

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

**Avaliação do perfil farmacocinético da administração intranasal de
guanosina e seu potencial neuroprotetor em um modelo de isquemia do
córtex parietal cerebral por termocoagulação em ratos**

Denise Barbosa Ramos

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzella

Co-Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

PORTO ALEGRE

2013

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

**Avaliação do perfil farmacocinético da administração intranasal de
guanosina e seu potencial neuroprotetor em um modelo de isquemia do
córtex parietal cerebral por termocoagulação em ratos**

Denise Barbosa Ramos

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzella

Co-Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas – Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.

PORTO ALEGRE

2013

Certeza

*“De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...”*

*Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”*

Fernando Pessoa

Agradecimentos

A Deus pelo amor incondicional, pela existência e por ter trilhado um maravilhoso plano de vida para mim, possibilitando-me o convívio com pessoas encantadoras e inesquecíveis ao longo desses 16 anos de Bioquímica, e que certamente continuará me guiando nesta jornada de vida;

À minha família que foi e é significado de educação, caráter, união, amor, amizade, confraternização, cumplicidade, responsabilidade, respeito, sinceridade, confiança, dedicação, esperança, afeto, segredos..., enfim, a base de tudo. Obrigada mãe Neusa Evani Barbosa, pai Pedro Bittencourt Ramos, irmãos Janaína Barbosa Ramos, Rodrigo Barbosa Ramos, Grasiela Barbosa Ramos e Anderson Barbosa Ramos.

A minha irmã Janaína Barbosa Ramos por te me indicado ao Prof. João Sarkis e à Prof^a Ana Battastini para vaga de técnica de laboratório, oportunizando-me, assim, essa conquista;

Ao Prof. João Sarkis pelo exemplo de inteligência, organização, critério, honestidade, justiça, amor, amizade, perseverança e muita paciência... foi com ele que conheci o computador e como ligá-lo e utilizá-lo, foi com ele também que conheci o maravilhoso mundo científico e o amor ao próximo. Muito obrigada pelos seus grandes ensinamentos de vida. Saudades eternas;

À Prof^a Ana Battastini que foi o meu primeiro exemplo de mulher independente, chefe, inteligente, vaidosa, batalhadora, dedicada aos seus alunos e bastante exigente. Teve participação importante na minha seleção de mestrado e tive a honra de tê-la como minha primeira professora da pós graduação na disciplina de enzimologia. E, não poderia ser diferente, foi a minha relatora nesta dissertação. Prof^a Ana, muito obrigada por tudo;

Ao Prof. Diogo Souza pelo exemplo de inteligência, humildade, humanidade, amor, respeito, felicidade, por acreditar nas pessoas e incentivá-las a alcançar seus objetivos, por investir na educação, no aprendizado, e nas pessoas também. Foi ele quem me oportunizou a graduação, a pós graduação, o inglês, o conhecimento, e o valor de um grande amigo, herói, pai. Como já havia escrito a ele em outra ocasião: “O senhor foi, é, e será um paizão para mim!!!!, é difícil pensar em alguma palavra que o descreve, mas fazendo uma analogia, o que Deus representa para a humanidade é o que o Senhor significa para mim”. Prof. Diogo muito obrigada pela oportunidade e por tudo, tudo, tudo...;

Ao meu Orientador Marcelo Ganzella, pelo exemplo de inteligência, autenticidade, dedicação, amor, amizade, felicidade, respeito, incentivo, pela ajuda ao próximo, por acreditar em mim e nunca me desamparar, nem mesmo nos momentos mais difíceis. Esteve comigo sempre: nos estudos, nos experimentos, nos resultados, nos cálculos, nas angústias, nos choros, na ansiedade, no desespero, na alegria, na escrita, “porém” sempre me fortalecendo, colocando minha autoestima no alge! Marcelo, muito obrigada pelo apoio, pela disposição em me ajudar, pela amizade e pela belíssima orientação. Te devo muito, muito, muito e saibas que não conseguiria se não estivesses comigo;

Aos colegas da secretaria pelas conversas, almoços, conselhos, risadas, comemorações e trabalho: Cláudia, Cléia, Douglas, Izabel, Mariana e Sérgio. Muito obrigada por tudo;

A Débora Guerini e ao Roberto Almeida, pessoas maravilhosas e inteligentes, que se propuseram e disponibilizaram precioso tempo para minha preparação na seleção do mestrado. Muito obrigada a vocês;

À Gisele Hansel, companheira de todas as horas, exemplo de inteligência, felicidade, amizade, amor, carinho, beleza, dedicação, determinação, autenticidade, confiança, justiça,... também esteve comigo sempre, nunca me abandonando e sempre disposta a ajudar. Gi, muito obrigada por tudo, e saibas também que eu não conseguiria se não estivesse comigo.

À Fernanda de Medeiros Flores Nunes pelo coleguismo, pelas conversas, pelas risadas e pela companheira das disciplinas da pós graduação. Fezinha, obrigada por tudo;

Aos professores pela convivência e competência: Prof. Carlos Alberto, Prof. Clóvis, Prof. Daniel, Prof. Diogo Lösch, Prof. Diogo, Prof. Dutra, Prof. Fábio, Prof. Guilhian, Prof. José Cláudio, Prof. Luis Valmor, Prof. Moacir, Prof. Renato, Prof^a Ana, Prof^a Ângela, Prof^a Carla, Prof^a Carmem, Prof^a Christianne, Prof^a Cristiane, Prof^a Fátima, Prof^a Lisiane, Prof^a Maria Elisa, Prof^a Regina, Prof^a Susana, Prof^a Vera;

Às pessoas as quais me inspiraram: Alessandra Bruno, Ana Battastini, Ana Elisa Böhmer, Andréia Buffon, Bárbara Rücker, Carla Bonan, Cristina Fürstenau, Daniela Pochmann, Diogo Souza, Elizandra Braganhol, Émerson Casali, Giana Cognato, Gisele Hansel, Jean Oses, João Sarkis, Lúcia Martini, Marcelo Ganzella, Márcia Wink, Rosane Silva, Silvana Frasseto, Simone Berti, Vanessa Bley Ribeiro;

Aos demais colegas: Adriano, Alexandre, Aline, André, Andressa, Ângelo, Ben Hur, Bruna, Cássia, Cássio, Clarissa, Daniel, Denis, Eduardo, Elza, Joanna Rozisky, Júlia, Jussânia, Laila Schenkel, Lia, Luciana, Lucimara, Marcelo, Marcos, Mariana, Mazzini, Mery, Natália, Paulo, Rico, Sabrina, Samanta, Victor, Zimmer;

Ao meu marido Fabiano Gambarra dos Santos, que escolhi para ser o homem da minha vida. Obrigada pelo teu amor, apoio, amizade, companheirismo, incentivo, compreensão e por me aceitar e amar acima de tudo. Muito obrigada, Te amo.

Enfim, a todas as pessoas que me incentivaram de forma direta ou indiretamente, muito obrigada.

ÍNDICE

PARTE I

Resumo	2
Abstract	3
Abreviaturas	4
1. Introdução	6
1.1 Isquemia Cerebral	6
1.2 Modelos Experimentais de Isquemia Cerebral	8
1.2.1 Isquemia global	8
1.2.2 Hipóxia-isquemia	8
1.2.3 Isquemia focal	9
1.3 Excitotoxicidade	10
1.4 Sistema Purinérgico	11
1.5 Guanosina	14
1.6 Administração Intranasal	15
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
2.2.1 Avaliar o perfil farmacocinético	17
2.2.2 Avaliar o potencial neuroprotetor	17
PARTE II	
3. Procedimentos Metodológicos	19
3.1 Reagentes	19
3.2 Animais	19
3.3 Grupos e protocolos experimentais	20
3.3.1 Avaliação do perfil farmacocinético da guanosina pela via intranasal	20
3.3.1.1 Curva de concentração da solução de guanosina	20

3.3.1.2 Curva de volume de administração	21
3.3.1.3 Curva de tempo após administração	21
3.3.1.4 Comparativo entre administração intranasal e intraperitoneal	22
3.3.2 Avaliação do potencial neuroprotetor da guanosina no modelo de isquemia cerebral	23
3.3.2.1 Indução de isquemia focal permanente	23
3.3.2.2 O tratamento	24
3.3.2.3 Aplicação intranasal	25
3.3.2.4 Atividade sensoriomotora pelo teste do cilindro	25
3.3.2.5 Volume de lesão da área infartada	26
3.3.2.6 Integridade da mucosa nasal	26
3.3.2.7 Análise da concentração de purinas pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	27
3.3.3 Processamento das amostras	28
3.3.3.1 Retirada de liquor e plasma	30
3.3.3.2 Retirada das estruturas cerebrais	30
3.4 Estatística	31
4. Resultados	33
4.1 Medida de radioatividade na avaliação do perfil farmacocinético da guanosina pela via intranasal	33
4.1.1 Bulbo	34
4.1.1.1 Curva de concentração	34
4.1.1.2 Curva de volume	34
4.1.1.3 Curva de tempo	34
4.1.2 Córtex	34
4.1.2.1 Curva de concentração	34
4.1.2.2 Curva de volume	35
4.1.2.3 Curva de tempo	35
4.1.3 Hipocampo	35

4.1.3.1 Curva de concentração	35
4.1.3.2 Curva de volume	36
4.1.3.3 Curva de tempo	36
4.1.4 Cerebelo	36
4.1.4.1 Curva de concentração	36
4.1.4.2 Curva de volume	36
4.1.4.3 Curva de tempo	37
4.1.5 Plasma	37
4.1.5.1 Curva de concentração	37
4.1.5.2 Curva de volume	37
4.1.5.3 Curva de tempo	37
4.2 Análise de purinas na avaliação do perfil farmacocinético da guanosina pela via intranasal	38
4.2.1 Bulbo	38
4.2.1.1 Curva de concentração	38
4.2.1.2 Curva de volume	38
4.2.1.3 Curva de tempo	39
4.2.2 Córtex	39
4.2.2.1 Curva de concentração	39
4.2.2.2 Curva de volume	39
4.2.2.3 Curva de tempo	40
4.2.3 Hipocampo	40
4.2.3.1 Curva de concentração	40
4.2.3.2 Curva de volume	40
4.2.3.3 Curva de tempo	40
4.2.4 Cerebelo	41
4.2.4.1 Curva de concentração	41

4.2.4.2 Curva de volume	41
4.2.4.3 Curva de tempo	41
4.2.5 Plasma	41
4.2.5.1 Curva de concentração	41
4.2.5.2 Curva de volume	42
4.2.5.3 Curva de tempo	42
4.2.6 Liquor	42
4.2.6.1 Curva de concentração	42
4.2.6.2 Curva de volume	43
4.2.6.3 Curva de tempo	43
4.3 Comparativo entre administração intranasal (IN) e intraperitoneal (IP) na avaliação do perfil farmacocinético da guanosina	44
4.3.1 Plasma	44
4.3.1.1 Medida de radioatividade	44
4.3.1.2 Análise de purinas	44
4.3.2 Liquor	45
4.3.2.1 Medida de radioatividade	45
4.3.2.2 Análise de purinas	45
4.4 Avaliação do potencial neuroprotetor do tratamento com guanosina	46
4.4.1 Atividade sensoriomotora	46
4.4.2 Volume de lesão da área infartada	46
4.4.3 Integridade da mucosa nasal	46
4.4.4 Análise de purinas	46
4.4.4.1 Plasma	46
4.4.4.2 Liquor	47
PARTE III	
5. Discussão	50

6. Conclusão	58
7. Perspectivas	59
8. Tabelas e Figuras	60
9. Referências	83

PARTE I

Resumo

A isquemia cerebral é uma das principais causas de morte no mundo, sendo decorrente de uma interrupção transitória ou permanente do fluxo sanguíneo, podendo levar à massiva morte neuronal. Um dos eventos neurotóxicos relacionados à isquemia é o aumento excessivo da concentração de glutamato extracelular, o que leva a hiperestimulação do sistema glutamatérgico (excitotoxicidade) podendo assim desencadear uma cascata de eventos intracelulares nos neurônios culminando em sua morte.

Nos últimos anos, o nucleosídeo guanósina tem ganhado atenção dos pesquisadores devido ao seu potencial efeito neuroprotetor frente a insultos envolvendo excitotoxicidade. Na maioria dos experimentos *in vivo* no qual foram observados efeitos neuroprotetores, a guanósina foi administrada sistemicamente, apresentando considerável variabilidade na magnitude de seus efeitos entre os animais. Dado que a guanósina é uma molécula endógena, podendo ser rapidamente metabolizada via sistêmica até alcançar o cérebro, novas vias de administração devem ser exploradas a fim de maximizar seus efeitos neuroprotetores. A administração pela via intranasal tem se mostrado uma excelente alternativa visto que a boa perfusão da mucosa nasal fornece um excelente local para uma rápida absorção de drogas e transporte para o cérebro via líquido cefalorraquidiano (líquor).

Neste sentido, nesta dissertação avaliamos o perfil farmacocinético da administração intranasal de guanósina e seu potencial neuroprotetor em um modelo de isquemia do córtex parietal cerebral por termocoagulação em ratos.

Desta maneira, investigamos a concentração de guanósina e seus metabólitos em diferentes estruturas cerebrais, além do líquido e plasma após administração de diferentes doses, volumes de injeção e tempos após injeção intranasal de guanósina pelos métodos de CLAE e de quantificação de radioatividade. Houve diferenças significativas na concentração de purinas presentes nas estruturas analisadas (bulbo, córtex e hipocampo) além do líquido e do plasma. Observamos uma proporcionalidade entre o aumento significativo de radioatividade em relação ao aumento da concentração e do volume. Além disso, comparamos os parâmetros, acima citados, de animais que receberam administração de guanósina pela via intranasal ou intraperitoneal ou não receberam guanósina, apresentando diferenças significativas entre os grupos analisados. A indução isquêmica causou prejuízo sensoriomotor e lesão cerebral nos animais, os quais foram revertidos pelo tratamento com guanósina. Além disso, diferenças significativas na concentração das purinas foram observadas no plasma e no líquido desses animais as quais podem estar envolvidas tanto com o dano nos animais isquêmicos quanto com o efeito neuroprotetor da guanósina.

Assim, este trabalho é o pioneiro mostrando a viabilidade da administração intranasal de guanósina, além de reforçar o efeito neuroprotetor da mesma frente a um modelo de isquemia.

Abstract

Cerebral ischemia is a major cause of death worldwide is caused by a transient or permanent interruption of blood flow and can lead to massive neuronal death. One of neurotoxic events related to ischemia is the excessive increase in the extracellular concentration of glutamate, which leads to hyperstimulation of the glutamatergic system (excitotoxicity) thus triggering a cascade of intracellular events culminating in neurons death.

In recent years, the guanosine nucleoside has claimed researchers attention because of its potential neuroprotective effect against insults involving excitotoxicity. In most in vivo experiments in which guanosine presented neuroprotective effects, it was administered systemically, resulting in considerable variability in the magnitude of their effects. Since guanosine is an endogenous molecule being rapidly metabolized systemically before to reach the brain, new routes of administration should be explored in order to maximize their neuroprotective effects. The intranasal route has proven to be an excellent alternative because the good perfusion of the nasal mucosa provides a great via for a quick absorption for drug transport to the brain via cerebrospinal fluid (CSF).

In this sense, this thesis evaluated the pharmacokinetic profile of intranasal administration of guanosine and its potential neuroprotective in a model of cerebral ischemia in parietal cortex by thermocoagulation in rats.

Thus, we investigated the concentration of guanosine and its metabolites in different brain structures, as well as CSF and plasma after administration of different doses, injection volumes and times after intranasal injection of guanosine by HPLC methods and quantification of radioactivity. There were significant differences in the concentration of purines present in the analyzed structures (cerebral bulb, cortex and hippocampus) plus CSF and plasma. We observed proportionality between the significant increase of radioactivity in relation to the increased concentration and volume. Furthermore, we analyzed these parameters in the plasma and CSF of rats which received intranasally or intraperitoneally injection of guanosine and with those that did not receive it, showing significant differences between these groups. The ischemic induction caused sensorimotor deficit and brain injury, which were reversed by guanosine treatment. Moreover, significant differences in the concentration of purines were observed in plasma and CSF of the animals which can be related with both the ischemic damage as well as with the neuroprotective effect of guanosine.

In conclusion, this work is the pioneer showing the viability of intranasal administration of guanosine, in addition to reinforcing the potential neuroprotective effect of guanosine.

Abreviaturas

ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
ALP	Fosfatase alcalina
AMP	Adenosina monofosfato
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
AU	Ácido úrico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Ecto-5'-NT/CD73	Ecto-5'-nucleotidase
E-NPPases	Ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDases	Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
GDP	Guanosina difosfato
GMP	Guanosina monofosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
GUO	Guanosina
HGPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase
HIPO	Hipoxantina
i.p.	Intraperitoneal
iGluR	Receptores ionotrópicos para glutamato
IMP	Inosina monofosfato

INO	Inosina
KA	Ácido kaínico
mGluR	Receptores metabotrópicos para glutamato
NGF	Fator de crescimento nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
PRPP	5-fosforribosil-1-pirofosfato
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
XAN	Xantina

1. Introdução

1.1 Isquemia Cerebral

A isquemia cerebral é resultado de uma interrupção transitória ou permanente do fluxo sanguíneo, causado por embolia, trombose ou hipoperfusão sanguínea (Taoufik and Probert, 2008; Donnan *et al.*, 2008; Lipton, 1999; Brouns and De Deyn, 2009). Como consequência dessa interrupção, há uma diminuição da disponibilidade de oxigênio e glicose para regiões cerebrais reduzindo assim a produção de energia. Essa condição desencadeia uma série de eventos (cascata isquêmica), podendo levar ao dano cerebral, o qual depende da área afetada e da duração do bloqueio do fluxo sanguíneo (Durukan and Tatlisumak, 2007; Lipton, 1999; Brouns and De Deyn, 2009).

O sistema nervoso central (SNC) necessita de um contínuo suprimento de oxigênio e glicose para o seu metabolismo, um desequilíbrio nesse suprimento resulta em danos celulares e perda das funções neurológicas (Brouns and De Deyn, 2009). A cascata isquêmica inicia-se pela diminuição do aporte de oxigênio (hipóxia) e glicose (hipoglicemia), ocasionando um desequilíbrio iônico. Como resultado, os seguintes eventos acontecem na cascata: excitotoxicidade, aumento intracelular de cálcio (Ca^{2+}), geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterações nos níveis dos neurotransmissores e de algumas substâncias neuroativas, disruptura da barreira-hemato-encefálica, apoptose e ativação da microglia e astrócitos (Durukan and Tatlisumak, 2007; Hazell, 2007).

Devido a esses eventos, a isquemia cerebral é uma doença complexa e devastadora. Nos Estados Unidos e na Europa, a isquemia cerebral é a segunda causa de morte, e um grande número de sobreviventes são

confrontados com sequelas irreversíveis (Taylor *et al.*, 1996; Warlow, 1998). Já no Brasil, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a isquemia cerebral é a principal causa de morte, com 70.232 óbitos registrados em 2008. O governo brasileiro, através da Portaria nº 1.161, de 7 de julho de 2005, ressaltou a importância de ações de promoção e prevenção em todos os níveis de atenção à saúde em relação às doenças cerebrais, sugerindo fortemente ações educativas e preventivas visando à possibilidade de êxito da intervenção precoce e a diminuição de suas seqüelas. Em outubro de 2010, o Ministério da Saúde lançou o documento “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Trombólise no Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Agudo” com o objetivo de aprimorar a assistência aos pacientes com essa doença, cuja ideia é orientar a conduta dos profissionais de saúde sobre diagnóstico e tratamento clínico, além de estabelecer procedimentos para a assistência aos pacientes nos hospitais.

Apesar das políticas preventivas frente às doenças cerebrais (como exercício regular, dietas, hábitos de vida) serem extremamente promissoras, as estratégias terapêuticas ainda são de extrema relevância. Os procedimentos terapêuticos disponíveis para essas doenças, no entanto, são pouco eficazes. Muitos medicamentos disponíveis atualmente têm efeitos colaterais significativos e são onerosos para a maioria dos pacientes nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Por causa desse enorme fardo socioeconômico absorvendo 6% de todos os orçamentos de saúde, e com o aumento da expectativa de vida no mundo, as doenças cerebrovasculares são consideradas uma questão de saúde pública com alto impacto social, e a isquemia cerebral continua sendo uma doença desafiadora. (Durukan and Tatlisumak, 2007). Neste sentido, novas estratégias terapêuticas necessitam

ser desenvolvidas e testadas, na tentativa de reduzir custos, melhorar a eficácia e reduzir os efeitos adversos.

1.2 Modelos Experimentais de Isquemia Cerebral

Muitos modelos experimentais têm sido desenvolvidos para mimetizar a isquemia cerebral que ocorre em humanos, e servem como uma ferramenta indispensável no campo de pesquisa dessa doença. Estes modelos incluem a isquemia global, a hipóxia-isquemia e a isquemia focal (Taoufik and Probert, 2008).

1.2.1 Isquemia global

A isquemia global é produzida pela oclusão dos vasos sanguíneos, podendo ocorrer a coagulação permanente dos vasos ou a coagulação temporária. Em ambos os casos de isquemia há a denominação de "isquemia incompleta", porque persiste um fluxo sanguíneo de 1% a 4%, chamado de fluxo residual. A isquemia global geralmente acontece de cinco a vinte minutos, pois a exposição prolongada pode ser fatal. Os níveis de ATP diminuem drasticamente, mas com a reperfusão (retorno do fluxo sanguíneo), os níveis são satisfatórios, ocasionando a morte celular retardada de populações específicas de neurônios, tornando esse modelo simplificado quando comparado à isquemia que ocorre em seres humanos (Lipton, 1999).

1.2.2 Hipóxia-isquemia

A hipóxia-isquemia envolve a oclusão dos vasos combinada com hipóxia, conduzindo a danos neurológicos. Devido aos animais adultos não

sobreviverem à hipóxia prolongada, esse modelo restringi-se ao uso em neonatos (recém-nascido) (Taoufik and Probert, 2008; Cheng *et al.*, 1998).

1.2.3 Isquemia focal

A isquemia focal envolve uma cascata muito mais complexa de acontecimentos em comparação aos insultos globais e, provavelmente, representa o modelo mais próximo da realidade, por conseguinte, é a mais amplamente estudada. Envolve a oclusão ou termocoagulação dos vasos (Taoufik and Probert, 2008; de Vasconcelos *et al.*, 2010). Essa oclusão pode ser permanente quando a interrupção ou coagulação é irreversível ou pode ser transitória, quando a interrupção do vaso sanguíneo ocorre durante 1 a 3 horas seguida por reperfusão prolongada.

Em ambos os casos, existe uma região de núcleo isquêmico (“core”) onde o fluxo sanguíneo é inferior a 20% dos níveis normais e a região de penumbra, onde o fluxo é inferior a 40% (Hossmann, 1994). Em áreas peri-infartadas ou regiões extrapenumbral o fluxo é mais do que 40%. Estas áreas são caracterizadas por níveis de fluxo sanguíneo e, embora ainda há discussão sobre como essas definições são precisas (Lo, 2008), há um consenso de que o núcleo é uma área danificada em que os neurônios sofrem necrose devido ao esgotamento de energia e da excitotoxicidade, e a região da penumbra é uma área em que os neurônios são disfuncionais, mas ainda não estão mortos (Taoufik and Probert, 2008).

A penumbra eventualmente pode progredir para região de núcleo isquêmico devido à excitotoxicidade em curso, à inflamação e à apoptose (Lee *et al.*, 1999; Iadecola and Alexander, 2001; Choi, 1996), porém, uma vez que esses processos parecem evoluir ao longo do tempo (Dirnagl *et al.*, 1999; Baird *et*

al.,1997) é possível intervir e buscar alternativas, como novas drogas, e estudar mecanismos de ação com o intuito de proteger o tecido cerebral após a isquemia, principalmente tendo como alvo a região penumbral.

1.3 Excitotoxicidade

O tecido nervoso tem um consumo relativamente alto de oxigênio e glicose, e depende quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa para a produção de energia (ATP). Durante a isquemia, a privação desses substratos ocorre rapidamente, diminuindo os níveis de ATP circulante. Essa deficiência energética provoca a inibição da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, causando grande perda dos gradientes iônicos, pois há elevação dos níveis extracelulares de potássio (K^+) e, intracelulares de sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}) e cloro (Cl^-), conduzindo assim ao edema celular (Phan *et al.*, 2002), perda do potencial de membrana e a consequente despolarização dos neurônios. Como consequência da despolarização inicial, há uma liberação para o meio extracelular em grandes quantidades de neurotransmissores, principalmente o aminoácido excitatório glutamato (Brouns and De Deyn, 2009).

O glutamato participa de funções cerebrais importantes como o processo de aprendizado e memória (Izquierdo *et al.*,2006), na formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Ozawa *et al.*, 1998), e de outros eventos que envolvem plasticidade neuronal; como a resposta cerebral a estímulos externos (Schmidt *et al.*, 2008). O glutamato exerce a sua ação por meio da ativação de receptores ionotrópicos (iGluR) NMDA, AMPA, KA (canais permeáveis a íons) e receptores metabotrópicos (mGluR) (acoplados à proteína G), que estão presentes nas membranas neuronais pré e pós

sinápticas e também presentes nas membranas das células gliais (Kew and Kemp, 2005).

Após exercer os seus efeitos excitatórios, o glutamato precisa ser captado da fenda sináptica através de transportadores específicos, cuja atividade é indiretamente dependente de ATP (Tzingounis and Wadiche, 2007). Dessa forma, os transportadores de glutamato são responsáveis por manter o equilíbrio do tônus fisiológico/tóxico da sinapse glutamatérgica. Qualquer mecanismo que interfira nessa captação após a neurotransmissão, resulta em excesso de estimulação dos receptores de glutamato (Danbolt, 2001), podendo provocar necrose bem como iniciar eventos moleculares que levam à apoptose (Dirnagl *et al.*, 1999). A hiperestimulação do sistema glutamatérgico está implicada na patogênese de diversas doenças agudas e crônicas do cérebro, dentre elas, a isquemia cerebral (Frizzo *et al.*, 2003; Maragakis and Rothstein, 2006).

1.4 Sistema Purinérgico

As bases purínicas, como adenina e guanina, e seus respectivos nucleotídeos e nucleosídeos são moléculas amplamente distribuídas dentro e fora das células de organismos vivos. Dentre suas diversas funções biológicas, podemos enfatizar seu papel na construção do DNA e RNA (adenina e guanina), nas vias bioquímicas envolvidas no metabolismo energético celular (ATP e GTP) ou nos mecanismos intracelulares de transdução de sinal como mensageiros secundários (AMPc e GMPc) (Barnstable *et al.*, 2004).

As purinas podem ser classificadas em derivados da adenina (ATP, ADP, AMP, adenosina e adenina) e derivados da guanina (GTP, GDP, GMP,

guanosina e guanina). Ainda compõem as purinas os metabólitos diretos dos derivados da adenina e da guanina: inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico.

O sistema purinérgico constitui-se uma importante via de sinalização celular em que as purinas, acima mencionadas, exercem seus efeitos através de diferentes mecanismos, entre eles uma interação direta com seus receptores, chamados de purinoreceptores (Burnstock, 2002). Esses efeitos, de uma maneira geral, estão relacionados à neurotransmissão do sistema nervoso central, interações neurônios e glia, resposta imune, inflamação, papéis tróficos na proliferação e crescimento celular (Burnstock, 2006) e indução de apoptose (Bours *et al.*, 2006).

Em relação ao metabolismo das purinas, os nucleotídeos trifosfatados são rapidamente catabolizados extracelularmente a nucleotídeos difosfatados; monofosfatados e a nucleosídeos, atingindo concentrações fisiológicas no meio extracelular, que representa o ponto chave para o início da cascata de sinalização (Yegutkin, 2008). Os efeitos dos nucleotídeos e nucleosídeos sobre os receptores purinérgicos são regulados pela ação de ectonucleotidases, que incluem as ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), as ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPases), a ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'-NT/CD73) e a fosfatase alcalina (ALP). Estas enzimas operam em conjunto para a hidrólise completa dos nucleotídeos para nucleosídeos (Braganhol *et al.*, 2013).

Além dessas enzimas, as demais enzimas que participam do metabolismo purinérgico de um modo geral são a 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP)-sintetase (catalisa a formação da porção ativada da ribose-5-fosforribosil-1-pirofosfato – PRPP a partir da ribose-5-fosfato), glutamina-fosforribosil-amidotransferase (catalisa a formação de 5-fosforribosil-1-amina a

Interferências nas vias de metabolização e sinalização estarão contribuindo para um desequilíbrio enzimático e funcional, verificado em muitas doenças tanto sistêmicas quanto cerebrais.

Estudos demonstram que durante a isquemia cerebral, os derivados de guanina e adenina são liberados em grandes quantidades (Pimentel *et al.*, 2013), porém, derivados da guanina são liberados em quantidades maiores do que os seus homólogos derivados de adenina (Pimentel *et al.*, 2013;Ciccarelli *et al.*, 2001; Caciagli *et al.*, 2000).

1.5 Guanosina

Nos últimos anos, o nucleosídeo guanosina tem ganhado atenção dos pesquisadores devido ao seu potencial efeito neuroprotetor em modelos experimentais de doenças cerebrais relacionadas com a excitotoxicidade glutamatérgica (Dal-Cim *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2007; Souza and Schmidt, 2010; Moretto *et al.*, 2009, 2011; Vinadé *et al.*, 2005), incluindo modelos animais de isquemia cerebral *in vivo* (Chang *et al.*, 2008).

A guanosina no meio extracelular exerce uma série de efeitos tróficos nas células, como por exemplo, estimula a proliferação de uma variedade de células em cultura e aumenta a liberação de fatores tróficos tais como o fator de crescimento nuclear (NGF), o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) a partir de vários tipos celulares (Giuliani *et al.*, 2012; Ciccarelli *et al.*, 2000). Por outro lado, em condições excitotóxicas, a guanosina parece ser mais amplamente envolvida na modulação da captação de glutamato (Thomazi *et al.*, 2008).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a guanosina é capaz de estimular a captação de glutamato em cultura de astrócitos e fatias de córtex

cerebral (Frizzo *et al.*, 2001, 2002, 2003; Gottfried *et al.*, 2002). Como a captação de glutamato é o mecanismo endógeno mais importante para modular sua ação sináptica e inibir a hiperestimulação dos receptores glutamatérgicos, a estimulação da captação de glutamato pela guanosina pode ser um dos potenciais mecanismos responsáveis pelos seus efeitos de neuroproteção. Entretanto, os mecanismos moleculares e celulares, pelos quais a guanosina estimula a captação de glutamato, e a relação deste com os efeitos neuroprotetores ainda não estão totalmente esclarecidos.

Alguns estudos sugerem que a guanosina endógena extracelular poderia fazer parte de um mecanismo cerebral envolvido na prevenção da excitotoxicidade (Ciccarelli *et al.*, 2001; Rathbone *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2007; Uemura *et al.*, 1991). Estes estudos demonstraram que o nível extracelular de guanosina aumenta consideravelmente e continua elevado por longos períodos de tempo em modelos *in vitro* (Ciccarelli *et al.*, 2001) e *in vivo* (Uemura *et al.*, 1991) de isquemia cerebral.

1.6 Administração Intranasal

Recentemente, novas vias de administração de drogas estão sendo exploradas com o objetivo de obter melhores resultados, principalmente em relação à neuroproteção. A administração de drogas via intranasal tem se mostrado uma excelente alternativa principalmente para drogas que são rapidamente metabolizadas quando administradas sistemicamente, visto que a boa perfusão da mucosa nasal fornece um excelente local para uma rápida absorção de drogas (Illum, 2012).

O fluxo sanguíneo e a integridade da mucosa são de extrema importância para a boa absorção nasal, os capilares encontrados na lâmina própria da

mucosa são grandes e fenestrados, parecem ser especialmente concebidos para passagem de fluidos através da parede vascular. O fluxo total de sangue por cm^3 é ainda maior na parte superior da mucosa do trato respiratório do que, quando comparado ao músculo, cérebro e fígado. Estas características tornam o nariz um órgão interessante para a absorção de drogas, tendo em vista a extensa rede de capilares sanguíneos sob a mucosa nasal e a grande quantidade de sangue que flui através desta área (Gizurarson, 1993). Estudos demonstraram a possibilidade de drogas, administradas intranasalmente, atravessarem a barreira hemato-encefálica e atingir o SNC diretamente (Illum, 2003).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil farmacocinético da administração intranasal de guanosina e seu potencial neuroprotetor em um modelo de isquemia *in vivo* em ratos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar o perfil farmacocinético da administração intranasal de guanosina determinando os níveis da mesma e de seus metabólitos em liquor, plasma e diferentes estruturas cerebrais de ratos (bulbo, córtex, hipocampo e cerebelo).

2.2.2 Avaliar o potencial neuroprotetor do tratamento com guanosina intranasal em ratos submetidos a um modelo de isquemia focal permanente do córtex parietal cerebral por termocoagulação.

PARTE II

3. Procedimentos Metodológicos

3.1 Reagentes

Guanosina (GUO), acetonitrila (ACN), metanol, ácido trifluoroacético (TFA), ácido tricloroacético (TCA), cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e cloridrato de trifenil tetrazólio (TTC) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Resina de metacrilato foi obtido da Leica® e azul de metileno da Merk®. [^3H]GUO (atividade específica 15Ci/mmol) foi obtido da American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, EUA). Os anestésicos cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina foram obtidos da Syntec do Brasil (Cotia, SP, Brasil). O anestésico inalante Halotano foi adquirido da Cristália (Itapira, SP, Brasil). Todos os outros produtos químicos de grade analítica foram obtidos de fornecedores padrão.

3.2 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos entre 60 e 90 dias, obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Os animais foram mantidos em condições de luz e temperatura adequadas ($21 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12h) com acesso livre à comida e água. Em todos os procedimentos realizados com os animais, que precisasse de anestesia, foram utilizados os anestésicos cloridrato de cetamina (50mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (10mg/kg, i.p.). O volume de injeção foi 1mL/kg. A morte foi realizada por decapitação utilizando guilhotina. Todos os experimentos foram realizados seguindo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA-UFRGS (Projeto Nº: 22319).

3.3 Grupos e protocolos experimentais

3.3.1 Avaliação do perfil farmacocinético da guanosina pela via intranasal

Para averiguar a biodisponibilidade de GUO exógena, e/ou de seus metabólitos no SNC e na circulação sanguínea, foram realizados os seguintes experimentos com número amostral de seis animais em cada grupo:

3.3.1.1 Curva de concentração da solução de guanosina

Foram preparadas soluções de GUO nas concentrações a serem estudadas, sendo que 50% do volume dessas soluções correspondeu a adição de guanosina radioativa ($[^3\text{H}]\text{GUO}$), a qual representou quantitativamente menos de 1% de GUO na menor dose administrada pela via intranasal (2,5mg/mL).

Os animais foram divididos em seis grupos: controle (Ctrl) sem administração de solução e sem procedimento cirúrgico – “naive”; e de acordo com a dose recebida da solução: 2,5mg/mL (2,5); 7,5mg/mL (7,5); 15mg/mL (15); 30mg/mL (30) e 60mg/mL (60).

Os animais foram anestesiados, o volume administrado de cada solução de GUO foi de 50 μL por narina, e após 15 minutos da administração as amostras de liquor e plasma foram obtidas (método descrito no item 3.3.3.1). Logo após, os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais (bulbo, córtex, hipocampo e cerebelo) foram retiradas e processadas de acordo com o protocolo detalhado no item 3.3.3.2. As amostras de liquor, plasma e das estruturas cerebrais foram submetidas à análise de purinas (conforme item 3.3.2.5) e medida da radioatividade (através do contador de cintilação líquida Hidex 300 SL).

3.3.1.2 Curva de volume de administração

Foi preparada uma solução de GUO na concentração de 30mg/mL com 50% de volume de [³H]GUO, a qual representou quantitativamente menos de 1% da dose administrada.

Os animais foram divididos em quatro grupos: controle (Ctrl) sem administração de solução e sem procedimento cirúrgico – “naive”; e de acordo com o volume a ser administrado da solução por narina: 25µL (25); 50µL (50) e 100µL (100).

Os animais foram anestesiados, o volume da solução foi administrado de acordo com cada grupo e após 15 minutos da administração as amostras de liquor e plasma foram obtidas (método descrito no item 3.3.3.1). Logo após, os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais (bulbo, córtex, hipocampo e cerebelo) foram retiradas e processadas de acordo com o protocolo detalhado no item 3.3.3.2. As amostras de liquor, plasma e das estruturas cerebrais foram submetidas à análise de purinas (conforme item 3.3.2.5) e medida da radioatividade (através do contador de cintilação líquida Hidex 300 SL).

Durante os experimentos com o grupo que recebeu o volume de 100µL por narina de GUO foi necessário utilizar no total dez (10) animais para obter o número amostral de seis (6) por grupo, pois quatro (4) animais morreram, provavelmente por asfixia.

3.3.1.3 Curva de tempo após administração

Foi preparada uma solução de GUO na concentração de 30mg/mL com 50% de volume de [³H]GUO, a qual representou quantitativamente menos de 1% da dose administrada.

Os animais foram divididos em seis grupos: controle (Ctrl) sem administração de solução e sem procedimento cirúrgico – “naive”; e de acordo com o tempo a ser esperado após a administração da solução para a obtenção das amostras: 5min (5); 15min (15); 60min (60); 120min (120) e 180minutos (180).

Os animais foram anestesiados, o volume administrado da solução de GUO foi de 50 μ L por narina e após o tempo de cada grupo da administração da solução, as amostras de liquor e plasma foram obtidas (método descrito no item 3.3.3.1). Após cada intervalo de tempo descritos acima, os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais (bulbo, córtex, hipocampo e cerebelo) foram retiradas e processadas de acordo com o protocolo detalhado no item 3.3.3.2. As amostras de liquor, plasma e das estruturas cerebrais foram submetidas à análise de purinas (conforme item 3.3.2.5) e medida da radioatividade (através do contador de cintilação líquida Hidex 300 SL).

3.3.1.4 Comparativo entre administração intranasal e intraperitoneal

Foi preparada uma solução de GUO na concentração de 30mg/mL com 50% de volume de [³H]GUO, a qual representou quantitativamente menos de 1% da dose administrada.

Os animais foram divididos em três grupos: controle (Ctrl) sem administração de solução e sem procedimento cirúrgico – “naive”; administração intranasal (IN) (50 μ L por narina); e administração intraperitoneal (IP) (100 μ L injetado via i.p.).

Os animais foram anestesiados, foi administrada a solução de GUO pela respectiva via designada a cada grupo, em um volume total de 100 μ L, e após 5 minutos da administração, as amostras de liquor e plasma foram obtidas

(método descrito no item 3.3.3.1). Logo após, os animais foram decapitados e as estruturas cerebrais (bulbo, córtex, hipocampo e cerebelo) foram retiradas e processadas de acordo com o protocolo detalhado no item 3.3.3.2. As amostras de liquor, plasma e das estruturas cerebrais foram submetidas à análise de purinas (conforme item 3.3.2.5) e medida da radioatividade (através do contador de cintilação líquida Hidex 300 SL).

3.3.2 Avaliação do potencial neuroprotetor da guanosina no modelo de isquemia cerebral

Para averiguar o potencial neuroprotetor da administração intranasal de GUO frente a um modelo de isquemia cerebral focal permanente, foram realizados os seguintes experimentos com número amostral de dez (10) animais em cada grupo:

3.3.2.1 Indução de isquemia focal permanente

A lesão isquêmica foi induzida por termocoagulação do sangue nos vasos pial do córtex motor e sensoriomotor. Este procedimento resulta na degeneração das seis camadas corticais, logo abaixo dos vasos sanguíneos afetados (de Vasconcelos *et al.*, 2010). Resumidamente, os animais foram anestesiados e colocados no aparelho estereotáxico. O crânio foi exposto cirurgicamente e uma craniotomia foi realizada, expondo o córtex fronto-parietal esquerdo (+ 2 a - 6 mm A.P. e + 2 a 0 mm L.L. do bregma). O sangue dos vasos pial foi termocoagulado pela aproximação de uma sonda quente para a dura-máter. Após o procedimento, a pele foi suturada e a temperatura corporal foi mantida a 37°C, utilizando uma almofada de aquecimento até à recuperação da anestesia (Szele *et al.*, 1995).

3.3.2.2 O tratamento

Foi preparada uma solução de GUO na concentração de 30mg/mL em salina (NaCl 0.9%).

Os animais foram divididos em cinco grupos: controle (Ctrl) (sem administração de solução e sem procedimento cirúrgico – “naive”); sham salina (SS) (craniotomia sem indução de isquemia, solução de salina administrada intranasal no volume de 50µL por narina); sham GUO (SG) (craniotomia sem indução de isquemia, solução de guanosina administrada intranasal no volume de 50µL por narina); isquemia salina (IS) (craniotomia com indução de isquemia, solução de salina administrada intranasal no volume de 50µL por narina); isquemia GUO (IG) (craniotomia com indução de isquemia, solução de guanosina administrada intranasal no volume de 50µL por narina).

Os animais foram anestesiados e submetidos ao procedimento cirúrgico (detalhado no item 3.3.2.1). Todos os grupos, exceto o grupo Ctrl, receberam administração por via intranasal (salina e/ou GUO, de acordo com cada grupo) imediatamente, 1h, 3h e 6h após a cirurgia. Para a administração da salina e/ou GUO no período de 3h e 6h após a cirurgia, os animais foram anestesiados novamente, porém, com a metade da dose inicial. Após 24h da indução isquêmica, os animais foram submetidos ao teste do cilindro (detalhado no item 3.3.2.4), anestesiados, e amostras de liquor e sangue foram coletadas (conforme item 3.3.3.1) para análise de purinas (conforme item 3.3.2.7). O cérebro foi removido para análise do volume da lesão infartada (detalhado no item 3.3.2.5).

A concentração e o volume de administração da solução de GUO utilizados foram escolhidos com base na avaliação do perfil farmacocinético da administração intranasal. Os tempos escolhidos de administração foram

baseados em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o mesmo modelo de isquemia (trabalho em fase de publicação).

3.3.2.3 Aplicação intranasal

A solução de GUO 30mg/mL e salina 0,9% (de acordo com cada grupo) foi aplicada em cada narina do animal na parte inferior do septo nasal com auxílio de uma pipeta com ponteira de extremidade longa. O volume administrado da GUO e salina por narina foi de 50µL adicionado lentamente.

3.3.2.4 Atividade sensoriomotora pelo teste do cilindro

Este teste baseia-se no comportamento exploratório espontâneo dos roedores (de Vasconcelos *et al.*, 2010). Os animais foram submetidos a um pré-teste antes da cirurgia para indução da isquemia cerebral.

O pré-teste consistiu em colocar o animal dentro de um cilindro de vidro (20cm de diâmetro e 30cm de altura) e os primeiros 20 toques com os membros anteriores no cilindro foram contados e registrados. As ocorrências de toques com uso exclusivo do membro ipsilateral (lado da lesão) ou do membro contralateral (lado intacto) ou a utilização de ambos os membros foram registradas separadamente.

Vinte e quatro horas (24h) após a cirurgia, esse procedimento se repetiu e os números foram novamente contados e registrados para computação dos dados para o cálculo da percentagem de assimetria (mínimo de 70%). A assimetria foi calculada pela seguinte fórmula: $\text{escore de assimetria} = (\% \text{ de utilizações ipsilateral}) - (\% \text{ de utilizações contralateral})$. Depois disso, o escore de assimetria foi convertido para o escore de simetria ($100 - \text{escore de assimetria}$) (Macrae, 2011; Challert, 2006; de Vasconcelos *et al.*, 2010).

3.3.2.5 Volume de lesão da área infartada

Depois de 24 horas da cirurgia, os animais foram mortos e os cérebros foram rapidamente removidos do crânio e seccionados num plano coronal a 2 mm de espessura utilizando uma matriz de cérebro de rato (Insight LTDA, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

As fatias foram imersas durante 30 minutos em 2% de TTC a 37°C, seguido por fixação durante a noite em paraformaldeído a 4%. O volume de infarto foi calculado pela fórmula: volume infarto = medida da área de infarto x espessura da fatia (2 mm). As fatias do cérebro foram analisadas pelo programa computacional Image J. Os resultados estão expressos em mm³ (Swanson *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2009).

3.3.2.6 Integridade da mucosa nasal

Para verificar a integridade da mucosa, foi realizada a análise histológica dos septos nasais, removidos após o tratamento (detalhado no item 3.3.2.2), de três ratos do grupo IS e de três ratos do grupo IG. Os septos foram fixados em paraformaldeído 4% e logo após, desidratados em uma série de álcool etílico de 70% durante 1h, 80% por 1h, 90% por 1h e 95% por 2h. Posteriormente, as amostras foram pré-infiltradas e emblocadas em resina de metacrilato. Em seguida, os septos nasais foram cortados em micrótomo na espessura de 5µm ao longo de toda sua extensão no plano horizontal e as fatias foram dispostas em lâminas, e coradas com azul de metileno 1% por 1 minuto. Após a coloração, as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada e seladas por uma lamínula com Bálsamo do Canadá. Todas as secções foram observadas em microscópio óptico à procura de qualquer alteração da mucosa nasal.

3.3.2.7 Análise da concentração de purinas pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

A determinação das concentrações de purinas presentes nas amostras de liquor, plasma e homogenatos das estruturas cerebrais (bulbo, córtex, hipocampo e cerebelo) foram realizadas através da metodologia de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) conforme (Schmidt *et al.*, 2009). O sistema de cromatografia utilizado foi Shimadzu LC-20AT. As especificações do aparelho são as seguintes: sistema de bomba quaternária, degaseificadora à vácuo, válvula de injeção automática (loop de 1mL), detector de ultravioleta e radioativo, coluna supelco C18 (250 mm x 4.6 mm, 5µm). O fluxo da fase móvel foi de 1,2 mL/min e a temperatura da coluna mantida em 24°C. A composição dos tampões utilizados manteve-se inalterada (A: 150 mM de tampão fosfato, pH 6.0 contendo 150 mM de cloreto de potássio; B: 15% de ACN no tampão A). O perfil do gradiente foi modificado para o seguinte teor de tampão B, na fase móvel: 0% a 0min, 2% em 5min, 7% em 2,45min, 50% em 10min, 100% em 11min, 100% em 12,30min e 0% em 12,40min. O volume de amostra injetada foi de 20µL a cada 17min. A absorbância foi lida em 254 nm.

Foram analisados os seguintes compostos: adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), adenosina (ADO), inosina monofosfato (IMP), inosina (INO), hipoxantina (HIPO), guanosina trifosfato (GTP), guanosina difosfato (GDP), guanosina monofosfato (GMP), guanosina (GUO), xantina (XAN) e ácido úrico (AU).

3.3.3 Processamento das amostras

Para definição dos procedimentos e protocolos utilizados, foram realizados alguns experimentos pilotos para verificar mudanças na quantidade de cintilação:

- **Homogeneização**

Foram comparadas a homogeneização das amostras utilizando o tampão fosfato (PBS) e TFA 7% (resultados não mostrados), não mostrando alterações na quantidade de cintilação, porém, na mecanicidade da homogeneização o TFA 7% mostrou-se mais eficaz.

- **Desproteção das amostras**

Foram comparadas variadas substâncias para desproteção das amostras, como o ácido tricloroacético (TCA) 10%; o ácido perclórico 4%; o metanol 100%; a acetonitrila 100% e o ácido trifluoroacético (TFA) 7% (resultados não mostrados), no entanto, houve pequenas alterações na quantidade de cintilação, tornando o TFA 7% mais eficaz.

- **Anestésicos**

Foram comparados os anestésicos cetamina/xilasina e o inalador halotano (resultados não mostrados), não mostrando alterações na quantidade de cintilação, porém, como a administração da GUO é pela via intranasal, para evitar danos na mucosa nasal, optamos por utilizar os anestésicos cetamina/xilasina.

- **pH da solução de guanosina com 50% de volume de guanosina**

- **[³H]GUO**

Foram comparadas soluções de guanosina (30mg/mL) sem adição de NaOH (pH 5) e com adição de NaOH para obter pH 8 (resultados não

mostrados), não mostrando alterações na quantidade de cintilação. Assim, utilizamos a solução de GUO sem a adição de NaOH.

- **Integridade da mucosa nasal**

Os animais foram divididos em dois grupos com o número amostral de três animais por grupo: controle (Ctrl) (sem administração intranasal - rato normal) e tratado (com administração intranasal de GUO 30mg/mL com 50µL por narina). Após 15min da administração intranasal de GUO, os ratos foram anestesiados e decapitados, e os septos nasais foram processados conforme descrito detalhadamente no item 3.3.2.6. Não houve alterações histológicas entre os grupos analisados.

- **Qualidade da [³H]GUO**

Através do método da CLAE (3.3.2.7), com detector de radioatividade, foram investigados o conteúdo de diferentes frascos de [³H]GUO para avaliação de sua qualidade. Verificou-se que em um dos frascos analisados a radioatividade não estava condizente com a GUO, porém, em um pico diferente não identificável pelo método utilizado (3.3.2.7). Nos demais frascos de [³H]GUO, além da radioatividade ser constatada no pico referente à GUO, detectou-se radioatividade no pico inicial o qual representa substâncias que não apresentam nenhuma interação com a coluna. A partir disso, resolvemos liofilizar (retirada de molécula de água por sublimação) da [³H]GUO e testá-la novamente. A partir da liofilização, pode-se observar que a radioatividade somente estava presente no pico referente à GUO, sugerindo que a molécula radioativa não detectável pelo método da CLAE pudesse ser a molécula de água. Logo, utilizamos a [³H]GUO liofilizada para preparar as soluções de GUO utilizadas no estudo da farmacocinética neste trabalho.

3.3.3.1 Retirada de liquor e plasma

O liquor foi retirado (aproximadamente 100µL) por punção direta da cisterna magna com uma agulha de insulina, em aparelho estereotáxico, cada amostra foi centrifugada em “eppendorf” a 10.000 x *g* a 4°C por 10min para obtenção de um sobrenadante livre de células. Esse sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22µm e as amostras foram armazenadas individualmente a -70°C.

O sangue foi retirado (aproximadamente 2mL) por punção cardíaca e adicionado em tubos de coleta contendo o anticoagulante citrato de sódio. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 x *g* por 10min, o plasma foi coletado e uma alíquota de 400µL foi adicionada à 600µL de TFA 7% para desproteinização. Essa mistura foi então centrifugada a 10.000 x *g* a 4°C por 10min, o sobrenadante foi coletado, desse sobrenadante se retirou uma alíquota de 400µL para quantificação de cintilação através de um contador de cintilação, e uma alíquota de 100µL que foi neutralizada com 75µL de bicarbonato de potássio 1,5M (K₂CO₃). Após a neutralização a amostra foi filtrada em filtro de 0,22µm e as amostras foram armazenadas individualmente a -70°C, para análise de purinas (conforme item 3.3.2.7).

3.3.3.2 Retirada das estruturas cerebrais

As estruturas cerebrais foram utilizadas para avaliação do perfil farmacocinético da GUO pela via intranasal (conforme itens 3.3.1.1; 3.3.1.2 e 3.3.1.3). Bulbo, córtex, hipocampo e cerebelo foram dissecados do cérebro, pesados, e as estruturas do hemisfério esquerdo foram utilizadas para dosagens de purinas (conforme item 3.3.2.7), e as estruturas do hemisfério direito foram utilizadas para quantificação da radioatividade.

O procedimento a seguir foi realizado para cada estrutura de ambos os hemisférios. Para desproteção, as estruturas foram homogeneizadas em 600µL de TFA 7%, exceto o bulbo, que foi homogeneizado em 300µL de TFA 7%. Logo após, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g a 4°C por 10min, e o sobrenadante foi coletado. Para análise de cintilação foi retirada uma alíquota de 200µL do bulbo e para as demais estruturas uma alíquota de 400µL. Para a análise de purinas pelo método de CLAE (conforme item 3.3.2.7) foi retirada uma alíquota de 100µL, que foi neutralizada com 75µL de bicarbonato de potássio 1,5M (K₂CO₃), após a neutralização, a amostra foi filtrada em filtro de 0,22µm e posteriormente armazenadas individualmente a -70°C.

3.4 Estatística

Todos os resultados foram submetidos ao teste de Barlett para averiguar a distribuição das amostras (resultado paramétrico). Na análise dos resultados da atividade sensoriomotora (3.3.2.4) foi utilizado ANOVA de dois (duas) vias (fatores: grupos e tempo) de medidas repetidas seguida do pós-teste de Bonferroni. Na análise dos resultados do volume de lesão (3.3.2.5) foi utilizado o teste *t* não pareado e, na análise dos resultados da farmacocinética (3.3.1) foi utilizado ANOVA de um (uma) via seguida do pós-teste de Tukey comparando todos os grupos entre si.

Na análise das concentrações de purinas dos animais submetidos ao protocolo de isquemia (3.3.2) foi utilizado ANOVA de um (uma) via seguida do pós-teste de Tukey, comparando cada grupo com o grupo Ctrl para investigar os efeitos das nossas intervenções, seguido de ANOVA de dois (duas) vias

(fatores: lesão e tratamento) e pós-teste de Bonferroni para averiguar o efeito da cirurgia e do tratamento.

As diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade de $p \leq 0,05$.

4. Resultados

Os ratos que não receberam nenhum tipo de interferência, tais como anestesia, cirurgia e/ou tratamento foram considerados animais controle (Ctrl) (“naive”) em cada experimento realizado. Ao final de todos os experimentos, esses controles foram agrupados em uma única população, denominada grupo controle (Ctrl), a fim de considerar a variabilidade interexperimental. Dessa forma, o grupo controle é idêntico para todas as comparações realizadas neste trabalho.

Para averiguar a biodisponibilidade da guanosina (GUO) exógena, pela via intranasal (detalhado no item 3.3.1), determinando seu perfil farmacocinético, verificamos a medida de radioatividade presente nas estruturas cerebrais do hemisfério direito abaixo discriminadas (bulbo, córtex, hipocampo e cerebelo) e no plasma, através do contador de cintilação líquida.

Assim, realizamos a curva de concentração (detalhado no item 3.3.1.1), após esse resultado, escolhemos uma concentração fixa de GUO (30mg/mL) para realizar a curva de volume (detalhado no item 3.3.1.2), que após esse resultado, mantivemos a concentração de GUO e escolhemos o volume fixo de administração da mesma (50 μ L por narina) para realizar a curva de tempo (detalhado no item 3.3.1.3).

As amostras foram coletadas conforme itens 3.3.3.1 e 3.3.3.2. Os resultados seguem abaixo:

4.1 Medida de radioatividade na avaliação do perfil farmacocinético da guanosina pela via intranasal

4.1.1 Bulbo

4.1.1.1 Curva de concentração

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado (2,5mg/mL de GUO). Conforme o aumento da concentração de GUO verificou-se uma tendência ao aumento da radioatividade, apresentando diferença significativa a partir do grupo GUO 30mg/mL em relação às doses menores (TABELA 1-A, $p < 0,05$).

4.1.1.2 Curva de volume

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado (GUO 25 μ L por narina). Conforme o aumento de volume administrado, verificou-se uma tendência ao aumento da radioatividade, apresentando um aumento significativo no grupo GUO 100 μ L por narina em comparação aos grupos com volumes menores (TABELA 1-B, $p < 0,05$).

4.1.1.3 Curva de tempo

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado (5 minutos após a administração intranasal de GUO), não apresentando diferença significativa entre os demais tempos analisados (TABELA 1-C, $p > 0,05$).

4.1.2 Córtex

4.1.2.1 Curva de concentração

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado. Conforme o aumento da concentração de GUO verificou-se uma tendência ao aumento da radioatividade, apresentando diferença significativa a

partir do grupo GUO 30mg/mL em relação aos grupos com doses menores (TABELA 2-A, $p < 0,05$).

4.1.2.2 Curva de volume

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado. Conforme o aumento de volume administrado de GUO, verificou-se uma tendência ao aumento da radioatividade, apresentando um aumento significativo no grupo com volume de 100 μ L por narina em comparação aos grupos com volumes menores (TABELA 2-B, $p < 0,05$).

4.1.2.3 Curva de tempo

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado, apresentando um aumento significativo de radioatividade 2h após a administração intranasal de GUO em relação aos demais tempos observados (TABELA 2-C, $p < 0,05$).

4.1.3 Hipocampo

4.1.3.1 Curva de concentração

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado. Conforme o aumento da concentração de GUO verificou-se uma tendência ao aumento da radioatividade, apresentando diferença significativa a partir do grupo com dose de 30mg/mL de GUO em relação aos grupos com doses menores (TABELA 3-A, $p < 0,05$).

4.1.3.2 Curva de volume

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado. Conforme o aumento de volume administrado de GUO, verificou-se uma tendência ao aumento da radioatividade, apresentando um aumento significativo no grupo com volume de 100µL por narina em comparação aos grupos com volumes menores (TABELA 3-B, $p<0,05$).

4.1.3.3 Curva de tempo

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado, apresentando um aumento significativo de radioatividade 2h após a administração intranasal de GUO em relação aos demais tempos observados (TABELA 3-C, $p<0,05$).

4.1.4 Cerebelo

4.1.4.1 Curva de concentração

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado, apresentando aumento significativo da radioatividade a partir do grupo GUO 15mg/mL em relação aos grupos com doses menores (TABELA 4-A, $p<0,05$).

4.1.4.2 Curva de volume

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado. Conforme o aumento de volume administrado de GUO, verificou-se uma tendência ao aumento da radioatividade, apresentando um aumento significativo no grupo GUO 100µL por narina em comparação aos grupos com volumes menores (TABELA 4-B, $p<0,05$).

4.1.4.3 Curva de tempo

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado, não apresentando diferença significativa de radioatividade entre os demais grupos (TABELA 4-C, $p>0,05$).

4.1.5 Plasma

4.1.5.1 Curva de concentração

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado. Conforme o aumento da concentração de GUO verificou-se uma tendência ao aumento da radioatividade, apresentando diferença significativa a partir do grupo com dose de 30mg/mL de GUO em relação aos grupos com doses menores (TABELA 5-A, $p<0,05$).

4.1.5.2 Curva de volume

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado. Conforme o aumento de volume administrado de GUO, verificou-se uma tendência ao aumento da radioatividade, apresentando um aumento significativo no grupo com volume de 100 μ L por narina em comparação aos volumes menores (TABELA 5-B, $p<0,05$).

4.1.5.3 Curva de tempo

Foi constatada a existência de radioatividade desde o primeiro grupo analisado, não apresentando diferença significativa de radioatividade entre os grupos estudados (TABELA 5-C, $p>0,05$).

Analisando ainda o perfil farmacocinético da administração intranasal de GUO (detalhado item 3.3.1), determinamos os níveis de GUO e de seus

metabólitos (através da análise de purinas pelo método da CLAE - detalhado no item 3.3.2.7) nas estruturas cerebrais do hemisfério esquerdo abaixo discriminadas (bulbo, córtex, hipocampo e cerebelo), no plasma e no liquor. Realizamos a curva de concentração (detalhado no item 3.3.1.1), após esse resultado, escolhemos uma concentração fixa de GUO (30mg/mL) para realizar a curva de volume (detalhado no item 3.3.1.2), que após esse resultado, mantivemos a concentração de GUO e escolhemos o volume fixo de administração da mesma (50µL por narina) para realizar a curva de tempo (detalhado no item 3.3.1.3). As amostras foram coletadas conforme os itens 3.3.3.1 e 3.3.3.2. Os resultados seguem abaixo:

4.2 Análise de purinas na avaliação do perfil farmacocinético da guanosina pela via intranasal

4.2.1 Bulbo

4.2.1.1 Curva de concentração

Em comparação às concentrações das purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se um aumento significativo de XAN e uma tendência ao aumento de AU no grupo que recebeu a dose de 7,5mg/mL de GUO em comparação aos demais grupos (TABELA 1-A, $p < 0,05$). Não foram constatadas alterações significativas nas concentrações das demais purinas averiguadas em relação aos grupos estudados (TABELA 1-A, $p > 0,05$).

4.2.1.2 Curva de volume

Em comparação às concentrações das purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se um aumento significativo de XAN no grupo que recebeu a

administração intranasal de GUO no volume de 25µL por narina em comparação aos grupos que receberam volumes maiores (TABELA 1-B, $p<0,05$). Foi observado um aumento e uma diminuição significativa de AMP no grupo que recebeu 100µL e 50µL por narina, respectivamente, em comparação aos outros grupos (TABELA 1-B, $p<0,05$). As concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 1-B, $p>0,05$).

4.2.1.3 Curva de tempo

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se um aumento significativo de XAN 2h após a administração de GUO (TABELA 1-C, $p<0,05$). A concentração de AU diminuiu significativamente nos tempos analisados, exceto 15min após a administração de GUO (TABELA 1-C, $p<0,05$). As concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 1-C, $p>0,05$).

4.2.2 Córtex

4.2.2.1 Curva de concentração

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, não foram constatadas alterações significativas das concentrações de purinas nos grupos estudados (TABELA 2-A, $p>0,05$).

4.2.2.2 Curva de volume

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, não foram constatadas alterações significativas das concentrações de purinas nos grupos estudados (TABELA 2-B, $p>0,05$).

4.2.2.3 Curva de tempo

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se um aumento significativo de ATP a partir de 2h após a administração intranasal de GUO (TABELA 2-C, $p < 0,05$). Foi observado um aumento significativo da concentração de AU 1h após a administração de GUO (TABELA 2-C, $p < 0,05$). As concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 2-C, $p > 0,05$).

4.2.3 Hipocampo

4.2.3.1 Curva de concentração

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, não foram constatadas alterações significativas das concentrações de purinas nos grupos estudados (TABELA 3-A, $p > 0,05$).

4.2.3.2 Curva de volume

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, não foram constatadas alterações significativas das concentrações de purinas nos grupos estudados (TABELA 3-B, $p > 0,05$).

4.2.3.3 Curva de tempo

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se uma tendência ao aumento de ATP a partir de 5min após a administração intranasal de GUO, apresentando diferença significativa a partir de 2h após a administração da mesma (TABELA 3-C, $p < 0,05$). As

concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 3-C, $p>0,05$).

4.2.4 Cerebelo

4.2.4.1 Curva de concentração

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, não foram constatadas alterações significativas das concentrações de purinas nos grupos estudados (TABELA 4-A, $p>0,05$).

4.2.4.2 Curva de volume

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, não foram constatadas alterações significativas das concentrações de purinas nos grupos estudados (TABELA 4-B, $p>0,05$).

4.2.4.3 Curva de tempo

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, não foram constatadas alterações significativas das concentrações de purinas nos grupos estudados (TABELA 4-C, $p>0,05$).

4.2.5 Plasma

4.2.5.1 Curva de concentração

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se um aumento significativo de GMP e de AU no grupo que recebeu a dose de 2,5mg/mL de GUO (TABELA 5-A, $p<0,05$). As concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 5-A, $p>0,05$).

4.2.5.2 Curva de volume

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se uma tendência ao aumento de GUO a partir do grupo que recebeu a administração intranasal de GUO com volume de 50 μ L por narina. Nesse mesmo grupo houve um aumento significativo dos níveis de ADO (TABELA 5-B, $p < 0,05$). A concentração de INO diminuiu significativamente a partir do grupo que recebeu a administração intranasal de GUO no volume de 25 μ L por narina (TABELA 5-B, $p < 0,05$). As concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 5-B, $p > 0,05$).

4.2.5.3 Curva de tempo

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se um aumento significativo de GUO após 5min da administração intranasal de GUO (TABELA 5-C, $p < 0,05$). Foi observado uma diminuição significativa da concentração de XAN a partir de 1h após a administração de GUO (TABELA 5-C, $p < 0,05$). As concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 5-C, $p > 0,05$).

4.2.6 Liquor

4.2.6.1 Curva de concentração

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se um aumento significativo de AU, GMP, HIPO, XAN, INO e ADO no grupo que recebeu a administração intranasal de GUO na dose de 60mg/mL

(TABELA 6-A, $p < 0,05$). A partir do grupo que recebeu a administração de GUO na dose de 7,5mg/mL, houve aumento significativo na concentração de GUO em relação às doses menores (TABELA 6-A, $p < 0,05$).

4.2.6.2 Curva de volume

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se uma tendência ao aumento da concentração de AU nos grupos analisados. Os grupos que receberam uma administração intranasal de GUO nos volumes de 25 μ L e 50 μ L por narina apresentaram aumento significativo de GUO comparado ao grupo controle (TABELA 6-B, $p < 0,05$). As concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 6-B, $p > 0,05$).

4.2.6.3 Curva de tempo

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se um aumento significativo de GUO após 5min da administração intranasal de GUO (TABELA 6-C, $p < 0,05$). A partir de 2h após a administração da GUO, houve aumento significativo de INO (TABELA 6-C, $p < 0,05$). Foi observada uma diminuição da XAN 3h após a administração de GUO (TABELA 6-C, $p < 0,05$) e uma tendência à diminuição da concentração de ADO em todos os tempos analisados, sendo esta diferença significativa somente 1h após a administração de GUO (TABELA 6-C, $p < 0,05$). As concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 6-C, $p > 0,05$).

Também realizamos experimentos para obter um comparativo do perfil farmacocinético da administração intranasal e intraperitoneal de GUO

(detalhado no item 3.3.1.4) nas amostras de plasma e liquor. Os resultados seguem abaixo:

4.3 Comparativo entre administração intranasal (IN) e intraperitoneal (IP) na avaliação do perfil farmacocinético da guanosina

4.3.1 Plasma

4.3.1.1 Medida de radioatividade

Foi constatada a existência de radioatividade em ambos os grupos estudados (IN e IP), porém, o grupo IP apresentou um nível significativamente maior de radioatividade em relação ao grupo IN (TABELA 7-A, $p < 0,05$).

4.3.1.2 Análise de purinas

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se uma diminuição significativa de ADO no grupo IN em relação ao grupo IP (TABELA 7-A, $p < 0,05$). Houve uma tendência ao aumento de AU em ambos os grupos. O aumento da concentração de GUO foi observado em ambos os grupos, porém, somente foi estatisticamente significativo no grupo IN (TABELA 7-A, $p < 0,05$). As concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 7-A, $p > 0,05$).

4.3.2 Liquor

4.3.2.1 Medida de radioatividade

Foi constatada a existência de radioatividade em ambos os grupos estudados (IN e IP), não apresentando diferença significativa entre eles (TABELA 7-B, $p>0,05$).

4.3.2.2 Análise de purinas

Em comparação às concentrações de purinas presentes no grupo Ctrl, verificou-se um aumento significativo de AU, HIPO, AMP no grupo IN (TABELA 7-B, $p<0,05$). A concentração do GMP aumentou significativamente no grupo IP em relação ao grupo Ctrl (TABELA 7-B, $p<0,05$). Em ambos os grupos houve aumento significativo de GUO, e uma diminuição significativa de ADO (TABELA 7-B, $p<0,05$). As concentrações das demais purinas analisadas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (TABELA 7-B, $p>0,05$).

Assim, após os resultados dos experimentos da farmacocinética e com o intuito de avaliar o efeito neuroprotetor da administração intranasal de GUO (detalhado no item 3.3.2), realizamos experimentos para indução da isquemia cerebral (detalhado no item 3.3.2.1) e avaliação do tratamento com GUO (detalhado no item 3.3.2.2).

Foi necessário verificar a atividade sensoriomotora dos animais pelo teste do cilindro (detalhado no item 3.3.2.4) e o volume de lesão causada pela indução da isquemia cerebral (detalhado no item 3.3.2.5). Verificou-se também a integridade da mucosa nasal, demonstrando que a GUO não destrói o epitélio (detalhado no item 3.3.2.6) e por fim, a análise das concentrações de purinas

pelo método da CLAE (detalhado no item 3.3.2.7) no plasma e no liquor dos animais estudados. Os resultados seguem abaixo:

4.4 Avaliação do potencial neuroprotetor do tratamento com guanosina

4.4.1 Atividade sensoriomotora

Os cinco grupos analisados (Ctrl, SS, SG, IS, IG) apresentaram taxa de simetria de aproximadamente 90% no pré-teste do cilindro. Após 24h da indução da isquemia cerebral, apenas o grupo IS apresentou taxa de simetria significativamente inferior a 70% (FIGURA 1).

4.4.2 Volume de lesão da área infartada

Verificou-se lesão do córtex cerebral no hemisfério esquerdo apenas nos grupos isquêmicos (IS e IG) visualizados pela técnica do cloridrato de trifetil tetrazólio (TTC). O volume de lesão foi significativamente menor no grupo IG quando comparado ao grupo IS (FIGURA 2).

4.4.3 Integridade da mucosa nasal

Nenhuma alteração histológica em relação à integridade do epitélio nasal foi observada nos grupos que receberam as quatro administrações intranasais de salina e/ou GUO após o procedimento cirúrgico (conforme o protocolo detalhado no item 3.3.2.2) (FIGURA 3).

4.4.4 Análise de purinas

4.4.4.1 Plasma

Nenhuma alteração significativa nas concentrações de ADP, GMP e AU foi observada entre os grupos analisados ($p > 0,05$). As concentrações de ADO

e INO diminuíram significativamente em todos os grupos analisados (SS, SG, IS, IG) em comparação ao grupo Ctrl ($p < 0,05$), sendo que a concentração de INO nos animais isquêmicos (IS e IG) foi significativamente menor em comparação aos grupos sham (SS e SG) ($F_{1;36} = 5,23$; $p < 0,05$). A concentração de GUO aumentou significativamente em todos os grupos analisados em comparação ao grupo Ctrl ($p < 0,05$). A concentração de HIPO diminuiu significativamente nos grupos SS, SG e IG com tendência a diminuir no grupo IS em comparação ao grupo Ctrl ($p < 0,05$), além disso, foi verificada uma interação significativa entre lesão e tratamento, onde o tratamento com GUO diminuiu significativamente nos animais isquêmicos e tendeu a aumentar nos animais sham ($F_{1;36} = 6,39$; $p < 0,05$). Os grupos isquêmicos apresentaram diminuição significativa da concentração de XAN em relação ao grupo Ctrl ($p < 0,05$) (FIGURA 4).

4.4.4.2 Liquor

Verificou-se um aumento significativo da concentração de ADP nos grupos isquêmicos (IS e IG) em comparação ao grupo Ctrl ($p < 0,05$). Nenhuma alteração nas concentrações de AMP, ADO, INO, GMP e GUO nos grupos analisados ($p > 0,05$). A concentração de HIPO diminuiu nos grupos isquêmicos (IS e IG) em relação aos grupos sham ($F_{1;36} = 5,73$; $p < 0,05$), sendo significativa nos animais que não receberam GUO ($p < 0,05$). Houve uma interação significativa entre lesão e tratamento na concentração dos níveis de XAN, onde o tratamento com GUO tende a diminuir a concentração de XAN nos animais sham e a aumentar nos animais isquêmicos ($F_{1;36} = 5,43$; $p < 0,05$). A concentração de AU aumentou significativamente no grupo IS em relação ao grupo Ctrl ($p < 0,05$), e apresentou um aumento nos animais

isquêmicos em relação aos animais sham ($F_{1;36} = 7,41; p < 0,05$), sendo significativo somente nos animais que não receberam GUO ($p < 0,05$) (FIGURA 5).

PARTE III

5. Discussão

A isquemia cerebral focal permanente é definida como a interrupção do fluxo sanguíneo para uma determinada região do cérebro, afetando as regiões circundantes à área não irrigada. Estratégias de proteção das áreas afetadas ou de resgate de células que estão com a função comprometida tornam-se necessárias na tentativa de diminuir as seqüelas causadas pela isquemia cerebral. Atualmente não existe um procedimento específico e efetivo frente à doença e muitos estudos são conduzidos na tentativa de buscá-los (Ginsberg, 2008).

Nos últimos anos, o nucleosídeo GUO tem ganhado atenção como uma molécula endógena com propriedades neuromoduladoras e/ou um agente neuroprotetor em vários modelos de doenças neurológicas, incluindo doenças cerebrovasculares (Schmidt *et al.*, 2007; Ciccarelli *et al.*, 2001). Neste sentido, já foi observado que a concentração de GUO aumenta no córtex cerebral a partir de 2 horas e mantém-se elevada durante 7 dias após a indução de uma isquemia focal (Uemura *et al.*, 1991). Além disso, diversos estudos mostraram que a administração exógena de GUO protege contra a redução da viabilidade celular em modelos *in vitro* (Dal-Cim *et al.*, 2011; Oleskovicz *et al.*, 2008) e *in vivo* de isquemia promovendo uma melhora funcional e redução no volume de infarto (Chang *et al.*, 2008). Entretanto, os efeitos neuroprotetores até então observados com a administração exógena de GUO apresentam grande variabilidade em sua magnitude, demonstrado por resultados em que a administração sistêmica de GUO não é eficaz para todos os animais (Moretto *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2008; Ganzella *et al.*, 2012).

Desta forma, buscamos investigar nesta dissertação uma nova via de administração de GUO com a finalidade de obter uma melhor eficiência no seu

potencial neuroprotetor. Assim, propusemos estudar a administração intranasal de GUO frente ao modelo de isquemia cerebral focal permanente através da termocoagulação dos vasos pial.

Primeiramente verificamos se uma administração intranasal de GUO causaria algum dano ao epitélio nasal possivelmente prejudicando a boa absorção característica dessa via (resultados não mostrados). Nenhuma alteração foi encontrada pela análise histológica do septo nasal, possibilitando então analisar o perfil farmacocinético da administração intranasal de GUO nas estruturas cerebrais (bulbo, córtex, hipocampo e cerebelo), plasma e liquor.

Constatamos através da medida de radioatividade que a administração intranasal de [³H]GUO apresenta um perfil de aumento diretamente proporcional ao aumento da concentração e ao aumento de volume administrado por narina. Porém, não foi observado aumento proporcional de radioatividade em relação ao tempo após administração, verificando somente um aumento significativo 2h após a administração da mesma em estruturas específicas como o córtex e o hipocampo. Como conclusão destes experimentos, observamos que a administração de [³H]GUO via intranasal alcança o SNC.

Avaliamos também a concentração de purinas presentes nas amostras coletadas visando verificar a metabolização da GUO e possíveis modulações que a administração exógena pudesse promover nas estruturas analisadas. Verificou-se que no córtex e hipocampo 2h e 3h após a administração intranasal de GUO houve aumento significativo de ATP. Embora o ATP não seja um metabólito direto da degradação da GUO, é de conhecimento da área que as concentrações dos nucleotídeos e nucleosídeos purínicos no cérebro são reguladas principalmente pela interconversão dos mesmos pela rota de

salvação. Ademais, tendo em vista que o ATP age como neurotransmissor e/ou neuromodulador no SNC, desempenha função na proliferação celular, na diferenciação e morte celular, pode-se sugerir com este resultado, que o aumento do ATP possa estar envolvido com o efeito neuromodulador da GUO (Burnstock, 2013).

Observamos um aumento da concentração de GUO no liquor 5min após administração intranasal, indicando um transporte direto da cavidade nasal para o SNC (Tingting *et al.*, 2011), além de uma rápida absorção da mesma. Após 1h da administração de GUO houve uma redução da concentração de ADO, a partir de 2h um aumento da concentração de INO e 3h uma diminuição da concentração de XAN no liquor. Estes resultados indicam um efeito tardio da GUO nos níveis dos outros nucleosídeos, além da possível metabolização dos mesmos, principalmente da ADO, a qual levaria ao aumento da concentração de INO. Ademais, visto que a INO estimula neurônios a estender novas projeções para áreas desnervadas após o infarto cortical em ratos, além de exercer vários efeitos anti-inflamatórios tais como a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, pode-se sugerir que o aumento das concentrações de INO também podem estar relacionadas com os efeitos neuroprotetores da GUO (Thauerer *et al.*, 2012).

Observamos também um aumento da concentração de GUO no plasma 5min após sua administração, confirmando a alta vascularização da cavidade nasal. Diferentemente do liquor, no plasma foi observado uma diminuição da concentração de INO, e diminuição da concentração de HIPO, indicando, assim como no liquor, a interconversão das purinas. Curiosamente, em apenas um dos experimentos houve aumento da concentração ADO (curva de volume) no plasma. Embora não nos detemos em averiguar especificamente esta variação

interexperimental, este resultado pode ser explicado por possíveis diferenças metabólicas dos animais no momento do experimento, visto que o plasma, entre as estruturas aqui estudadas, sofre maior influência do estado metabólico dos animais. Vale ressaltar que tentamos minimizar tais possíveis diferenças metabólicas realizando os experimentos sempre no mesmo padrão com relação ao peso e idade dos animais e horário dos experimentos.

Comparando o liquor de animais sem intervenção alguma, ou com administração intranasal e/ou intraperitoneal de GUO 5min após sua administração, ambos os grupos que receberam GUO apresentaram aumento da concentração da mesma e diminuição da concentração de ADO, reforçando o efeito antagônico na modulação das concentrações destes nucleosídeos observado anteriormente. Ademais, no grupo intranasal (IN) verificou-se o aumento de AMP, o aumento de HIPO e o aumento de AU, além de uma tendência ao aumento de INO. Com estes resultados, podemos sugerir que provavelmente a administração de GUO levou a uma possível conversão do AMP a IMP e desta forma metabolizado até AU, já que a concentração de ADO está diminuída e a concentração dos metabólitos da degradação do IMP até AU estão aumentados. Em relação ao plasma, houve um aumento de GUO e uma diminuição de ADO no grupo intranasal (IN), mostrando novamente uma ação antagônica desses nucleosídeos também no plasma.

Ao nosso conhecimento, há apenas um trabalho na literatura que estudou parâmetros farmacocinéticos e o metabolismo da administração intraperitoneal da GUO (8mg/Kg) no SNC (Jiang *et al.*, 2008). Neste trabalho verificou-se um aumento considerável da concentração de GUO somente 15min após a sua administração no cérebro total, porém, observou-se um aumento da concentração de guanina e de XAN (metabólitos diretos de GUO)

em tempos menores. Este dado evidencia uma metabolização sistêmica rápida da GUO. Em nosso estudo, infelizmente não conseguimos detectar a concentração de guanina pela técnica utilizada, porém, através da administração intranasal de GUO demonstramos a presença e o aumento da concentração de GUO já em 5min após a sua administração, evidenciando a rápida absorção da via intranasal. Neste mesmo trabalho citado acima, também foi verificado a quantidade específica de GUO radioativamente marcada ($[^3\text{H}]$ GUO) e a distinção de seus metabólitos diretos (guanina- $[^3\text{H}]$ GUA e xantina- $[^3\text{H}]$ XANT), porém, em nosso estudo a concentração máxima de $[^3\text{H}]$ GUO presente nos tecidos cerebrais foi inferior a mínima concentração necessária para ser detectada pela técnica do CLAE utilizando o detector de radioatividade.

Baseados nesses resultados e com o intuito de avaliar o efeito neuroprotetor da administração intranasal de GUO administrando a menor concentração com diferenças significativas e o maior volume sem taxa de mortalidade entre os grupos analisados, escolhemos a dose 30mg/mL de GUO e o volume de 50 μ L por narina para avaliar o seu potencial neuroprotetor.

Em relação ao tempo de administração de GUO, escolhemos administrar imediatamente, 1h, 3h e 6h após a indução da isquemia, tendo observado que em 5min houve um aumento da concentração de GUO no liquor, além das diferenças encontradas a partir de 2h no córtex cerebral. Ademais, escolhemos estes tempos também com base em um trabalho de nosso grupo que se encontra em fase de publicação utilizando este mesmo modelo de isquemia, o qual constatou um efeito neuroprotetor da GUO administrada intraperitonealmente utilizando este protocolo de administração.

Vinte e quatro horas (24h) após a indução da isquemia cerebral focal permanente o prejuízo sensoriomotor foi avaliado pelo teste do cilindro e logo em seguida foi analisado o volume de lesão cerebral. A administração intranasal de GUO recuperou significativamente tanto a funcionalidade sensoriomotora quanto diminuiu significativamente o volume de infarto no córtex cerebral. Desta forma, a administração intranasal com GUO mostrou-se ser uma via de administração eficiente na promoção dos efeitos neuroprotetores da GUO.

Analisando o plasma dos animais submetidos ao protocolo de isquemia cerebral, verificou-se um aumento de GUO em todos os grupos analisados em relação aos animais sem intervenção alguma. Além da concentração de GUO, houve uma diminuição da concentração de ADO em todos os grupos analisados em relação aos animais sem intervenção, corroborando novamente com a observação do antagonismo existente entre esse nucleosídeos. Ainda em relação aos animais que não sofreram intervenção, verificou-se também a diminuição da concentração de INO, diminuição da concentração de HIPO exceto no grupo isquemia salina (IS) e diminuição da concentração de XAN nos animais lesionados. Esses resultados são de grande importância, pois indicam que a retirada da calota craniana não é um processo isento de sinalização e/ou mudanças das concentrações de purinas no plasma. Desta forma, os grupos sham (animais que sofreram intervenção cirúrgica sem indução isquêmica) são bons indicadores de que a cirurgia é que ocasiona o prejuízo sensoriomotor e lesão cerebral, porém, é preciso averiguar com muito cuidado quanto às mudanças de sinalização, de concentrações de purinas e de outros mecanismos envolvidos na patologia, não podendo utilizar o sham como controle absoluto.

Comparando o plasma dos animais sham com o plasma dos animais isquêmicos, observou-se uma diminuição da concentração de INO nos animais lesionados, não apresentando diferença pelo tratamento com GUO. Também houve uma interação entre lesão e tratamento na concentração de HIPO, o que sugere que o tratamento com GUO mantém os níveis baixos de HIPO nos animais isquêmicos, sugerindo que esta pode ser uma via modulada pela GUO a qual participa do efeito neuroprotetor.

Na análise do liquor, verificou-se uma diminuição da concentração de HIPO e um aumento da concentração de AU no grupo isquemia salina (IS) em relação aos animais sem intervenção. O tratamento com GUO foi capaz de reverter ambos estes efeitos sugerindo que o tratamento com GUO retarda a metabolização completa das purinas. Além disso, houve uma interação significativa entre lesão e tratamento na concentração de XAN, reforçando a ideia que o tratamento com GUO modula a concentração de purinas nos animais isquêmicos.

Vale ressaltar aqui, que não propusemos neste trabalho investigar especificamente o mecanismo pelo qual a GUO exerce seu efeito neuroprotetor, porém, como as purinas aqui estudadas, não só a GUO como também o ATP, a ADO, a INO e o AU, possuem propriedades neuroprotetoras, as alterações das concentrações dessas purinas, promovidas pela administração intranasal de GUO provavelmente devem estar envolvidas com os efeitos neuroprotetores aqui observados. Como não há ferramentas sintéticas disponíveis para estudar especificamente os efeitos da GUO como molécula (como por exemplo um agonista sintético que promova os mesmos efeitos que a GUO em experimentos os quais seus efeitos já foram demonstrados), ainda não é possível isolar o efeito direto da sinalização

promovida pela GUO, dos efeitos promovidos pelas outras purinas por ela moduladas.

Baseando-se em todos os resultados aqui apresentados, podemos hipotetizar que a administração intranasal de GUO é uma via eficaz de estratégia terapêutica para atingir o SNC por apresentar uma rápida absorção da mesma, uma modulação consistente da metabolização e interconversão das purinas no liquor e no sistema circulatório e pelo seu efeito neuroprotetor aqui demonstrado.

6. Conclusão

Portanto, nossos resultados sugerem que a administração intranasal de GUO mostrou-se ser uma eficiente via disponível para possível terapia de isquemia cerebral. Como este trabalho é o pioneiro mostrando a viabilidade da administração intranasal de GUO, além de reforçar o efeito neuroprotetor da mesma frente a um modelo de isquemia, mais estudos são necessários para elucidar seus mecanismos de ação.

7. Perspectivas

7.1 Como não há estudos de administração intranasal de GUO, muitos detalhes precisam ser investigados e ajustados para uma completa absorção da mesma. Alguns fatores que interferem na permeabilidade intranasal e que precisam ser investigados são a solubilidade, a lipofilicidade, a osmolaridade, a viscosidade, o tamanho da partícula e enzimas presentes na cavidade e na mucosa nasal, pois essas enzimas são as principais barreiras para penetração de drogas.

7.2 Devido às alterações nas concentrações de purinas no plasma e liquor dos animais submetidos à isquemia cerebral, o estudo de enzimas do metabolismo purinérgico, como HGPRT, ectonucleotidases, xantina-oxidase, adenosina-desaminase, guanina-desaminase e a nucleosídeo-purina-fosforilase poderiam ajudar a elucidar por qual via ocorre a mudança de perfil das concentrações das purinas, principalmente de INO, HIPO e XAN.

7.3 Em relação às alterações nas concentrações de purinas presentes nas estruturas cerebrais analisadas no estudo de farmacocinética, é interessante a análise dessas estruturas após a indução de isquemia cerebral.

7.4 Análise de possíveis mecanismos de ação envolvidos com a neuromodulação pela guanosina e/ou com a cascata isquêmica, como estudos dos receptores de glutamato neuronal e glial, sinalização de morte celular como caspase-3-clivada e fatores induzidos por hipóxia (Hif-1 α e Hif-1 β), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), de antioxidantes e inflamação.

A

Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Concentração de GUO (mg/mL)						
		Ctrl	2,5	7,5	15	30	60	
CINTILADOR			0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,2 ^{&}	1,5 ± 0,4 [#]	
CLAE	ATP	502 ± 33	482 ± 99	660 ± 114	632 ± 119	553 ± 25	447 ± 183	
	ADP	451 ± 43	398 ± 60	330 ± 22	391 ± 4	377 ± 7	404 ± 33	
	AMP	1757 ± 80	1544 ± 130	1597 ± 174	1777 ± 274	1609 ± 88	1601 ± 175	
	ADO	1015 ± 80	800 ± 43	1021 ± 116	775 ± 82	994 ± 35	657 ± 40	
	INO	707 ± 71	594 ± 167	949 ± 93	751 ± 115	1009 ± 7	586 ± 57	
	HIPO	493 ± 47	433 ± 112	700 ± 127	559 ± 54	657 ± 61	455 ± 68	
	Derivados da guanina (nmol/g)							
		GUO	113 ± 11	87 ± 11	129 ± 11	96 ± 9	126 ± 9	79 ± 2
	Produtos finais da degradação (nmol/g)							
		XAN	12 ± 2	11 ± 5	40 ± 9*	8 ± 4	21 ± 2	4 ± 4
	AU	7 ± 1	5 ± 1	15 ± 2	8 ± 4	8 ± 0	7 ± 3	

B

Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Volume administrado (µL)				
		Ctrl	25	50	100	
CINTILADOR			0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	3,5 ± 1,3*	
CLAE	ATP	502 ± 33	697 ± 39	578 ± 80	544 ± 94	
	ADP	451 ± 43	418 ± 20	387 ± 74	346 ± 93	
	AMP	1757 ± 80	1762 ± 105	1204 ± 86 ⁺	4331 ± 308*	
	ADO	1015 ± 80	835 ± 128	728 ± 136	600 ± 79	
	INO	707 ± 71	547 ± 91	616 ± 89	524 ± 7	
	HIPO	493 ± 47	463 ± 78	493 ± 108	388 ± 41	
	Derivados da guanina (nmol/g)					
		GUO	113 ± 11	82 ± 12	56 ± 11	77 ± 20
	Produtos finais da degradação (nmol/g)					
		XAN	12 ± 2	28 ± 4*	9 ± 1	9 ± 0
	AU	7 ± 1	5 ± 0,4	4 ± 0,6	7 ± 4	

C	Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Tempo após a administração (min)					
			Ctrl	5	15	60	120	180
	CINTILADOR			0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,4	0,7 ± 0,1
	CLAE	ATP	502 ± 33	469 ± 29	441 ± 93	372 ± 75	538 ± 41	613 ± 55
		ADP	451 ± 43	432 ± 22	360 ± 83	410 ± 3	432 ± 38	378 ± 24
		AMP	1757 ± 80	1891 ± 226	1641 ± 372	1802 ± 101	1927 ± 172	2003 ± 215
		ADO	1015 ± 80	1105 ± 91	929 ± 227	921 ± 4	1043 ± 97	956 ± 80
		INO	707 ± 71	535 ± 47	420 ± 108	461 ± 15	753 ± 50	549 ± 88
		HIPO	493 ± 47	339 ± 14	336 ± 75	307 ± 16	413 ± 43	371 ± 46
		Derivados da guanina (nmol/g)						
		GUO	113 ± 11	96 ± 8	85 ± 20	87 ± 7	110 ± 10	107 ± 4
		Produtos finais da degradação (nmol/g)						
		XAN	12 ± 2	16 ± 4	8 ± 1	3 ± 0	20 ± 0 [§]	8 ± 5
	AU	7 ± 1	2 ± 0 ⁺	5 ± 1	2 ± 0 ⁺	3 ± 0 ⁺	2 ± 0 ⁺	

TABELA 1 - Perfil farmacocinético da administração intranasal de GUO no bulbo cerebral através da medida de radioatividade e análise da concentração de purinas (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os dados estão apresentados em nmol/g e representam média ± erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste ANOVA de 1 (uma) via seguida do pós-teste de Tukey. O número amostral (n) foi de 6 animais por grupo. **(A)** Curva de concentração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam a dose em mg/mL de GUO). **(B)** Curva de volume administrado de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam o volume em µL administrado por narina). **(C)** Curva de tempo após a administração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam os tempos após administração em minutos). (* $p < 0,05$ diferença significativa entre todos os grupos analisados; # $p < 0,05$ diferença significativa entre os grupos analisados exceto o grupo 30; & $p < 0,05$ diferença significativa em comparação aos grupos 2,5 e 7,5; + $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao Ctrl; § $p < 0,05$ diferença significativa do grupo 60).

A

Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Concentração de GUO (mg/mL)						
		Ctrl	2,5	7,5	15	30	60	
CINTILADOR			0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0*	0,6 ± 0,0*	
CLAE	ATP	196 ± 17	219 ± 14	198 ± 15	182 ± 15	217 ± 21	198 ± 8	
	ADP	307 ± 22	342 ± 9	298 ± 7	307 ± 13	308 ± 10	314 ± 0	
	AMP	1127 ± 58	1233 ± 5	1130 ± 74	1154 ± 81	1136 ± 55	1154 ± 14	
	ADO	684 ± 41	718 ± 9	740 ± 27	693 ± 31	788 ± 22	631 ± 26	
	INO	295 ± 22	288 ± 2	342 ± 30	267 ± 37	351 ± 30	225 ± 15	
	HIPO	206 ± 22	210 ± 0	234 ± 9	188 ± 1	245 ± 13	174 ± 20	
	Derivados da guanina (nmol/g)							
	GUO	58 ± 6	56 ± 0	64 ± 2	55 ± 5	74 ± 10	48 ± 2	
	Produtos finais da degradação (nmol/g)							
XAN	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 1	1 ± 0	3 ± 0	1 ± 0		
AU	3 ± 1	2 ± 0	5 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	2 ± 0		

B

Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Volume administrado (µL)			
		Ctrl	25	50	100
CINTILADOR			0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1*
CLAE	ATP	196 ± 17	292 ± 48	222 ± 30	218 ± 12
	ADP	307 ± 22	361 ± 23	315 ± 21	319 ± 17
	AMP	1127 ± 58	1241 ± 82	1065 ± 77	1198 ± 28
	ADO	684 ± 41	765 ± 180	751 ± 105	649 ± 56
	INO	295 ± 22	265 ± 60	251 ± 32	277 ± 15
	HIPO	206 ± 22	181 ± 35	184 ± 17	192 ± 9
	Derivados da guanina (nmol/g)				
	GUO	58 ± 6	51 ± 9	75 ± 24	49 ± 4
	Produtos finais da degradação (nmol/g)				
XAN	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	
AU	3 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	

C	Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Tempo após a administração (min)						
			Ctrl	5	15	60	120	180	
	CINTILADOR			0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,1 ^{&}	0,4 ± 0,0	
	CLAE	ATP	196 ± 17	252 ± 20	256 ± 16	262 ± 32	323 ± 19 ⁺	300 ± 20 ⁺	
		ADP	307 ± 22	336 ± 9	349 ± 13	322 ± 12	361 ± 13	345 ± 3	
		AMP	1127 ± 58	1134 ± 7	1145 ± 60	1167 ± 5	1214 ± 33	1181 ± 65	
		ADO	684 ± 41	817 ± 142	716 ± 77	668 ± 71	664 ± 8	739 ± 83	
		INO	295 ± 22	255 ± 13	210 ± 34	254 ± 10	309 ± 22	295 ± 41	
		HIPO	206 ± 22	154 ± 4	113 ± 20	132 ± 3	139 ± 4	154 ± 17	
		Derivados da guanina (nmol/g)							
			GUO	58 ± 6	63 ± 10	52 ± 5	57 ± 3	61 ± 5	62 ± 4
		Produtos finais da degradação (nmol/g)							
			XAN	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	4 ± 0
		AU	3 ± 0	4 ± 0	3 ± 1	9 ± 1 [#]	3 ± 1	3 ± 0	

TABELA 2 - Perfil farmacocinético da administração intranasal de GUO no córtex cerebral através da medida de radioatividade e análise da concentração de purinas (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os dados estão apresentados em nmol/g e representam média ± erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste ANOVA de 1 (uma) via seguida do pós-teste de Tukey. O número amostral (n) foi de 6 animais por grupo. **(A)** Curva de concentração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam a dose em mg/mL de GUO). **(B)** Curva de volume administrado de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam o volume em µL administrado por narina). **(C)** Curva de tempo após a administração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam os tempos após administração em minutos). (* $p < 0,05$ diferença significativa entre todos os grupos analisados; ⁺ $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao Ctrl; [&] $p < 0,05$ diferença significativa entre os grupos 15 e 60; [#] $p < 0,05$ diferença significativa entre os grupos analisados exceto o grupo 5).

A

Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Concentração de GUO (mg/mL)						
		Ctrl	2,5	7,5	15	30	60	
CINTILADOR			0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0*	0,6 ± 0,0*	
CLAE	ATP	259 ± 26	266 ± 32	244 ± 17	243 ± 12	268 ± 23	278 ± 22	
	ADP	300 ± 23	314 ± 43	306 ± 13	310 ± 9	324 ± 29	316 ± 14	
	AMP	973 ± 105	921 ± 125	1026 ± 81	980 ± 27	1019 ± 109	981 ± 33	
	ADO	625 ± 29	563 ± 132	726 ± 39	676 ± 52	746 ± 69	499 ± 44	
	INO	253 ± 18	189 ± 33	324 ± 45	250 ± 35	331 ± 38	198 ± 28	
	HIPO	177 ± 25	134 ± 24	218 ± 13	172 ± 7	225 ± 12	153 ± 21	
	Derivados da guanina (nmol/g)							
	GUO	53 ± 4	40 ± 9	62 ± 6	58 ± 10	62 ± 3	38 ± 5	
Produtos finais da degradação (nmol/g)								
XAN	2 ± 0	2 ± 0	4 ± 0	2 ± 0	3 ± 1	2 ± 0		
AU	4 ± 0	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 0	4 ± 1		

B

Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Volume administrado (µL)			
		Ctrl	25	50	100
CINTILADOR			0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1*
CLAE	ATP	259 ± 26	339 ± 23	284 ± 10	316 ± 29
	ADP	300 ± 23	386 ± 9	291 ± 25	353 ± 27
	AMP	973 ± 105	1183 ± 107	881 ± 66	972 ± 18
	ADO	625 ± 29	729 ± 118	603 ± 93	625 ± 16
	INO	253 ± 18	226 ± 38	206 ± 16	237 ± 14
	HIPO	177 ± 25	159 ± 23	170 ± 12	163 ± 16
	Derivados da guanina (nmol/g)				
	GUO	53 ± 4	54 ± 14	43 ± 7	52 ± 4
Produtos finais da degradação (nmol/g)					
XAN	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	
AU	4 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	

C	Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Tempo após a administração (min)					
			Ctrl	5	15	60	120	180
	CINTILADOR			0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,9 ± 0,2*	0,4 ± 0,0
	CLAE	ATP	259 ± 26	315 ± 21	374 ± 22	411 ± 55	412 ± 30 ⁺	401 ± 33 ⁺
		ADP	300 ± 23	342 ± 13	359 ± 18	439 ± 83	408 ± 26	381 ± 28
		AMP	973 ± 105	1016 ± 31	1081 ± 45	1134 ± 42	1114 ± 31	1135 ± 110
		ADO	625 ± 29	706 ± 58	506 ± 41	558 ± 35	607 ± 54	721 ± 97
		INO	253 ± 18	215 ± 13	172 ± 27	237 ± 12	271 ± 23	274 ± 28
		HIPO	177 ± 25	113 ± 4	86 ± 18	108 ± 5	123 ± 0	150 ± 13
		Derivados da guanina (nmol/g)						
		GUO	53 ± 4	53 ± 3	42 ± 2	50 ± 4	60 ± 3	67 ± 7 [§]
		Produtos finais da degradação (nmol/g)						
		XAN	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
	AU	4 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	5 ± 1	4 ± 0	6 ± 0	

TABELA 3 - Perfil farmacocinético da administração intranasal de GUO no hipocampo cerebral através da medida de radioatividade e análise da concentração de purinas (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os dados estão apresentados em nmol/g e representam média ± erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste ANOVA de 1 (uma) via seguida do pós-teste de Tukey. O número amostral (n) foi de 6 animais por grupo. **(A)** Curva de concentração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam a dose em mg/mL de GUO). **(B)** Curva de volume administrado de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam o volume em µL administrado por narina). **(C)** Curva de tempo após a administração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam os tempos após administração em minutos). (* $p < 0,05$ diferença significativa entre todos os grupos analisados; ⁺ $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao Ctrl; [§] $p < 0,05$ diferença significativa do grupo 15).

A

Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Concentração de GUO (mg/mL)						
		Ctrl	2,5	7,5	15	30	60	
CINTILADOR			0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0 ^{\$}	0,4 ± 0,0*	0,5 ± 0,0*	
CLAE	ATP	171 ± 20	191 ± 20	169 ± 11	177 ± 24	185 ± 15	154 ± 32	
	ADP	375 ± 28	374 ± 40	323 ± 17	458 ± 29	384 ± 21	439 ± 42	
	AMP	998 ± 32	982 ± 5	1036 ± 12	1141 ± 66	1058 ± 29	1118 ± 9	
	ADO	647 ± 43	548 ± 15	624 ± 23	577 ± 67	661 ± 57	494 ± 29	
	INO	284 ± 26	298 ± 19	321 ± 55	226 ± 18	357 ± 49	202 ± 10	
	HIPO	220 ± 27	215 ± 1	249 ± 32	184 ± 14	275 ± 20	180 ± 12	
	Derivados da guanina (nmol/g)							
	GUO	87 ± 8	80 ± 1	92 ± 8	68 ± 7	94 ± 10	58 ± 3	
Produtos finais da degradação (nmol/g)								
XAN	3 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	4 ± 0	3 ± 0	4 ± 0		
AU	5 ± 0	4 ± 0	6 ± 0	6 ± 1	9 ± 2	6 ± 1		

B

Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Volume administrado (µL)			
		Ctrl	25	50	100
CINTILADOR			0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,0*
CLAE	ATP	171 ± 20	207 ± 7	204 ± 18	178 ± 10
	ADP	375 ± 28	468 ± 40	495 ± 83	401 ± 33
	AMP	998 ± 32	1059 ± 10	1058 ± 46	981 ± 57
	ADO	647 ± 43	600 ± 41	641 ± 103	561 ± 87
	INO	284 ± 26	251 ± 49	228 ± 10	277 ± 28
	HIPO	220 ± 27	185 ± 30	191 ± 9	205 ± 19
	Derivados da guanina (nmol/g)				
	GUO	87 ± 8	76 ± 10	73 ± 11	74 ± 5
Produtos finais da degradação (nmol/g)					
XAN	3 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	
AU	5 ± 0	4 ± 0	4 ± 0	3 ± 0	

C	Método	Derivados da adenina (nmol/g)	Tempo após a administração (min)					
			Ctrl	5	15	60	120	180
	CINTILADOR			0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0
	CLAE	ATP	171 ± 20	218 ± 31	257 ± 37	270 ± 25	278 ± 44	237 ± 43
		ADP	375 ± 28	420 ± 41	462 ± 48	513 ± 9	456 ± 55	440 ± 40
		AMP	998 ± 32	1069 ± 69	1004 ± 44	992 ± 17	956 ± 52	999 ± 31
		ADO	647 ± 43	702 ± 74	490 ± 6	502 ± 23	571 ± 49	593 ± 44
		INO	284 ± 26	236 ± 14	194 ± 13	234 ± 13	277 ± 36	280 ± 43
		HIPO	220 ± 27	158 ± 4	124 ± 9	138 ± 4	152 ± 12	171 ± 18
		Derivados da guanina (nmol/g)						
		GUO	87 ± 8	65 ± 2	88 ± 6	63 ± 0	75 ± 4	82 ± 8
		Produtos finais da degradação (nmol/g)						
		XAN	3 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
	AU	5 ± 0	7 ± 3	4 ± 1	5 ± 0	5 ± 1	7 ± 0	

TABELA 4 - Perfil farmacocinético da administração intranasal de GUO no cerebelo cerebral através da medida de radioatividade e análise da concentração de purinas (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os dados estão apresentados em nmol/g e representam média ± erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste ANOVA de 1 (uma) via seguida do pós-teste de Tukey. O número amostral (n) foi de 6 animais por grupo. **(A)** Curva de concentração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam a dose em mg/mL de GUO). **(B)** Curva de volume administrado de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam o volume em µL administrado por narina). **(C)** Curva de tempo após a administração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam os tempos após administração em minutos). (* $p < 0,05$ diferença significativa entre todos os grupos analisados; $^{\$}p < 0,05$ diferença significativa do grupo 2,5).

A

Método	Derivados da adenina (nmol/mL)	Concentração de GUO (mg/mL)					
		Ctrl	2,5	7,5	15	30	60
CINTILADOR			0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0 [#]	0,4 ± 0,0 [*]
CLAE	ADP	4 ± 0	5 ± 0	3 ± 0	4 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
	ADO	2 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0
	INO	5 ± 0	5 ± 0	3 ± 0	5 ± 0	3 ± 0	4 ± 0
	HIPO	5 ± 0	6 ± 0	5 ± 0	2 ± 0	4 ± 0	3 ± 0
	Derivados da guanina (nmol/mL)						
	GMP	5 ± 1	11 ± 2 ^{\$}	3 ± 0	2 ± 0	3 ± 1	5 ± 0
	GUO	0,2 ± 0	0,3 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,2 ± 0	1,0 ± 0
	Produtos finais da degradação (nmol/mL)						
XAN	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	
AU	20 ± 4	40 ± 5 [*]	12 ± 2	9 ± 0	10 ± 1	16 ± 1	

B

Método	Derivados da adenina (nmol/mL)	Volume administrado (µL)			
		Ctrl	25	50	100
CINTILADOR			0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,0 [*]
CLAE	ADP	4 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
	ADO	2 ± 0	2 ± 0	4 ± 0 [*]	1 ± 0
	INO	5 ± 0	2 ± 0 ⁺	3 ± 0 ⁺	3 ± 0 ⁺
	HIPO	5 ± 0	2 ± 0	4 ± 0	4 ± 0
	Derivados da guanina (nmol/mL)				
	GMP	5 ± 1	2 ± 0	3 ± 0	4 ± 0
	GUO	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,6 ± 0	0,4 ± 0
	Produtos finais da degradação (nmol/mL)				
XAN	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	
AU	20 ± 4	3 ± 0	10 ± 0	11 ± 4	

C	Método	Derivados da adenina (nmol/mL)	Tempo após a administração (min)					
			Ctrl	5	15	60	120	180
	CINTILADOR			0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0
	CLAE	ADP	4 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	2 ± 0
		ADO	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0
		INO	5 ± 0	4 ± 0	4 ± 0	6 ± 0	5 ± 0	5 ± 0
		HIPO	5 ± 0	5 ± 0	8 ± 0	5 ± 0	7 ± 0	7 ± 0
		Derivados da guanina (nmol/mL)						
		GMP	5 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
		GUO	0,2 ± 0	0,9 ± 0 ⁺	0,4 ± 0	0,2 ± 0	0,4 ± 0	0,6 ± 0
		Produtos finais da degradação (nmol/mL)						
	XAN	1,5 ± 0	1,3 ± 0	0,9 ± 0	0,6 ± 0 ⁺	0,6 ± 0 ⁺	0,3 ± 0 ^{&}	
	AU	20 ± 4	28 ± 10	14 ± 1	22 ± 5	19 ± 10	17 ± 5	

TABELA 5 - Perfil farmacocinético da administração intranasal de GUO no plasma através da medida de radioatividade e análise da concentração de purinas (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os dados estão apresentados em nmol/mL e representam média ± erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste ANOVA de 1 (uma) via seguida do pós-teste de Tukey. O número amostral (n) foi de 6 animais por grupo. **(A)** Curva de concentração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam a dose em mg/mL de GUO). **(B)** Curva de volume administrado de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam o volume em µL administrado por narina). **(C)** Curva de tempo após a administração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam os tempos após administração em minutos). (* $p < 0,05$ diferença significativa entre todos os grupos analisados; # $p < 0,05$ diferença significativa entre os grupos analisados exceto o grupo 15; & $p < 0,05$ diferença significativa em comparação aos grupos Ctrl e 5; + $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao Ctrl; \$ $p < 0,05$ diferença significativa do grupo 15).

A

Método	Derivados da adenina (nmol/mL)	Concentração de GUO (mg/mL)						
		Ctrl	2,5	7,5	15	30	60	
CLAE	ADP	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,6 ± 0	
	AMP	0,1 ± 0	0,3 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	
	ADO	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,5 ± 0 ⁺	
	INO	0,6 ± 0	1,7 ± 0 ⁺	1,2 ± 0	0,9 ± 0	1,0 ± 0	2 ± 0 ^{&}	
	HIPO	2 ± 0	3 ± 1	3 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	9 ± 0 [*]	
	Derivados da guanina (nmol/mL)							
	GMP	1 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	3 ± 0 ⁺	
	GUO	0,05 ± 0	0,1 ± 0	0,2 ± 0 ⁺	0,2 ± 0 ⁺	0,2 ± 0 ⁺	0,2 ± 0 ⁺	
	Produtos finais da degradação (nmol/mL)							
	XAN	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	7 ± 1 [*]	
AU	2 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	5 ± 0 ⁺		

B

Método	Derivados da adenina (nmol/mL)	Volume administrado (µL)			
		Ctrl	25	50	100
CLAE	ADP	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,4 ± 0	0,5 ± 0
	AMP	0,1 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,1 ± 0
	ADO	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0
	INO	0,6 ± 0	0,9 ± 0	1,0 ± 0	0,7 ± 0
	HIPO	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0
	Derivados da guanina (nmol/mL)				
	GMP	1 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0
	GUO	0,05 ± 0	0,2 ± 0 ⁺	0,2 ± 0 ⁺	0,1 ± 0
	Produtos finais da degradação (nmol/mL)				
	XAN	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
AU	2 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	

C	Método	Derivados da adenina (nmol/mL)	Tempo após a administração (min)					
			Ctrl	5	15	60	120	180
CLAE		ADP	0,5 ± 0	0,4 ± 0	0,4 ± 0	0,4 ± 0	0,3 ± 0	0,3 ± 0
		AMP	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,1 ± 0
		ADO	0,2 ± 0	0,1 ± 0 ⁺	0,1 ± 0	0,06 ± 0 ⁺	0,1 ± 0	0,08 ± 0
		INO	0,6 ± 0	1,3 ± 0	0,7 ± 0	0,1 ± 0	2 ± 0 [#]	2 ± 0 [#]
		HIPO	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0
		Derivados da guanina (nmol/mL)						
		GMP	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	1 ± 0
		GUO	0,03 ± 0	0,5 ± 0 ⁺	0,2 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
		Produtos finais da degradação (nmol/mL)						
		XAN	3 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	1 ± 0 ⁺
	AU	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	

TABELA 6 - Perfil farmacocinético da administração intranasal de GUO no liquor através da análise da concentração de purinas (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os dados estão apresentados em nmol/mL e representam média ± erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste ANOVA de 1 (uma) via seguida do pós-teste de Tukey. O número amostral (n) foi de 6 animais por grupo. **(A)** Curva de concentração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam a dose em mg/mL de GUO). **(B)** Curva de volume administrado de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam o volume em µL administrado por narina). **(C)** Curva de tempo após a administração de GUO (os números em negrito indicados nos grupos representam os tempos após administração em minutos). (* $p < 0,05$ diferença significativa entre todos os grupos analisados; # $p < 0,05$ diferença significativa em comparação aos grupos Ctrl, 5 e 15; & $p < 0,05$ diferença significativa em comparação aos grupos Ctrl, 15 e 30; + $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao Ctrl).

A

Método	Derivados da adenina (nmol/mL)	Ctrl	Vias de administração	
			IN	IP
CINTILADOR			0,4 ± 0,0	0,8 ± 0*
CLAE	ADP	5 ± 0	5 ± 0	4 ± 0
	ADO	2,0 ± 0	0,8 ± 0*	2,5 ± 0
	INO	4 ± 0	6 ± 0	6 ± 0
	HIPO	5 ± 0	4 ± 0	4 ± 0
	Derivados da guanina (nmol/mL)			
	GMP	3 ± 0	4 ± 0	4 ± 1
	GUO	0,2 ± 0	1,0 ± 0*	0,3 ± 0
	Produtos finais da degradação (nmol/mL)			
	XAN	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
	AU	20 ± 5	46 ± 11	34 ± 11

B

Método	Derivados da adenina (nmol/mL)	Ctrl	Vias de administração	
			IN	IP
CINTILADOR			1,0 ± 0	1,0 ± 0
CLAE	ADP	0,5 ± 0	0,4 ± 0	0,5 ± 0
	AMP	0,06 ± 0	0,1 ± 0*	0,1 ± 0
	ADO	0,2 ± 0	0,1 ± 0*	0,1 ± 0*
	INO	0,7 ± 0	1,2 ± 0	0,6 ± 0
	HIPO	2 ± 0	6 ± 0*	2 ± 0
	Derivados da guanina (nmol/mL)			
	GMP	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0*
	GUO	0,08 ± 0	0,5 ± 0*	0,3 ± 0*
	Produtos finais da degradação (nmol/mL)			
	XAN	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0
AU	2 ± 0	3 ± 0*	2 ± 0	

TABELA 7 - Perfil farmacocinético da administração intranasal e intraperitoneal de GUO no plasma e liquor através da medida de radioatividade e análise da concentração de purinas (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os dados estão apresentados em nmol/mL e representam média \pm erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste ANOVA de 1 (uma) via seguida do pós-teste de Tukey. O número amostral (n) foi de 6 animais por grupo. **(A)** Plasma (IN grupo intranasal; IP grupo intraperitoneal). **(B)** Liquor (IN grupo intranasal; IP grupo intraperitoneal). (* $p < 0,05$ diferença significativa entre todos os grupos analisados; + $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao Ctrl).

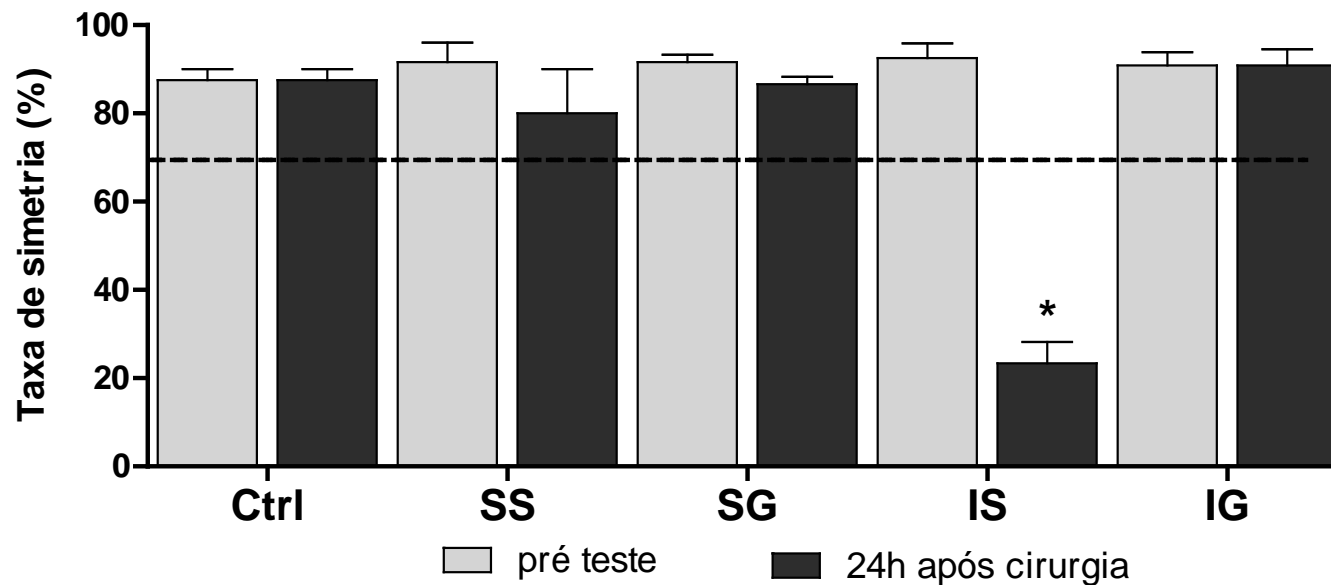


FIGURA 1 – Avaliação da atividade sensoriomotora de ratos no pré-teste e 24h após a indução de isquemia focal permanente (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os grupos analisados: Ctrl (controle), SS (sham salina), SG (sham guanósina), IS (isquemia salina) e IG (isquemia guanósina). Os dados representam média \pm erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste ANOVA de 2 (duas) vias de medidas repetidas (fatores: grupos e tempo) seguida do pós-teste de Bonferroni. O número amostral (n) foi de 10 animais por grupo. (* $p < 0,05$ diferença significativa entre todos os grupos analisados).

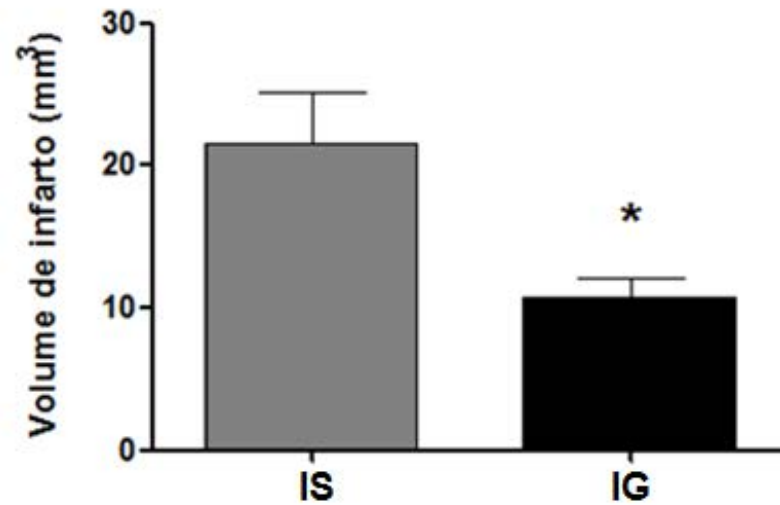
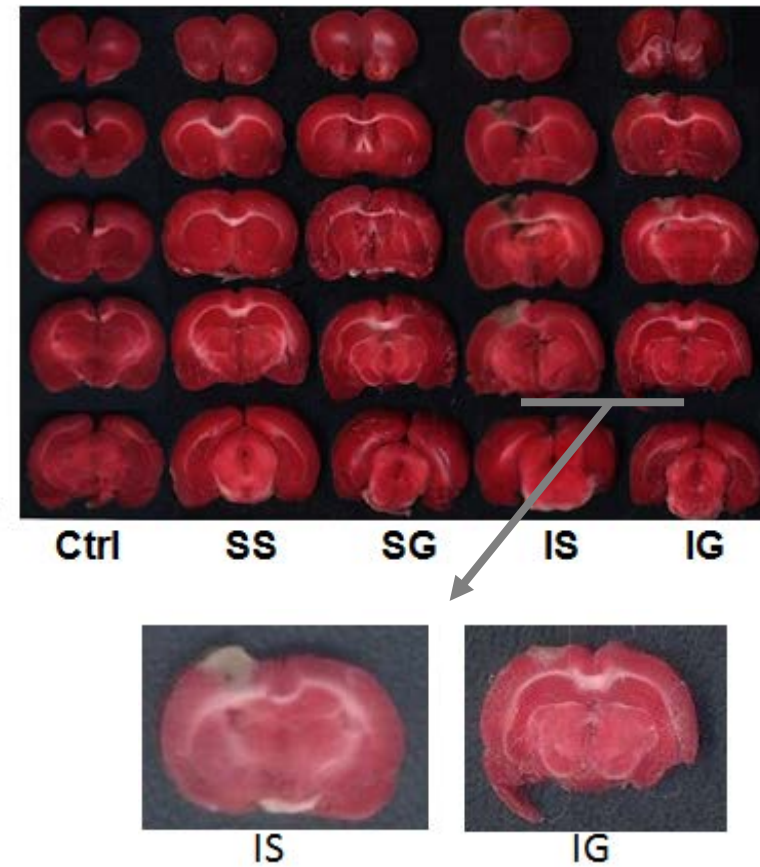
A**B**

FIGURA 2 – Avaliação do volume de infarto 24h após a indução de isquemia focal permanente (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os grupos analisados: Ctrl (controle), SS (sham salina), SG (sham guanosina), IS (isquemia salina) e IG (isquemia guanosina). Os dados representam média \pm erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste *t* não pareado. O número amostral (*n*) foi de 10 animais por grupo. **(A)** Volume de infarto (mm³). **(B)** secções coronais representativas do cérebro, a coloração vermelha indica regiões não lesadas e a coloração pálida indica regiões lesadas. (**p* < 0,05).

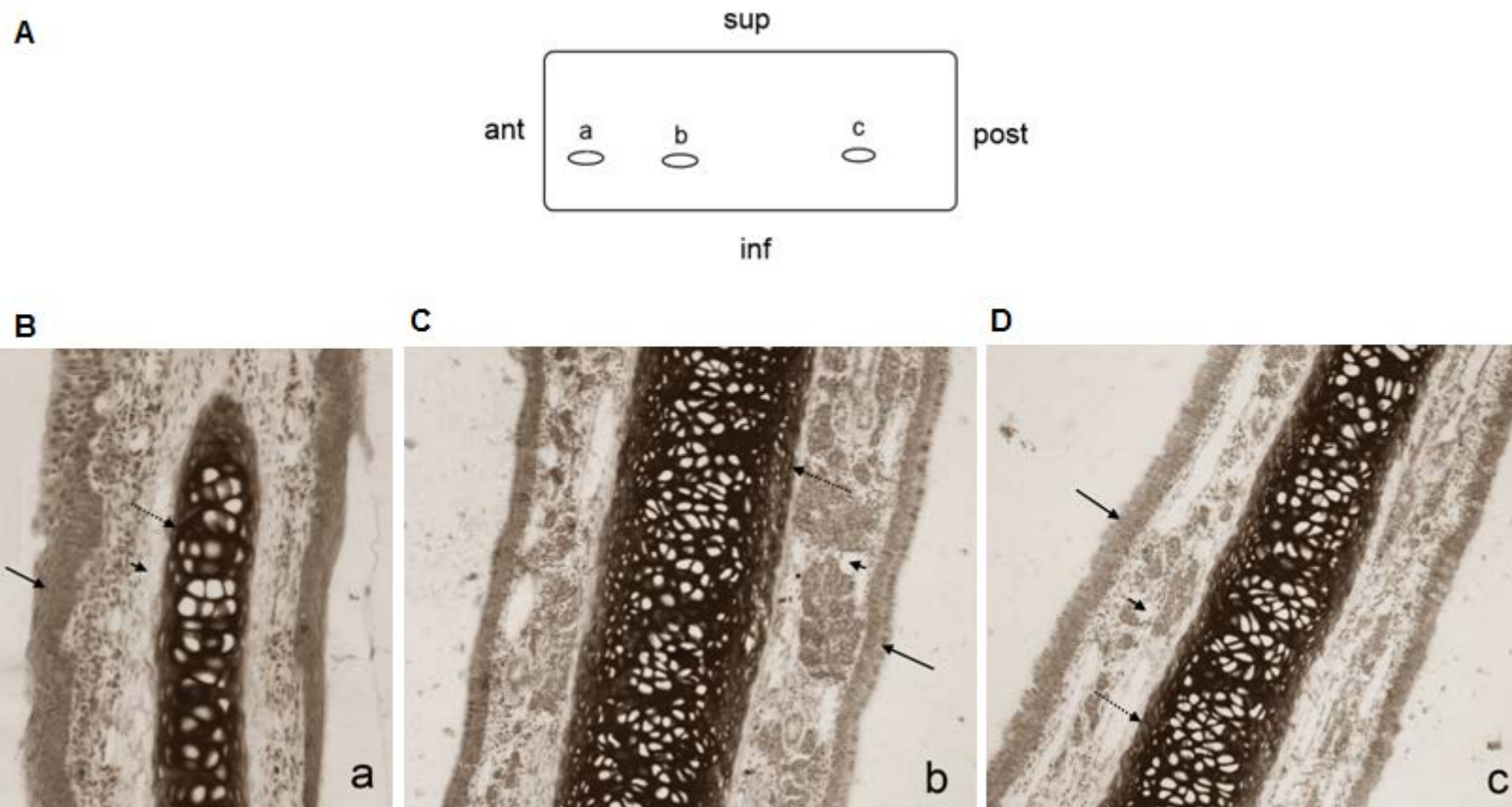
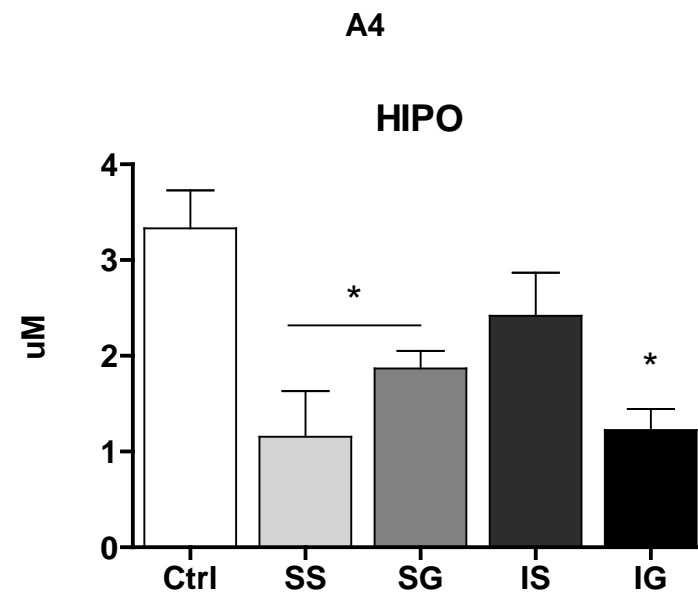
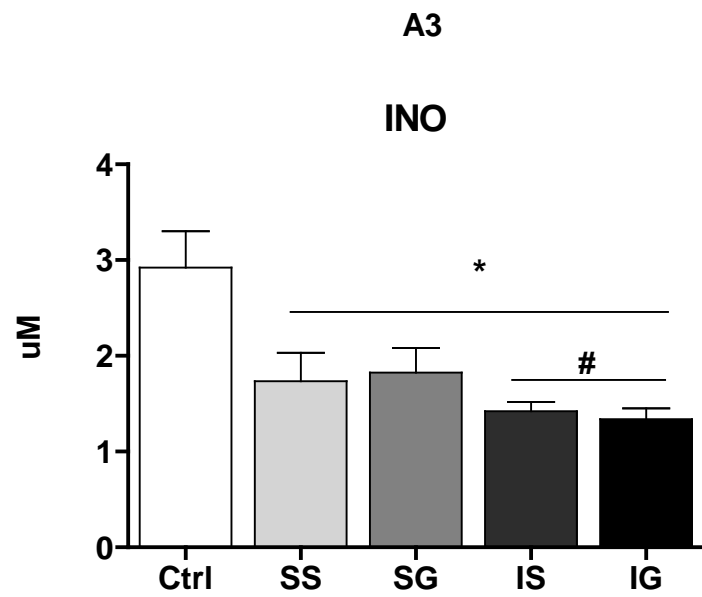
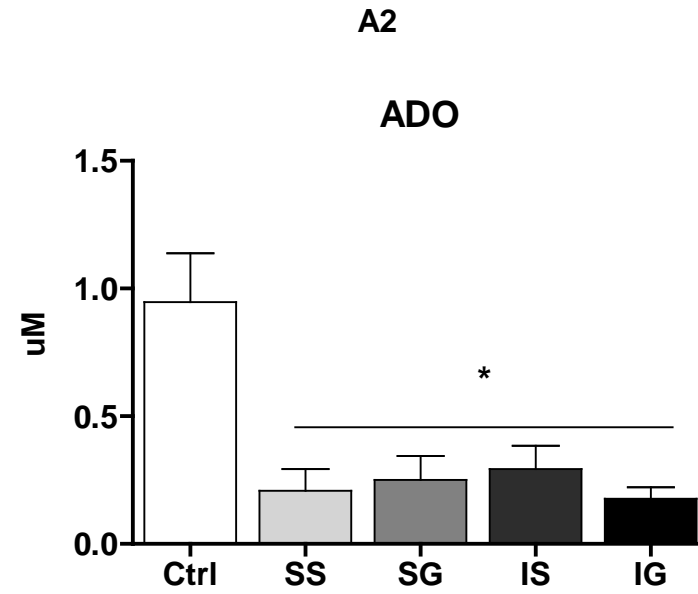
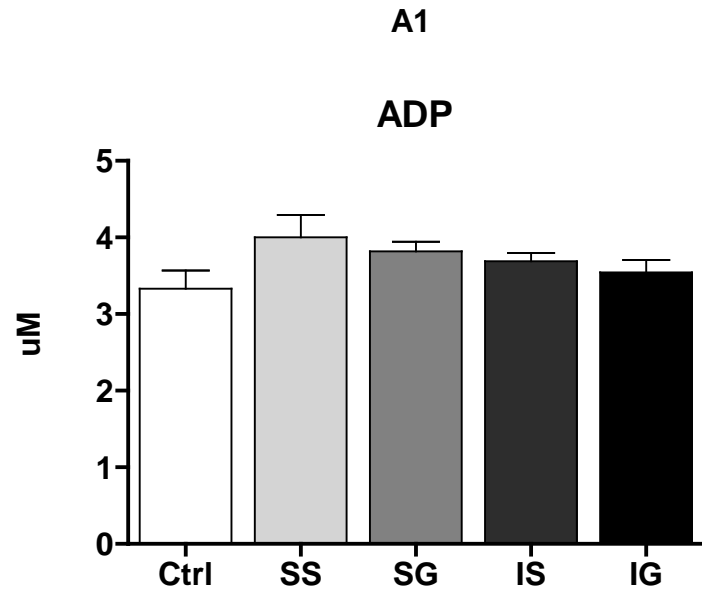
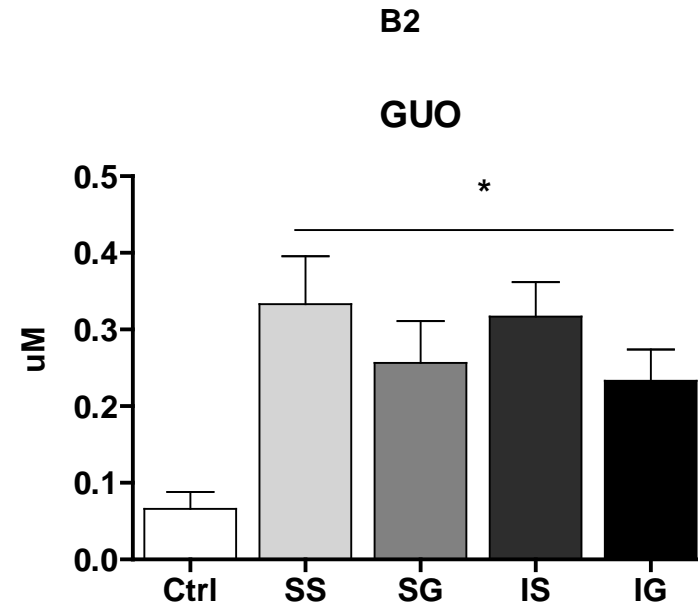
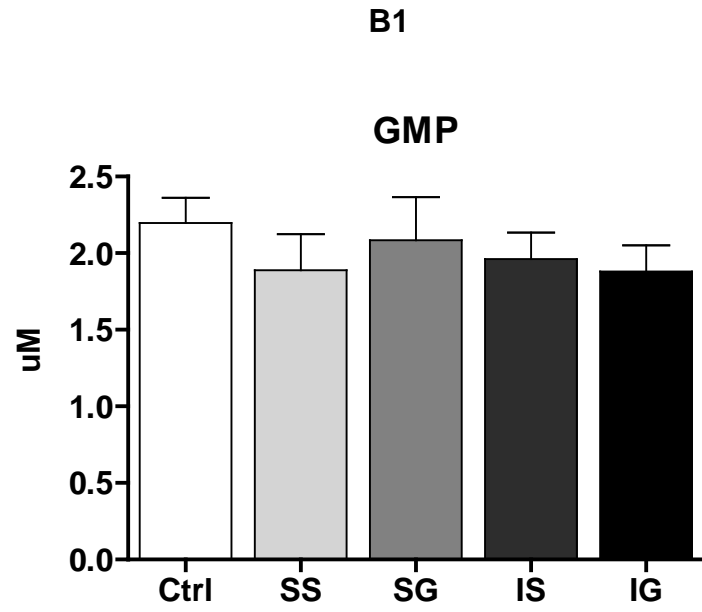


FIGURA 3 – Histologia de septo nasal de animais submetidos à quatro administrações intranasais GUO (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Fotomicrografias representativas de secções horizontais das regiões anterior, média e posterior do septo nasal são mostradas nesta figura. Observa-se o epitélio de revestimento (seta longa), a lâmina própria (seta curta) e a cartilagem hialina (seta pontilhada). **(A)** Representação esquemática do septo nasal visto lateralmente indicando as regiões observadas. **(B)** Região anterior do septo em aumento de 200X. **(C)** Região mediana do septo em aumento de 100X. **(D)** Região posterior do septo em aumento de 100X.





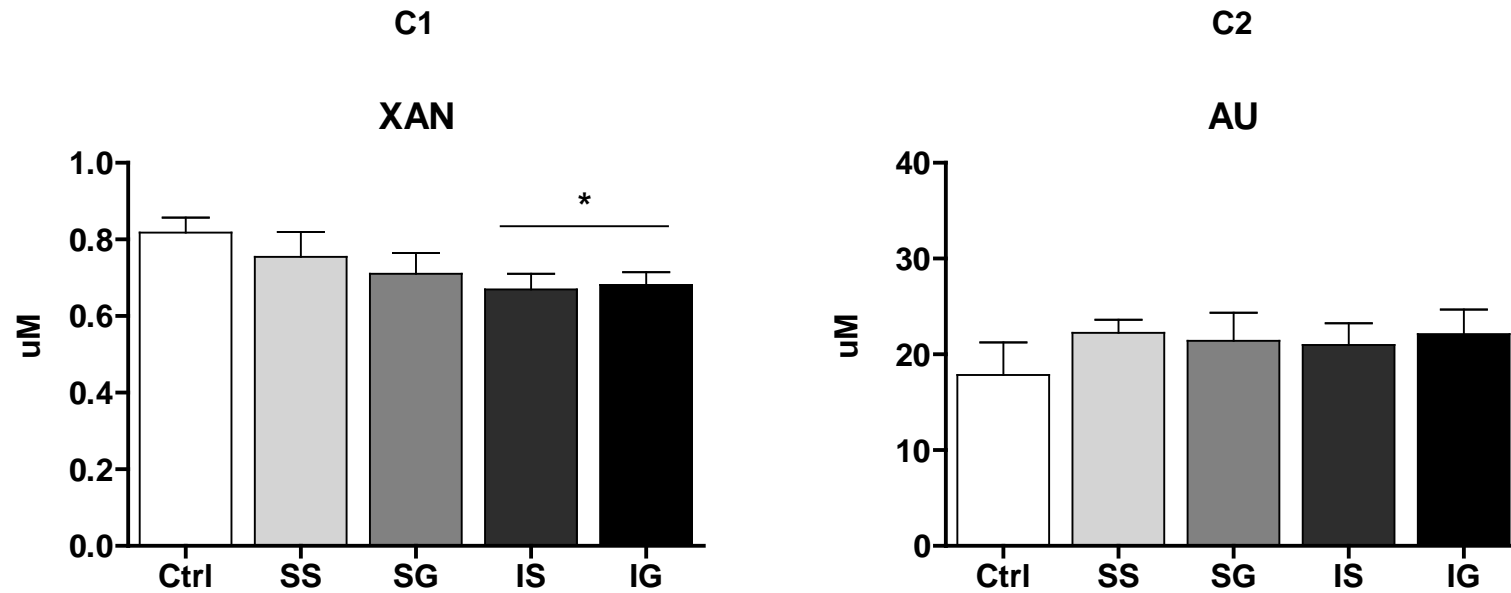
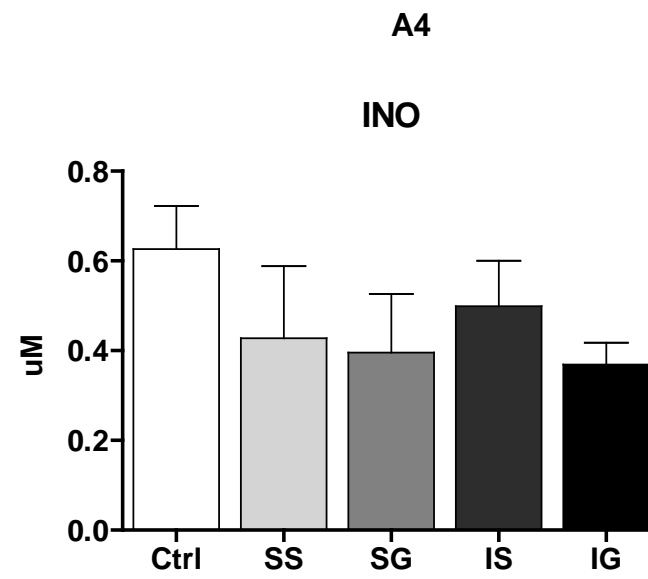
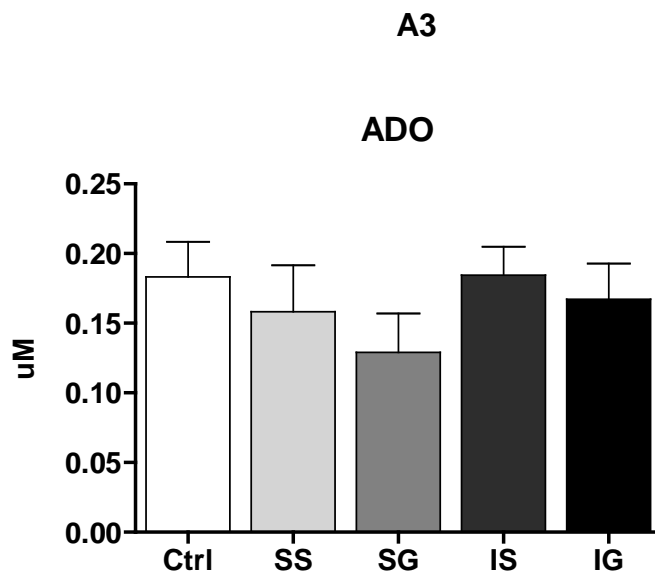
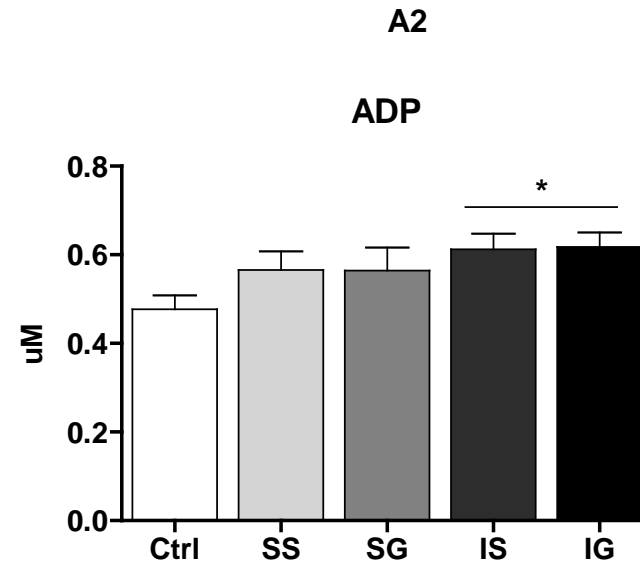
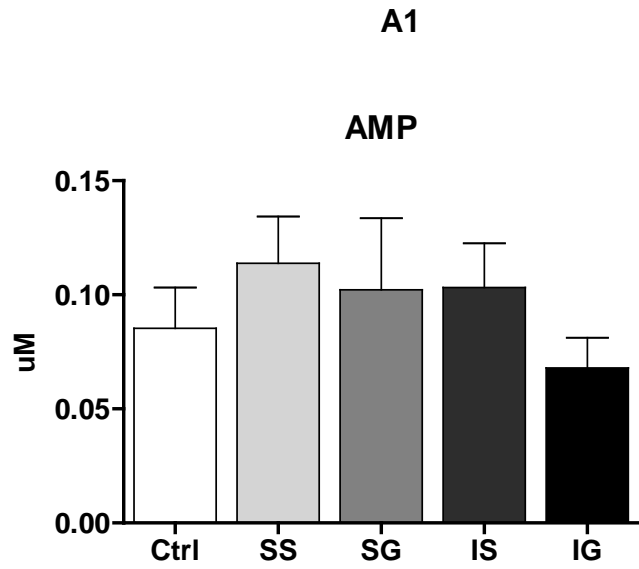
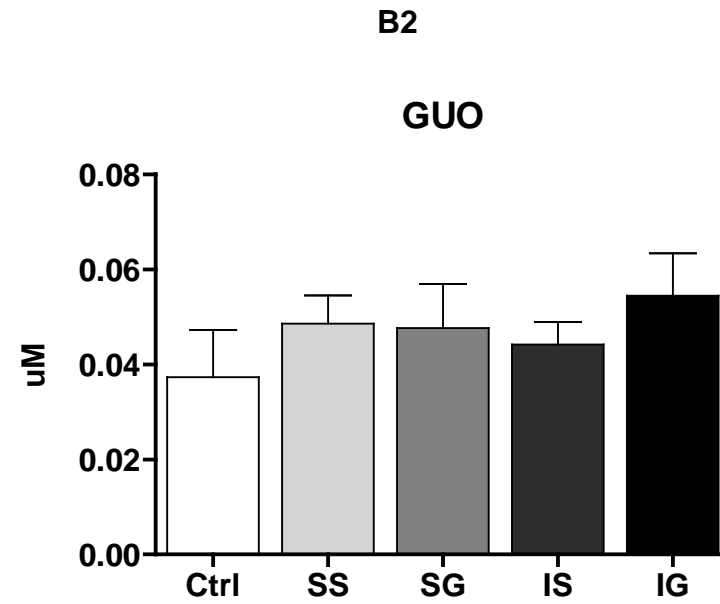
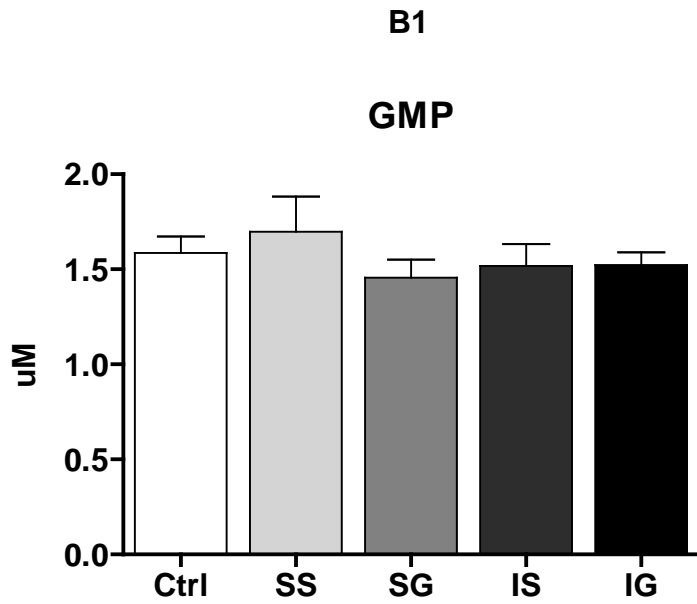
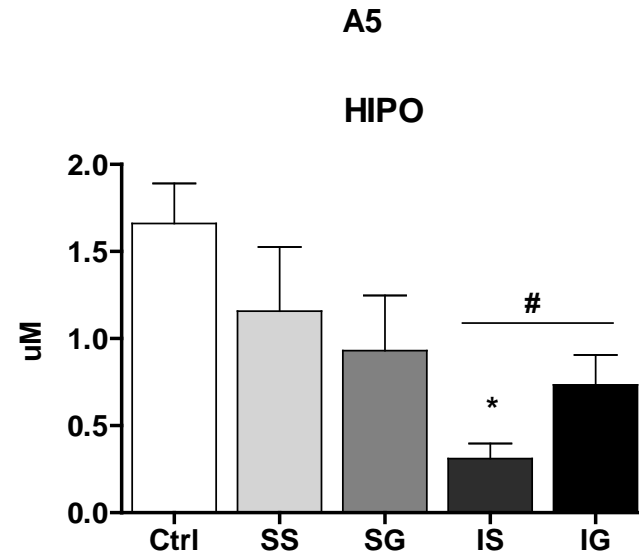


FIGURA 4 – Avaliação da concentração de purinas no plasma 24h após a indução de isquemia focal permanente (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os grupos analisados: Ctrl (controle), SS (sham salina), SG (sham guanósina), IS (isquemia salina) e IG (isquemia guanósina). Os dados representam média \pm erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste ANOVA de 1 (uma) via seguida do pós-teste de Tukey e após, comparados pelo teste ANOVA de 2 (duas) vias (fatores: lesão e tratamento) e pós-teste de Bonferroni. O número amostral (n) foi de 10 animais por grupo. **(A)** Derivados da adenina: **(A1)** ADP; **(A2)** ADO; **(A3)** INO; **(A4)** HIPO. **(B)** Derivados da guanina: **(B1)** GMP; **(B2)** GUO. **(C)** Produtos finais da degradação: **(C1)** XAN; **(C2)** AU. (* $p < 0,05$ em relação ao Ctrl; # $F_{1;36} = 5,23$; $p < 0,05$, sham vs isquêmicos).





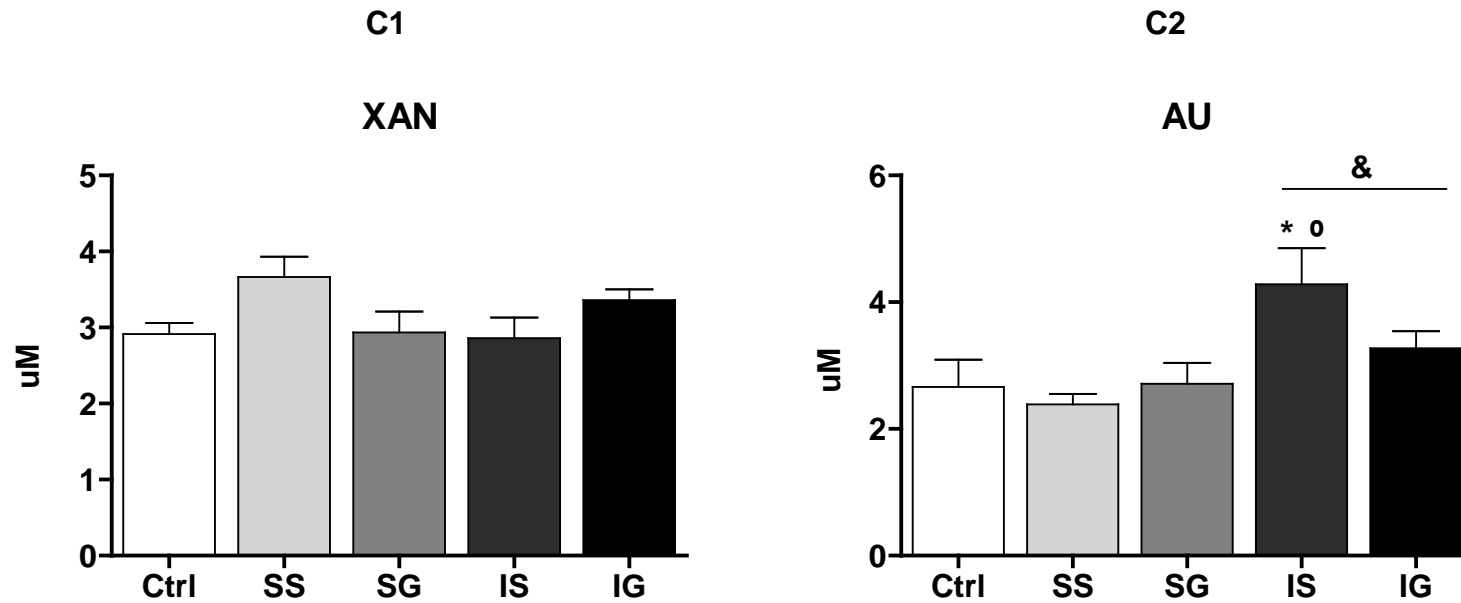


FIGURA 5 – Avaliação da concentração de purinas no liquor 24h após a indução de isquemia focal permanente (metodologia explicada na seção procedimentos metodológicos). Os grupos analisados: Ctrl (controle), SS (sham salina), SG (sham guanósina), IS (isquemia salina) e IG (isquemia guanósina). Os dados representam média \pm erro padrão. A dispersão dos dados de cada grupo foi analisada pelo teste estatístico de Barlett. Os grupos foram comparados pelo teste ANOVA de 1 (uma) via seguida do pós-teste de Tukey e após, comparados pelo teste ANOVA de 2 (duas) vias (fatores: lesão e tratamento) e pós-teste de Bonferroni. O número amostral (n) foi de 10 animais por grupo. **(A)** Derivados da adenina: **(A1)** ADP; **(A2)** AMP; **(A3)** ADO; **(A4)** INO; **(A5)** HIPO. **(B)** Derivados da guanina: **(B1)** GMP; **(B2)** GUO. **(C)** Produtos finais da degradação: **(C1)** XAN; **(C2)** AU. (* $p < 0,05$ em relação ao Ctrl; #F 1;36 = 5,73; $p < 0,05$, sham vs isquêmicos, +SS vs IS, $p < 0,05$; &F 1;36 = 7,41; $p < 0,05$, sham vs isquêmicos, °SS vs IS, $p < 0,05$).

9. Referências

Baird AE, Benfield A, Schlaug G, Siewert B, Lovblad KO, Edelman RR. Enlargement of human cerebral ischemic lesion volumes measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol.* 41, 581-9, 1997.

Barnstable CJ, Wei JY, Han MH. Modulation of synaptic function by cGMP and cGMP-gated cation channels. *Neurochem Int.* 45, 875-84, 2004.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 112, 358-404, 2006.

Braganhol E, Wink MR, Lenz G, Battastini AMO. Purinergic Signaling in Glioma Progression. J. Barańska (ed.), *Glioma Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology* 986, Chapter 5, 81-102, 2013.

Brouns R, De Deyn PP. Review The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 111, 483-495, 2009.

Burnstock G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin Med.* 2, 45-53, 2002.

Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev.* 58, 58-86, 2006.

Burnstock G. Introduction to Purinergic Signalling in the Brain. J. Barańska (ed.), *Glioma Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology* 986, Chapter 1, 1-12, 2013.

Caciagli F, Dilorio P, Giuliani P, Middlemiss PJ, Rathbone MP. The neuroprotective activity of guanosine involves the production of trophic factors and the outflow of purines from astrocytes. *Drug Dev Res.* 50:32, 2000.

Challert T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx.* 3, 497-504, 2006.

Chang R, Algird A, Bau C, Rathbone MP, Jiang S. Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo. *Neurosci Lett.* 431, 101-5, 2008.

Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest.*; 101, 1992-9, 1998.

Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol.* 6, 667-72, 1996.

Ciccarelli R, Dilorio P, D'Alimonte I, Giuliani P, Florio T. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia*. 9, 202–211, 2000.

Ciccarelli R, Ballerini P, Sabatino G, Rathbone MP, D'Onofrio M, Caciagli F, Dilorio P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int J Dev Neurosci*. 19, 395–414, 2001.

Dal-Cim T, Martins WC, Santos ARS, Tasca CI. Guanosine is neuroprotective against oxygen / glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance CA^{2+} -activated K^+ channels, phosphatidylinositol-3 kinase/ protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. *Neuroscience*. 183, 212–220, 2011.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 65, 1–105, 2001.

de Vasconcelos Dos Santos A, Reis JC, Paredes BD, Moraes L, Jasmin, Giraldo-Guimarães A, Mendez-Otero R. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Res*. 1306, 149–158, 2010.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 22, 391–7, 1999.

Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet*. 371, 1612-1623, 2008.

Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 87, 179–197, 2007.

FrizzoMES, Lara DR, Dahm KCS, Prokopiuk AS, Swanson R, Souza DO. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *NeuroReport*. 12, 79-881, 2001.

Frizzo MES, Lara DR, Prokopiuk AS, Vargas CR, Salbego CG, Wajner M, Souza DO. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 353-363, 2002.

FrizzoMES, Soares FAA, Dall'Onder LP, Lara DR, Swanson RA, Souza DO. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Research*. 972, 84–89, 2003.

Ganzella M, de Oliveira ED, Comassetto DD, Cechetti F, Cereser VH Jr, Moreira JD, Hansel G, Almeida RF, Ramos DB, Figueredo YN, Souza DG, Oses JP, Worm PV, Achaval M, Netto CA, Souza DO. Effects of chronic guanosine treatment on hippocampal damage and cognitive impairment of rats submitted to chronic cerebral hypoperfusion. *NeuroSci.* 33, 985-97, 2012.

Giuliani P, Ballerini P, Ciccarelli R, Buccella S, Romano S, D'Alimonte I, Poli A, Beraudi A, Peña E, Jiang S, Rathbone MP, Caciagli F, Di Iorio P. Tissue distribution and metabolism of guanosine in rats following intraperitoneal injection. *JBiolRegulHomeost Agents*.26, 51-65, 2012.

Gizurarson S. The relevance of nasal physiology to the design of drug absorption studies. *Advanced Drug Deliver.Reviews*.11, 329-347, 1993.

Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharm*.55, 363-389, 2008.

Gottfried C, Tramontina F, Gonçalves D, Gonçalves CA, Moriguchi E, Dias RD, Wofchuk ST, Souza DO. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev*. 123,1333-40, 2002.

Hazell AS. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem.Int*.50, 941–953, 2007.

Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 36, 557-65, 1994.

Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol*. 14, 89-94, 2001.

Illum L. Nasal drug delivery-Recent developments and future prospects. *Journal of Control. Release* .161, 254–263, 2012.

Illum L. Nasal drug delivery possibilities, problems and solutions. *J. Control. Release*. 87, 187–198, 2003.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Da Silva WC, Medina JH, Cammarota M. The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. *Neurotox Res*. 10, 113-21, 2006.

Jiang S, Ballerini P, Buccella S, Guiliani P, Jiang C, Huang X, Rathbone MP. Remyelination after chronic spinal cord injury is associated with proliferation of endogenous adult progenitor cells after systemic administration of guanosine. *Purinergic Signalling*. 4, 61–71, 2008.

Jiang S, Fischione G, Guiliani P, Romano S, Caciagli F, Di Iorio P. Metabolism and distribution of guanosine given intraperitoneally: implications for spinal cord injury. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*. 27, 673–680, 2008.

Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*. 179, 4-29, 2005.

Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*. 399(6738 Suppl): A7-14, 1999.

Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. 79, 1431-1568, 1999.

Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn HR. Rodent Stroke Model Guidelines for Preclinical Stroke Trials (1st Edition). *J Exp Stroke Transl Med*. 2, 2-27, 2009.

Lo EH. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol*. 153,396-405, 2008.

Macrae IM. Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *Br. J. Pharmacol*. 164, 1062-1078, 2011.

Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*. 2, 679-89, 2006.

Moretto MB, Boff B, Lavinsky D, Netto CA, Rocha JBT, Souza DO, Wofchuk ST. Importance of Schedule of Administration in the Therapeutic Efficacy of Guanosine: Early Intervention After Injury Enhances Glutamate Uptake in Model of Hypoxia-ischemia. *J. Mol. Neurosci*. 38,216-9, 2009.

Moretto MB, Arteni NS, Lavinsky D, Netto CA, Rocha JB, Souza DO, Wofchuk S. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. *Exp. Neurol.* 195, 400–406, 2005.

Oleskovicz SP, Martins WC, LealRB, TascaCI. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Int.* 52, 411-418, 2008.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *ProgNeurobiol.*54, 581-618, 1998.

Phan TG, Wright PM, Markus R, Howells DW, Davis SM, Donnan GA. Salvaging the ischemic penumbra: more than just reperfusion? *ClinExpPharmacolPhysiol.* 29, 1–10,2002.

Pimentel VC, Zanini D, Cardoso AM, Schmatz R, Bagatini MD, Gutierrez JM, Carvalho F, Gomes JL, Rubin M, Morsch VM, Moretto MB, Colino-Oliveira M, Sebastião AM, Schetinger MR. Hypoxia-ischemia alters nucleotide and nucleoside catabolism and Na⁺,K⁺-ATPase activity in the cerebral cortex of newborn rats. *Neurochem Res.* 38, 886-94, 2013.

Rathbone M, Pilutti L, Caciagli F, Jiang S. Neurotrophic effects of extracellular guanosine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.*27, 666-72, 2008.

Schmidt AP, Lara DR, Souza DO. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther.* 116, 401-16, 2007.

Schmidt AP, Böhmer AE, Leke R, Schallenberger C, Antunes C, Pereira MS, Wofchuk ST, Elisabetsky E, Souza DO. Antinociceptive effects of intracerebroventricular administration of guanine-based purines in mice: evidences for the mechanism of action. *Brain Res.* 9, 1234:50-8, 2008.

Schmidt AP, Tort AB, Silveira PP, Bohmer AE, Hansel G, Knorr L, et al. The NMDA antagonist MK-801 induces hyperalgesia and increases CSF excitatory amino acids in rats: reversal by guanosine. *Pharmacol Biochem Behav.* 91, 549-53, 2009.

Souza DO, Schmidt AP. The role of the guanine-based purinergic system in seizures and epilepsy. *Review. Open Neurosci. J.* 4, 102-113, 2010.

Swanson, R. A. Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab.* 10, 290-293, 1990.

Szele FG, Alexander C, Chesselet MF. Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *J. Neurosci.* 15, 4429-4448, 1995.

Taoufik E, Probert L. Ischemic neuronal damage. *Current Pharmaceutical Design*. 14, 3565-3573, 2008.

Taylor TN, Davis PH, Torner JC, Holmes J, Meyer JW, Jacobson MF. Lifetime cost of stroke in the United States. *Stroke*. 27, 1459-66, 1996.

Thauerer B, Nedden SZ, Baier-Bitterlich G. Purine nucleosides: endogenous neuroprotectants in hypoxic brain. *Journal of Neurochemistry*, 121, 329-342, 2012.

Thomazi AP, Boff B, Pires T, Godinho G, Battu C, Gottfried C, Souza DO, Salbego C, Wofchuk ST. Profile of glutamate and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: developmental aspects and protection by guanosine. *Brain Research*. 1188, 233-240, 2008.

Tingting LU, Yongjun JIANG, Zhiming ZHOU, Xuanye YUE, Ning WEI, Zhaoyao CHEN, Minmin MA, Gelin XU, and Xinfeng LIU. Intranasal Ginsenoside Rb1 Targets the Brain and Ameliorates Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1319-1324, 2011.

Tzingounis AV, Wadiche JI. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci*. 8, 935-47, 2007.

Uemura Y, Miller JM, Matson WR, Beal MF. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke*. 22, 1548-53, 1991.

Vinadé ER, Schmidt AP, Frizzo ME, Portela LV, Soares FA, Schwalm FD, Elisabetsky E, Izquierdo I, Souza DO. Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. *J Neurosci.Res.*79, 2482-2453, 2005.

Warlow CP. Epidemiology of stroke. *Lancet.*, 352, S111–4,1998.

Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *BiochimBiophysActa.*1783, 673-94, 2008.