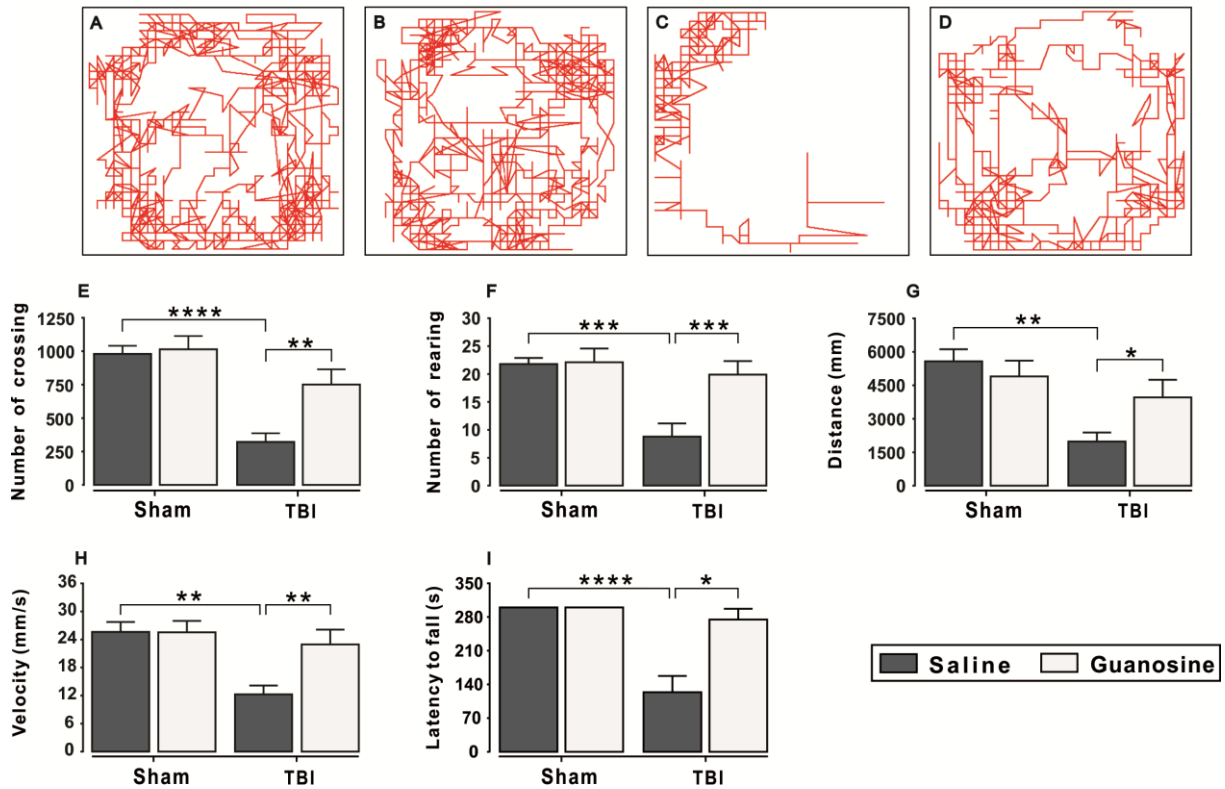


Figure 3

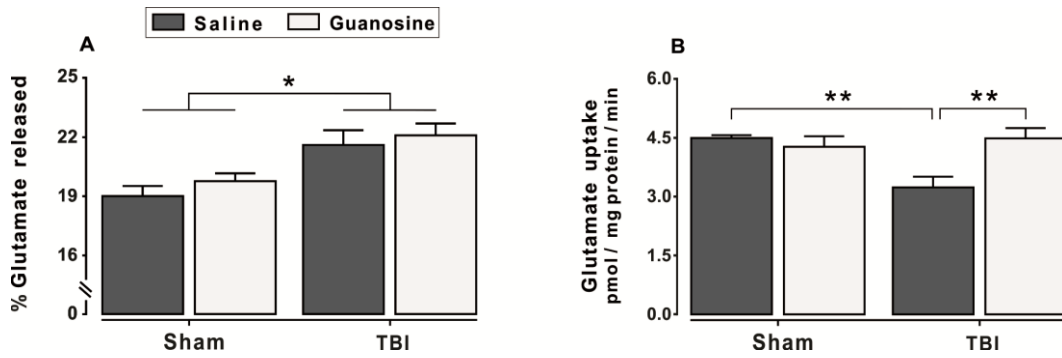


Figure 4

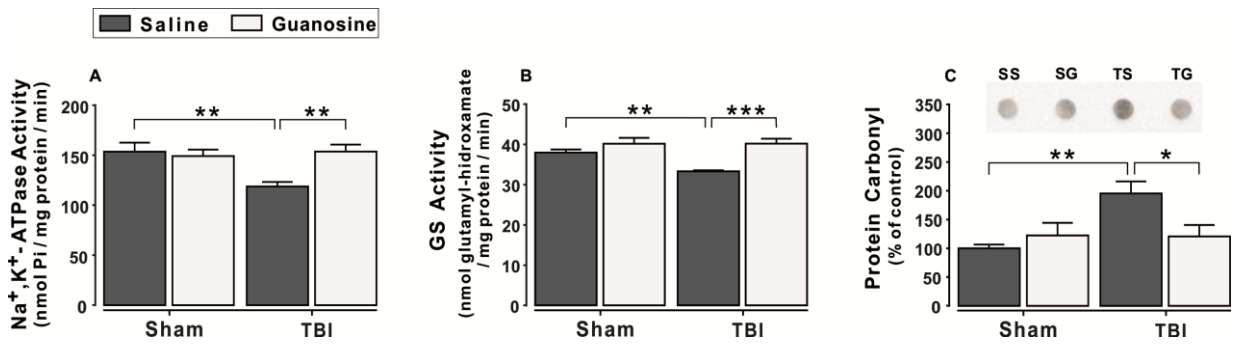


Figure 5

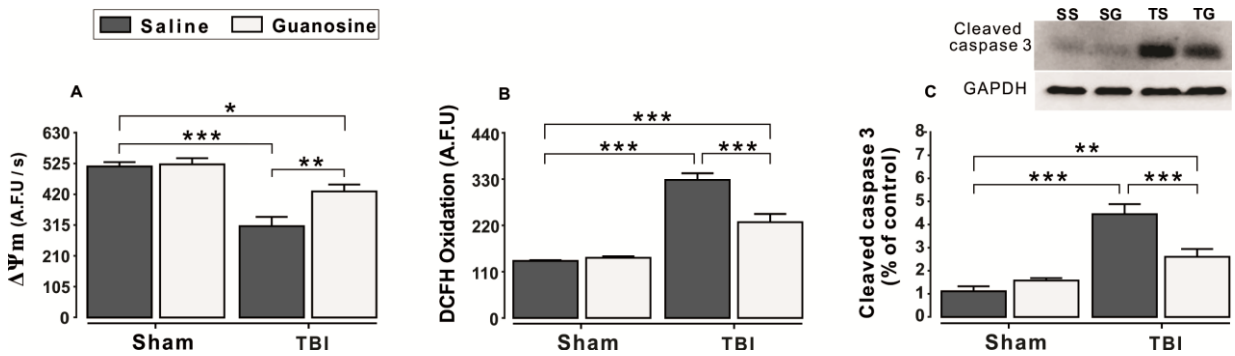


Figure 6

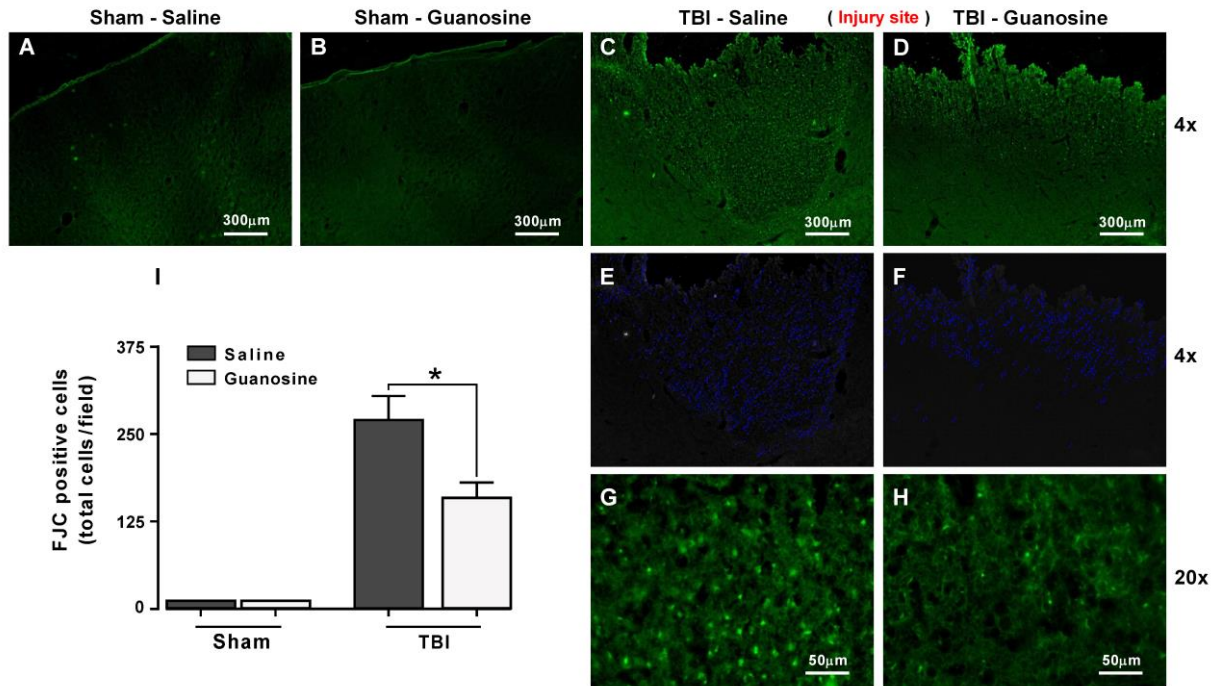
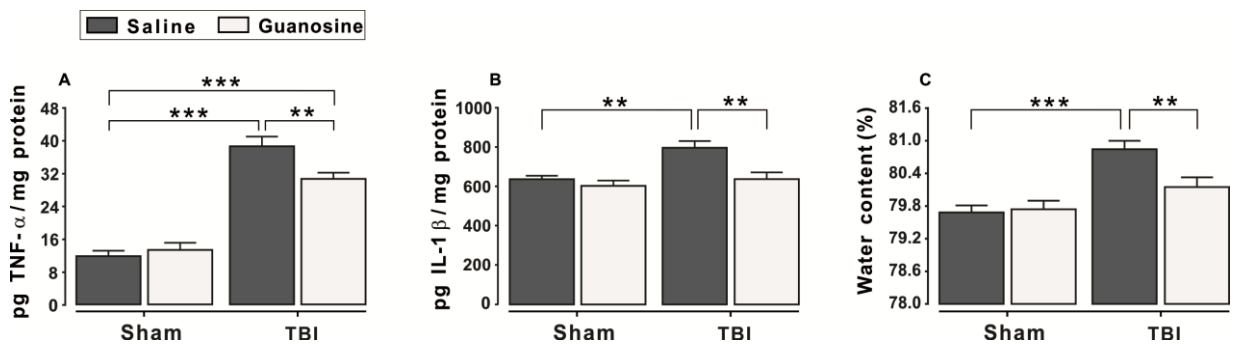


Figure 7



4. CONCLUSÕES

4.1 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- A administração da guanosina após o TCE promove efeitos neuroprotetores contra o déficit motor e neurodegeneração através da regulação da atividade de parâmetros glutamatérgicos, manutenção da função mitocondrial e diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) com subsequente redução no desenvolvimento do edema cerebral em 8 horas após o TCE em ratos.

4.2 CONCLUSÃO FINAL

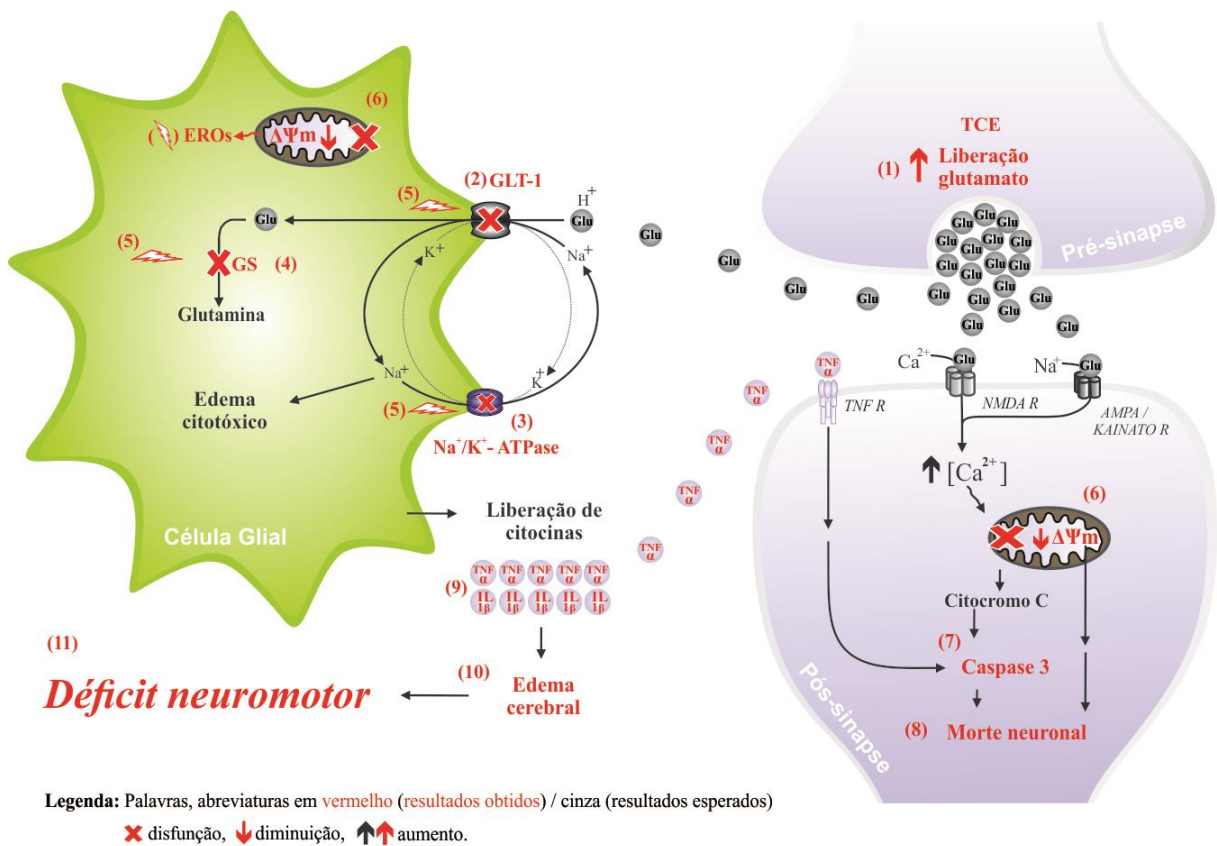
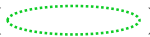


Figura 6. Representação esquemática simplificada de conclusão da presente dissertação.

O modelo experimental de TCE moderado induzido por PFS causa aumento na liberação de glutamato (1); inibição do transporte de glutamato (2), Na⁺, K⁺ - ATPase (3) e GS (4); dano oxidativo em proteínas (5); aumento na produção de EROs e diminuição no potencial de membrana mitocondrial (6); ativação da caspase 3 (7); morte neuronal (8); aumento de citocinas (9); edema cerebral (10). Tomados em conjuntos, a soma desses eventos se repercute no déficit neuromotor (11). Por outro lado, a guanosina protege contra essas perturbações neuroquímicas conforme indicado (), reduzindo a progressão da lesão secundária e o prejuízo neuromotor.

ANDELIC, N. The epidemiology of traumatic brain injury. **Lancet Neurol**, v. 12, n. 1, p. 28-9, Jan 2013.

ANDRADE, A. F. et al. Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v.55, n.1, p.75-81, abr. 2009.

BELLAVER, B. et al. Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. **Purinergic Signal**, v. 11, n. 4, p. 571-80, Dec 2015.

BARKER-COLLO, S. L.; WILDE, N. J.; FEIGIN, V. L. Trends in head injury incidence in New Zealand: a hospital-based study from 1997/1998 to 2003/2004. **Neuroepidemiology**, v. 32, n. 1, p. 32-9, 2009.

BENARROCH, E. E. Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease. **Neurology**, v. 74, n. 3, p. 259-64, Jan 19 2010.

BRUNS, J., JR.; HAUSER, W. A. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. **Epilepsia**, v. 44 Suppl 10, p. 2-10, 2003.

BULLOCK, R. et al. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. **J Neurosurg**, v. 89, n. 4, p. 507-18, Oct 1998.

CAMACHO, A.; MASSIEU, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. **Arch Med Res**. 37:11-8, 2006

CICCARELLI, R. et al. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. **Glia**, v. 29, n. 3, p. 202-11, Feb 1 2000.

CICCARELLI, R. et al. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **Int J Dev Neurosci**, v. 19, n. 4, p. 395-414, Jul 2001.

CLAUSEN, F. et al. Neutralization of interleukin-1beta reduces cerebral edema and tissue loss and improves late cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. **Eur J Neurosci**, v. 34, n. 1, p. 110-23, Jul 2011.

CORONADO, V. G. et al. Surveillance for traumatic brain injury-related deaths--United States, 1997-2007. **MMWR Surveill Summ**, v. 60, n. 5, p. 1-32, May 6 2011.

DAL-CIM, T. et al. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **J Neurochem**, v. 126, n. 4, p. 437-50, Aug 2013.

DAL-CIM, T. et al. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **J Neurochem**, v. 126, n. 4, p. 437-50, Aug 2013.

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

DANTAS FILHO, V. P. et al. Fatores que influenciaram a evolução de 206 pacientes com traumatismo cranioencefálico grave. **Arquivos de Neuro– Psiquiatria**. São Paulo, v.62, n.2, p.313-318, jun. 2004.

DE OLIVEIRA, D. L. et al. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. **Brain Res**, v. 1018, n. 1, p. 48-54, Aug 20 2004.

DIKMEN, S. et al. Functional status examination: a new instrument for assessing outcome in traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 18, n. 2, p. 127-140, 2001.

DONKIN, J. J.; VINK, R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. **Curr Opin Neurol**, v. 23, n. 3, p. 293-9, Jun 2010.

FALAVIGNA, A. et al. Impact of an injury prevention program on teenagers' knowledge and attitudes: results of the Pense Bem-Caxias do Sul Project. **J Neurosurg Pediatr**, v. 9, n. 5, p. 562-8, May 2012.

FAUL, M. et al. Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002 – 2006., SERVICES, U. S. D. O. H. A. H., **Centers for Disease Control and Preventio**. Atlanta (GA). 2010.

FERREIRA, A. A. et al. Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico. **Rev AssocMed** v. 55, p. 75-81, 2009.

FIORIN, F. et al. The impact of previous physical training on redox signaling after traumatic brain injury in rats: behavioral and neurochemical approach. **J Neurotrauma**, Dec 9 2015.

FRANCIOZI, C. E. S. et al. Trauma na infância e adolescência: epidemiologia, tratamento e aspectos econômicos em um hospital público. **Acta Ortop. Bras**. São Paulo, v.16, n.5, p.261-265, set. 2008.

FUJIMOTO, S. T. et al. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 4, p. 365-78, Jul 2004..

GAETZ, M. The neurophysiology of brain injury. **Clin Neurophysiol**, v. 115, n. 1, p. 4-18, Jan 2004.

GENNARELLI, T. A. Mechanisms of brain injury. **J Emerg Med**, v. 11 Suppl 1, p. 5-11, 1993.

GENNARELLI, T. A.; GRAHAM, D. I. Neuropathology. In: SILVER, J. M. (Ed.). Textbook of traumatic brain injury. Washington DC: **American Psychiatric Publishing**, Inc, v.1, 2005. p.27-50.

GLOBUS, M. Y. et al. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. **J Neurochem**, v. 65, n. 4, p. 1704-11, Oct 1995.

GIULIANI, P. et al. Protective activity of guanosine in an in vitro model of Parkinson's disease. **Panminerva Med**, v. 54, n. 1 Suppl 4, p. 43-51, Dec 2012.

- HANSEL, G. et al. Guanosine Protects Against Cortical Focal Ischemia. Involvement of Inflammatory Response. **Mol Neurobiol**, v. 52, n. 3, p. 1791-803, Dec 2015.
- HOCHSTRATE, P.; SCHLUE, W. R. Ca²⁺ influx into leech glial cells and neurones caused by pharmacologically distinct glutamate receptors. **Glia**, v. 12, n. 4, p. 268-80, Dec 1994.
- HUNT, R. F.; BOYCHUK, J. A.; SMITH, B. N. Neural circuit mechanisms of post-traumatic epilepsy. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 89, 2013.
- HYDER, A. A. et al. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. **NeuroRehabilitation**, v. 22, n. 5, p. 341-53, 2007.
- JONES, N. C. et al. Antagonism of the interleukin-1 receptor following traumatic brain injury in the mouse reduces the number of nitric oxide synthase-2-positive cells and improves anatomical and functional outcomes. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 1, p. 72-8, Jul 2005.
- JIANG, S. et al. Metabolism and distribution of guanosine given intraperitoneally: implications for spinal cord injury. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acidas**. v 27, p 673-680, 2008.
- KABADI, S. V.; FADEN, A. I. Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 1, p. 1216-36, 2014.
- KHUMAN, J. et al. Tumor necrosis factor alpha and Fas receptor contribute to cognitive deficits independent of cell death after concussive traumatic brain injury in mice. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 2, p. 778-89, Feb 2011.
- KUFFLER, D. P. Maximizing neuroprotection: where do we stand? **Ther Clin Risk Manag**, v. 8, p. 185-94, 2012..
- LEWIS, P. R., M.D. **Tratado de Neurologia**, 11^a edição, 2007.
- LI, B. et al. Logistic random effects regression models: a comparison of statistical packages for binary and ordinal outcomes. **BMC Med Res Methodol**, v. 11, p. 77, 2011.
- LI, D. W. et al. Guanosine exerts neuroprotective effects by reversing mitochondrial dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease. **Int J Mol Med**, v. 34, n. 5, p. 1358-64, Nov 2014.
- LOANE, D. J.; FADEN, A. I. Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 12, p. 596-604, Dec 2010..
- LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. C. The global burden of disease, 1990-2020. **Nat Med**, v. 4, n. 11, p. 1241-3, Nov 1998.
- MACFARLANE, M.; WILLIAMS, A. C. Apoptosis and disease: a life or death decision. **EMBO Rep**, v. 5, n. 7, p. 674-8, Jul 2004.

MARTINS, H. S.; DAMASCENO, M. C. de T.; AWADA, S. B. Pronto-Socorro: condutas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Barueri: **Manole**, 2008.

MCINTOSH, T. K.; JUHLER, M.; WIELOCH, T. Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury: 1998. **J Neurotrauma**, v. 15, n. 10, p. 731-69, Oct 1998.

MELO, J. R.; SILVA, R. A.; MOREIRA, E. D., JR. [Characteristics of patients with head injury at Salvador City (Bahia--Brazil)]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62, n. 3A, p. 711-4, Sep 2004.

MOLZ, S. et al. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3beta pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 9, p. 1400-8, Sep 2011.

MOREAU, A. R. et al. Development and validation of an age-risk score for mortality predication after thermal injury. **J Trauma**, v. 58, n. 5, p. 967-72, May 2005.

MOREL, P. et al. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. **Neurochem Int**, v. 33, n. 6, p. 531-40, Dec 1998.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 9, p. 748-55, Sep 2002.

OLIVEIRA, E. et al. [Traumatic brain injury: integrated approach]. **Acta Med Port**, v. 25, n. 3, p. 179-92, May-Jun 2012.

OLIVER, C. N. et al. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 13, p. 5144-7, Jul 1990.

OLNEY, J. W. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 30, p. 47-71, 1990.

PALMER, A. M. et al. Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. **J Neurochem**, v. 61, n. 6, p. 2015-24, Dec 1993.

PANDYA, J. D. et al. Post-Injury Administration of Mitochondrial Uncouplers Increases Tissue Sparing and Improves Behavioral Outcome following Traumatic Brain Injury in Rodents. **J Neurotrauma**, v. 24, n. 5, p. 798-811, May 2007.

PITKANEN, A.; MCINTOSH, T. K. Animal models of post-traumatic epilepsy. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 2, p. 241-61, Feb 2006.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. **J Neurochem**, v. 130, n. 1, p. 61-74, Jul 2014.

- RATHBONE, M. P. et al. Purinergic stimulation of cell division and differentiation: mechanisms and pharmacological implications. **Med Hypotheses**, v. 37, n. 4, p. 213-9, Apr 1992.
- SAATMAN, K. E.; CREED, J.; RAGHUPATHI, R. Calpain as a therapeutic target in traumatic brain injury. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 1, p. 31-42, Jan 2010.
- SAATMAN, K. E. et al. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. **J Neurotrauma**, v. 25, n. 7, p. 719-38, Jul 2008.
- 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, n. 3, p. 401-16, Dec 2007.
- SCHOCH, K. M. et al. Calpastatin overexpression limits calpain-mediated proteolysis and behavioral deficits following traumatic brain injury. **Exp Neurol**, v. 236, n. 2, p. 371-82, Aug 2012.
- SHOHAMI, E. et al. Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 16, n. 3, p. 378-84, May 1996.
- SHOHAMI, E. et al. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. **J Neuroimmunol**, v. 72, n. 2, p. 169-77, Feb 1997.
- SHUKLA, D.; DEVI, B. I.; AGRAWAL, A. Outcome measures for traumatic brain injury. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 113, n. 6, p. 435-441, 2011.
- SILVER, J. M.; MCALLISTER, T. W.; YUDOFSKY, S. D. **Test Book of Traumatic Brain Injury**. London, England: APPI Press, 2005.
- SULLIVAN, P. G. et al. Cytochrome c release and caspase activation after traumatic brain injury. **Brain Res**, v. 949, n. 1-2, p. 88-96, Sep 13 2002.
- SULLIVAN, P. G. et al. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? **J Neurosci Res**, v. 79, n. 1-2, p. 231-9, Jan 1-15 2005.
- TEASDALE, G.; JENNETT, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. **Lancet**, v. 2, n. 7872, p. 81-4, Jul 13 1974.
- TEHRANIAN, R. et al. Improved recovery and delayed cytokine induction after closed head injury in mice with central overexpression of the secreted isoform of the interleukin-1 receptor antagonist. **J Neurotrauma**, v. 19, n. 8, p. 939-51, Aug 2002.
- THOMPSON, J.; SEBASTIANELLI, W.; SLOBOUNOV, S. EEG and postural correlates of mild traumatic brain injury in athletes. **Neurosci Lett**, v. 377, n. 3, p. 158-63, Apr 4 2005.
- TROTTI, D.; DANBOLT, N. C.; VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? **Trends Pharmacol Sci**, v. 19, n. 8, p. 328-34, Aug 1998.

UNTERBERG, A. W. et al. Edema and brain trauma. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 1021-9, 2004.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. Human physiology the mechanisms of body function. Boston: **McGraw-Hill**, 2001.

VOUSINOS-PORCHE, B. et al. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. **Neuron**, v. 37, n. 2, p. 275-86, Jan 23 2003.

WERNER, C.; ENGELHARD, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. **Br J Anaesth**, v. 99, n. 1, p. 4-9, Jul 2007.

XIONG, Y.; MAHMOOD, A.; CHOPP, M. Animal models of traumatic brain injury. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 128-42, Feb 2013.