



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

**CARACTERIZAÇÃO DA MORTE CELULAR E EFEITOS SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO APÓS O TRATAMENTO COM ÁCIDO FÓLICO  
EM ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL**

**Bruna Ferrary Deniz**

Porto Alegre

2014

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

**CARACTERIZAÇÃO DA MORTE CELULAR E EFEITOS SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO APÓS O TRATAMENTO COM ÁCIDO FÓLICO  
EM ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL**

**Bruna Ferrary Deniz**

**Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do título de Mestre em Neurociências  
pelo Programa de Pós-graduação em  
Neurociências da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lenir Orlandi Pereira Silva**

Porto Alegre

2014

*“Uma vitória sem luta é uma conquista sem glória”*

(autor desconhecido)

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Lenir, por todo apoio, paciência, dedicação e compreensão. Por ser uma entusiasta do trabalho, sempre me fazendo ver os pontos positivos de todo o caminho que percorri até aqui.

Aos professores Fábio Klamt, Maria Cristina e Marilda Fernandes pela colaboração e disponibilidade em tornarem esse trabalho possível.

Às queridíssimas Carol Müller, Teresinha e Rosalva pelo apoio, muito trabalho e momentos muito divertidos, me fazendo sentir parte do grupo na Fundação.

À Sílvia e Patrícia por toda ajuda ao longo desse trabalho, sempre me acompanhando desde o TCC.

Ao melhor grupo de mundo, meu amado LG: Josi, Cla, Ramiro, Jaque, Pati, Iohanna e Micheli pelos melhores momentos sempre, por tornarem trabalhar algo fácil, por agüentarem os desabafos e comemorarem as alegrias. Sem vocês esse trabalho não aconteceria. Amo vocês!

Aos não só colegas, mas amigos que a neuro me deu: Ana, Marina, Rossana, Johanna e Fabrício, por tornarem a caminhada muito mais divertida!

Ao Felipe e à Renata, amigos, companheiros e incentivadores. Obrigada por tudo meus queridos, meus geógrafos preferidos!

Às minhas grandes amigas, irmãs que sempre entenderam minha ausência e sempre me incentivaram a ir em busca dos meus sonhos: Marina, Gabi, Ula, Jessi, Sandra, Fabi, Mirian, Vanessa e Fernanda

À minha família, a melhor de todas, meu porto seguro, aqueles que nunca me abandonam e que sempre me apoiaram. Vocês tornaram todos os meus sonhos possíveis e me deram a melhor vida que eu podia ter, sempre repleta de amor e carinho! Muitas vezes deixaram seus sonhos de lado para que eu pudesse realizar os meus. Sem vocês eu não seria nada, nem ninguém. Amo vocês demais, Paulo, Sandra e Desiree!

Por fim, àquele que muitas vezes trabalhou comigo, sempre corrigiu meus trabalhos, criticou, apoiou, incentivou e sempre acreditou em mim. Tu me fizeste ver e viver a vida de uma maneira mais leve. Te amo demais meu preto, Daniel!

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	8
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabela.....	11
Resumo.....	12
Abstract.....	14
1. Introdução.....	16
1.1 Hipóxia-isquemia encefálica neonatal.....	16
1.2 O modelo animal de hipóxia-isquemia–Levine modificado por Rice et al..	19
1.3 Ácido fólico.....	24
2. Objetivo Geral.....	28
2.1 Objetivos específicos do experimento 1.....	28
2.2 Objetivo específico do experimento 2.....	28
3. Experimento 1 – <i>“Cell death in the CA1 region of the hippocampus 24 hours after neonatal hypoxia-ischemia: folic acid effects”</i> .....	29
4. Experimento 2.....	70
4.1 Material e métodos.....	70
4.1.1 Animais.....	70
4.1.2 Hipóxia-isquemia.....	71
4.1.3 Tratamento agudo com ácido fólico.....	71
4.1.4 Análises comportamentais.....	72
Aversão à queda.....	72
Endireitamento.....	73
Geotaxia negativa.....	73
Locomoção.....	73
Comportamento Olfatório.....	73

4.1.5 Análise estatística.....	74
4.2 Resultados.....	74
4.3 Discussão.....	84
5. Discussão geral.....	86
6. Conclusão.....	90
7. Perspectivas.....	91
8. Referências bibliográficas.....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Ácido Fólico
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
CA1	Subcampo 1 do Corno de Amon
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CAD	DNase Ativada por Caspase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPN	Dia Pós-natal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HI	Hipóxia-isquemia
Mg <sup>2+</sup>	Íon magnésio
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
RL	Radicais Livres
RNA	Ácido Ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Patogênese da hipóxia-isquemia neonatal.....	19
<b>Figura 2.</b> Modelo de Levine-Rice (1981). Indução de Hipóxia-isquemia Neonatal.....	20
<b>Figura 3.</b> Eletromicrografias de células em degeneração no neocórtex cerebral após a hipóxia-isquemia neonatal.....	24
<b>Experimento 1</b>	
<b>Figure 1.</b> Photomicrography of immunohistochemistry in the right hippocampus (ipsilateral to arterial occlusion).....	60
<b>Figure 2.</b> Immunohistochemistry – Number of caspase-3 positive cells in the dorsal hippocampus.....	61
<b>Figure 3.</b> Photomicrographs of cell quantification in the right hippocampus (ipsilateral to arterial occlusion).....	62
<b>Figure 4.</b> Cell density – Number of cells.....	63
<b>Figure 5.</b> Electron micrographs of the right hippocampus of control treated with saline group.....	64
<b>Figure 6.</b> Electron micrographs of the right hippocampus of control treated with folic acid group.....	65
<b>Figure 7.</b> Electron micrographs of the right hippocampus of hipóxia-ischemia treated with saline group.....	66

**Figure 8.** Electron micrographs of the right hippocampus of hipóxia-ischemia treated with folic acid group.....67

## **Experimento 2**

**Figura 1. Aversão à queda 1** - Latência para se locomover em sentido contrário à borda da mesa.....75

**Figura 2. Endireitamento 1** - Latência para saírem da posição de decúbito dorsal para ventral, com as quatro patas no chão.....75

**Figura 3. Geotaxia 1** - Latência para se locomover em sentido contrário ao solo.....76

**Figura 4. Locomoção 1** – Latência para sair do círculo com as quatro patas.76

**Figura 5. Comportamento Olfatório** - Latência para direcionar-se à maravalha da caixa-moradia.....77

**Figura 6. Aversão à queda 2** - Latência para se locomover em sentido contrário à borda da mesa.....78

**Figura 7. Geotaxia 2** - Latência para se locomover em sentido contrário ao solo.....79

**Figura 8. Endireitamento 2** - Latência para sair da posição de decúbito dorsal para ventral, com as quatro patas no chão.....80

**Figura 9. Locomoção 2** - Latência para sair do círculo com as quatro patas..81

## LISTA DE TABELA

<b>Table 1</b> – Comparison of ultrastructural characteristics between groups.....	68
--	----

## RESUMO

A hipóxia-isquemia (HI) encefálica neonatal causa diversas seqüelas motoras e cognitivas permanentes devido à grande degeneração celular que ocorre no encéfalo dos neonatos. Esse dano é progressivo e gera atrofias visíveis em diversas estruturas encefálicas, principalmente hipocampo, estriado e córtex cerebral. Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa mostrou que o tratamento com ácido fólico (AF) reverteu o déficit cognitivo e a diminuição da atividade da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, em ratos submetidos à HI neonatal. Assim, buscando compreender melhor a possível eficácia do ácido fólico em tratar e/ou prevenir o dano causado pela HI neonatal, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com ácido fólico na degeneração celular na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas após o evento lesivo e em diferentes marcos do desenvolvimento de animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal. Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos que foram submetidos ao modelo de Levine-Rice no 7º dia de vida pós-natal, sendo divididos em quatro grupos experimentais: 1) controle tratado com salina (CTS); 2) controle tratado com ácido fólico (CTAF); 3) HI tratado com salina (HIS); 4) HI tratado com ácido fólico (HIAF). Os animais receberam uma dose intraperitoneal de AF (0,011 µmol/g de peso corporal) 24 horas antes, imediatamente antes e 24 horas após a HI ou, diariamente, até o 14º DPN. Não foram encontradas diferenças na quantificação de células imunomarcadas para caspase-3 clivada pela técnica de imunistoquímica, porém na avaliação da densidade celular observou-se uma diminuição de células no grupo HIS

quando comparado com os grupos CTAF e HIAF no hipocampo direito. Tanto na análise qualitativa quanto quantitativa da ultraestrutura dos neurônios piramidais da região CA1 hipocampal também foi possível encontrar uma importante degeneração celular nos grupos submetidos à HI neonatal, predominantemente caracterizada pelo padrão necrótico, porém no grupo tratado com AF essa degeneração foi menos expressiva. Quanto aos marcos do desenvolvimento, não verificou-se diferença nem pela lesão nem pelo tratamento. A partir desse estudo, portanto, podemos concluir que 24h após a HI ocorre diminuição da densidade celular e evidente processo lesivo ao tecido hipocampal, mais expressivamente por necrose. Ainda, a suplementação com ácido fólico foi capaz de reduzir e/ou prevenir o dano celular na região CA1 do hipocampo ipsilateral à oclusão arterial.

**Palavras-chave:** Hipóxia-isquemia, ácido fólico, marcos do desenvolvimento, degeneração celular.

## ABSTRACT

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) causes diverse permanent motor and cognitive sequelae due to extensive cellular degeneration that occurs in the brain of neonates. This damage is progressive and generates visible atrophy in several brain structures, particularly the hippocampus, cerebral cortex and striatum. A recent study from our research group demonstrated that treatment with folic acid (FA) reversed cognitive deficits and decreased activity of the enzyme  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in rats submitted to neonatal HI. Thus, in order to better understand the possible effectiveness of folic acid in recovering and / or preventing the damage caused by neonatal HI, the aim of this study was to evaluate the effects of treatment with folic acid on cell degeneration in the CA1 region of the dorsal hippocampus 24 hours after neonatal hypoxia-ischemia and at different developmental milestones of animals submitted to neonatal hypoxia-ischemia. Wistar rats of both sexes were submitted to the Levine - Rice model on the 7th postnatal day, being divided into four experimental groups: 1) control treated with saline (CTS); 2) control treated with folic acid (CTAF); 3) HI treated with saline (HIS) 4) HI treated with folic acid (HIAF). Animals received an intraperitoneal dose of FA ( $0.011\mu\text{mol/g}$  of body weight) 24 hours before, immediately before and 24 hours after the HI. No differences were found in the quantification of positive cells for cleaved caspase-3 by immunohistochemistry, but in the assessment of cell density was observed a decrease of cells in the HIS group when compared with the CTFA and HIFA groups in the right hippocampus. In the analysis of the ultrastructure of pyramidal neurons of the

hippocampal CA1 region was also possible to find an important cellular degeneration in the groups subjected to neonatal HI, predominantly characterized by necrotic pattern, but in the group treated with FA this degeneration was less expressive. As for developmental milestones, no significant difference was observed either by injury or by treatment. Concluding, 24 hours after HI occurs decreased cell density and evident degeneration process to hippocampal tissue, most significantly with death by necrosis. Yet, supplementation with folic acid was able to reduce and / or prevent cell damage in the CA1 region of the hippocampus ipsilateral to the arterial occlusion.

**KEYWORDS:** hypoxia-ischemia, folic acid, developmental milestones, cellular degeneration.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Hipóxia-isquemia encefálica neonatal:

A hipóxia-isquemia encefálica (HI) neonatal é uma condição clínica comum que ocorre em 1,5 a cada 1000 nascidos vivos. Desses, 15 a 20% irá falecer no período pós-natal e em torno de 25% terá seqüelas permanentes (Kurinczuk et al., 2010). As seqüelas mais comuns que ocorrem após a HI neonatal são: déficits cognitivos e de aprendizado, paralisia cerebral, problemas de coordenação motora e de motricidade ampla (Mwaniki et al., 2012). Inúmeras causas podem ser atribuídas à HI, tais como: prematuridade do neonato, dificuldades da expulsão e sofrimento do feto, desnutrição, interrupção do fluxo sangüíneo umbilical e insuficiente troca de gases pela placenta (Procianoy & Silveira, 2001).

Os principais mecanismos responsáveis pela cascata de eventos prejudiciais após a HI neonatal são: excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo e inflamação (McLean & Ferriero, 2004) (Fig. 1). Durante a isquemia, ocorre uma privação de glicose para o sistema nervoso central (SNC), o que gerará uma falência energética ao tecido devido à falta de adenosina trifosfato (ATP). Essa falta de energia culmina na falha da função da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase que leva à despolarização dos neurônios e a um aumento intracelular de sódio e água, causando edema citotóxico e/ou lise celular seguida de reação inflamatória com liberação de citocinas. A despolarização neuronal também causa uma maior liberação de glutamato (Distefano & Praticò, 2010).

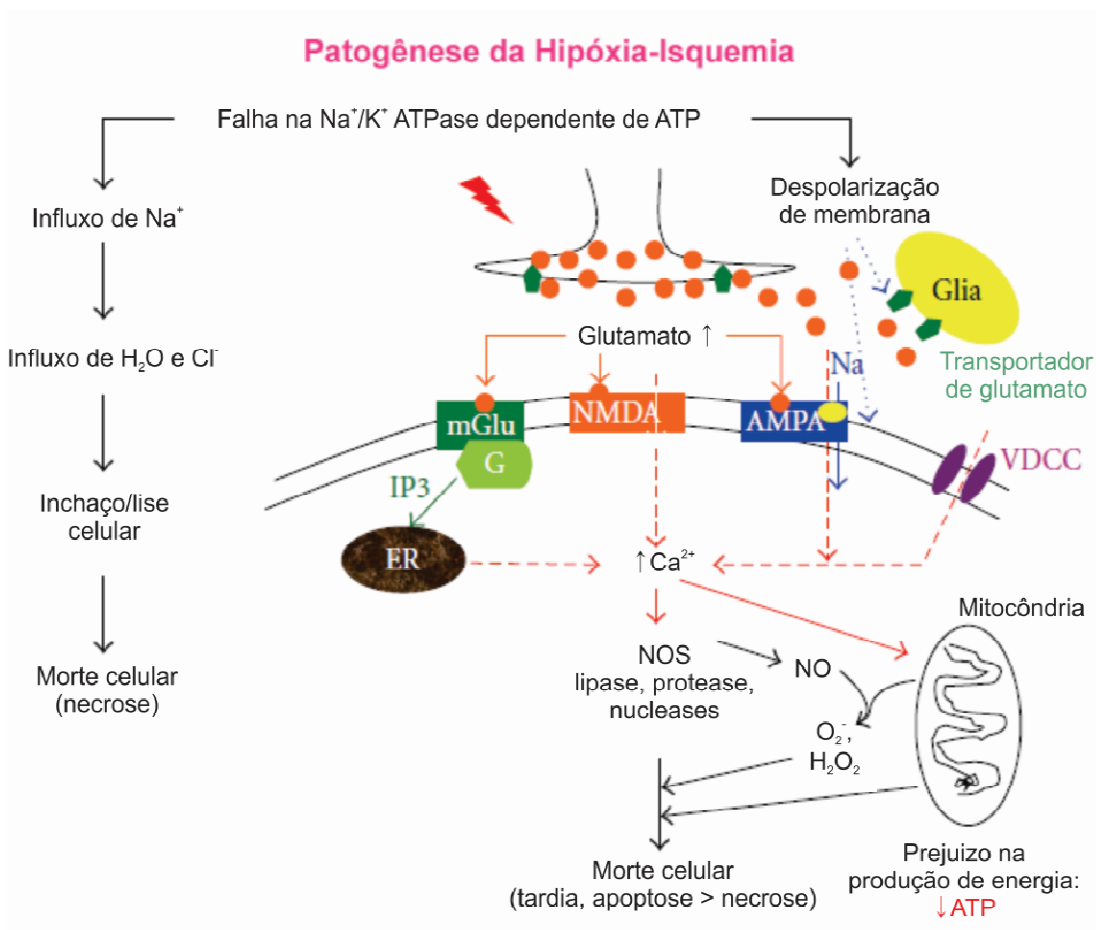


Como os transportadores de glutamato que realizam a sua recaptação são dependentes de energia, eles sofrerão uma disfunção com diminuição da sua atividade após a isquemia. Com isso, ocorrerá um aumento da concentração do neurotransmissor na fenda sináptica que poderá ser prejudicial ao superestimular seus receptores pós-sinápticos, principalmente o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (McLean & Ferriero, 2004). A superestimulação desses receptores leva a um aumento excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio intracelular que ativa várias enzimas endocelulares, como proteases e fosfolipases. As proteases irão degradar, por exemplo, os neurofilamentos, determinando a ruptura do citoesqueleto, com desintegração do corpo celular; as fosfolipases irão hidrolisar os fosfolipídios, danificando as membranas das células e liberando ácido araquidônico, levando à produção de prostaglandinas vasodilatadoras que darão início a fase de reperfusão. Durante esses processos também poderá ocorrer liberação de enzimas tóxicas às células vizinhas, aumentando a morte celular e a perda do tecido cerebral (McLean & Ferriero, 2004; Distefano & Praticò, 2010).

Sabe-se que o encéfalo de um neonato é mais suscetível ao dano oxidativo devido há uma maior concentração de lipídios polinsaturados (facilmente oxidáveis), ferro livre e defesas antioxidantes imaturas (McLean & Ferriero, 2004; Siegel, 2006). Além disso, durante o desenvolvimento os receptores NMDA, responsáveis pelo influxo de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) estão superexpressos quando comparado com adultos e, segundo McLean & Ferriero (2004), as subunidades que os compõem nos neonatos

permitem um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mais prolongado e pronunciado (McLean & Ferriero, 2004; Siegel, 2006).

A formação excessiva de radicais livres (RL) após a hipóxia-isquemia neonatal leva à peroxidação de lipídeos de membrana e disfunção de canais iônicos. Ao mesmo tempo, ocorre dano às junções de oclusão que causam ruptura na integridade da barreira hematoencefálica, levando a um edema intersticial-vasogênico que piora o dano cerebral (Distefano & Praticò, 2010). Os radicais livres também ativam as células endoteliais, induzindo à liberação de adesinas e quimiocinas, gerando um acúmulo de neutrófilos e plaquetas nas artérias, alterando o fluxo sanguíneo cerebral e causando um segundo processo de necrose isquêmica. Os radicais livres também levam à ativação do sistema enzimático de caspases, resultando na liberação do citocromo c, devido ao dano oxidativo mitocondrial, e indução de genes pró-apoptóticos (Distefano & Praticò, 2010). Quando as caspases de execução (caspase-3 e 6) são ativadas, elas quebram as proteínas-quinases envolvidas na adesão celular, as laminas que formam a camada interna do envelope nuclear, a actina e outras proteínas necessárias para a estrutura celular e as enzimas de reparo de DNA. Também clivam uma proteína inibidora da endonuclease CAD (DNase ativada por caspase) e com a destruição do envelope nuclear, as endonucleases adicionais (dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) também se tornam ativadas. A caspase-3, em especial, ativa uma DNase citoplasmática que resulta na clivagem internucleossômica característica do DNA (Elmore, 2007; Robbins, 2008).

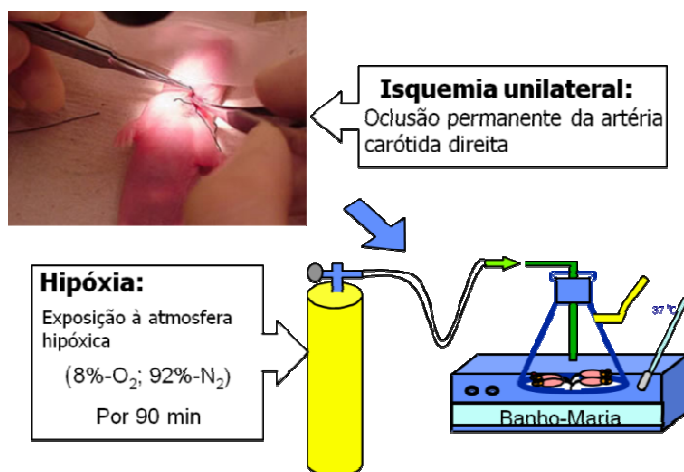


**Figura 1.** Patogênese da hipóxia-isquemia neonatal. São mostrados os papéis centrais da diminuição de ATP, despolarização, ativação de canais, influxo de íons, liberação de radicais livres e morte celular (*Adaptado de LAI & YANG, 2011*). AMPA: α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato; ER: retículo endoplasmático; mGlu: receptor metabotrópico de glutamato; NMDA: N-metil-D-aspartato; NOS: óxido nítrico sintase; VDCC: canais de cálcio dependentes de voltagem.

## 1.2 O Modelo Animal de Hipóxia-Isquemia – Levine modificado por Rice et al.

Para o estudo da neuropatologia da hipóxia-isquemia neonatal, o modelo de Levine (1960) modificado por Rice et al. (1981) tem sido amplamente utilizado, pois reproduz a lesão unilateral no hipocampo, estriado e córtex

cerebral encontrada nos recém-nascidos no hemisfério ipsilateral à oclusão arterial (Pereira et al., 2007). Ele consiste na oclusão unilateral da artéria carótida comum dos animais no 7<sup>o</sup> dia de vida pós-natal com posterior exposição a ambiente hipóxico (Fig. 2).



**Figura 2.** Modelo de Levine-Rice (1981). Indução de Hipóxia Isquemia Neonatal, com associação da isquemia unilateral com a exposição à atmosfera hipóxica.

Sabe-se que o encéfalo dos ratos com 7 dias de vida é histologicamente similar ao de crianças recém-nascidas (Sanders et al., 2005), permitindo que as alterações morfológicas, bioquímicas e cognitivas encontradas nos humanos sejam reproduzidas (Arteni et al., 2003; Ikeda et al., 2008). Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa essas alterações já foram demonstradas, como: déficit na memória espacial no labirinto aquático de Morris em ratos adolescentes e adultos submetidos à HI neonatal (Pereira et al., 2007; Pereira et al., 2008), na memória aversiva no teste da esQUIVA inibitória (Arteni et al., 2003) e também na memória de reconhecimento no teste de reconhecimento de objetos (Pereira et al., 2008).

Além desses déficits cognitivos conseqüentes à HI, observam-se também alteração nos chamados marcos do desenvolvimento de roedores. Esses marcos indicam a maturação dos reflexos neurológicos e possíveis alterações motoras. Alguns estudos já vêm avaliando esses reflexos e têm demonstrado que logo após a HI neonatal, os animais apresentam alterações no aparecimento desses reflexos ou desempenho piorado (Lubics et al., 2005). Bona e colaboradores (1997) mostraram que os animais hipóxico-isquêmicos apresentaram um posicionamento assimétrico dos membros no teste de *foot-fault* e um prejuízo da função motora no teste de reflexo postural. Ainda, Sanches e colaboradores (2012) associaram a desnutrição com a HI neonatal e observaram que após o procedimento da HI, os animais apresentaram déficits no reflexo de endireitamento e no comportamento olfatório. É importante considerar a necessidade da avaliação funcional em neonatos como um importante valor preditivo para as funções cognitivas e comportamentais (Bona et al., 1997; Lubics et al., 2005).

Também já foram evidenciadas alterações bioquímicas após a lesão hipóxico-isquêmica neonatal (Weis et al., 2011), bem como a diminuição no volume hipocampal e na área estriatal (Pereira et al., 2008). Esta perda tecidual relatada é condizente com a presença de morte celular no tecido após a HI. Resultados de estudos morfológicos, histoquímicos e moleculares indicam que tanto mecanismos apoptóticos quanto necróticos levam à morte neuronal após a hipóxia-isquemia encefálica em diferentes modelos animais (Nakajima et al., 2000). Sabe-se que a maturidade do encéfalo, os subtipos de receptores de

glutamato e o modelo aplicado influenciam o modo e a velocidade da morte celular (Sheldon et al., 2001; Northington et al., 2011).

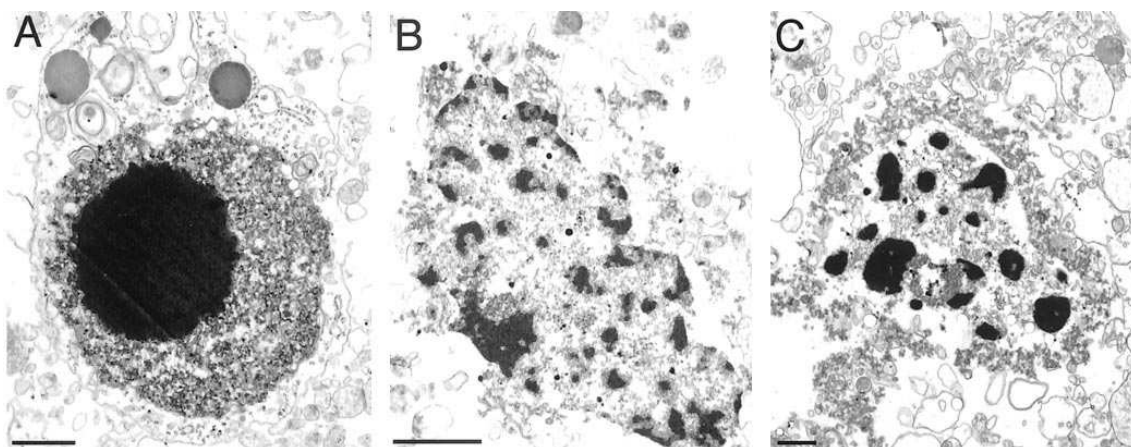
A apoptose ocorre em diversas situações, como na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia de órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano por agentes tóxicos (Grivicich *et al.*, 2007). É caracterizada por uma seqüência de eventos dependentes de energia regulada por meio da qual uma célula se autodestrói. Ocorre retração da célula, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo. A membrana celular forma bolhas (extrusões) e a célula se quebra em vesículas circundadas por membranas (corpos apoptóticos), contendo quantidades variadas de citoplasma, organelas e fragmentos de ácido desoxirribonucléico (DNA).

Já o processo necrótico ocorre quando há uma perturbação abrupta do ambiente celular envolvendo a perda da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e enzimas associadas (ex.: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase), com rápido aumento dos níveis intracelulares de íons, como o Ca<sup>2+</sup> e o Na<sup>+</sup>, e água, dano mitocondrial e colapso energético que culminarão na desintegração celular (Edinger and Thompson, 2004). Há um aumento no volume celular e as membranas celulares são fragmentadas, permitindo o extravasamento do conteúdo citoplasmático que é seguido pela inflamação do tecido adjacente. O núcleo sofre uma série de alterações como a picnose (intensa condensação da cromatina), a coriorrexe (fragmentação do núcleo) e a cariólise (núcleo dissolvido). Na mitocôndria pode ocorrer a contração ou a condensação da membrana interna, lise das cristas e desintegração. Há um aumento dos

ribossomos livres no citoplasma (aparência densa e granular) devido à dissociação dos polirribossomos e o desprendimento dos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso. Este, por sua vez, pode sofrer dilatação, fragmentação ou vesiculação de suas cisternas, bem como as cisternas do complexo de Golgi. Pode ocorrer o processo de *blebbing* na membrana plasmática, que são como dilatações em forma de bolhas (Edinger and Thompson, 2004; Robbins, 2000).

Muitos autores afirmam que inicialmente ocorre uma morte celular por necrose na região central da isquemia e que há uma morte tardia por apoptose na região de penumbra (Nakajima et al., 2000; Sheldon et al., 2001; Northington et al., 2001; Yuan et al., 2003; Ferrer & Planas, 2003; Hossain, 2008). No entanto, estudos utilizando microscopia eletrônica descrevem células que apresentam tanto características necróticas quanto apoptóticas, que foram classificadas com um “continuum apoptose-necrose” ou “parapoptose” (Sheldon et al., 2001; Liu et al., 2004). Esse “continuum” é característico na isquemia em neonatos, não sendo tão encontrado em adultos (Fig. 3). Em concordância, Nakajima e colaboradores (2000) apontaram em seu estudo a coexistência de apoptose e necrose, indicando que uma não excluiria a outra, e que, possivelmente há uma sinalização comum no microambiente extracelular para ativar esses dois tipos de morte celular. Esses mesmos autores também descreveram que no centro da lesão ocorre necrose, porém acreditam (de acordo com seus resultados) que também há apoptose na área isquêmica, no entanto devido a sua meia-vida menor ela é subestimada. Uma melhor compreensão do processo de morte celular na encefalopatia hipóxico-

isquêmica viabiliza estabelecer também possibilidades terapêuticas. Por exemplo, como a apoptose segue por vários dias no córtex cerebral, estriado e região CA1 do hipocampo, esse dano progressivo pode servir como busca de estratégias neuroprotetoras devido a sua maior “janela terapêutica” quando comparado com a necrose (Nakajima et al., 2000; Hossain, 2008).



**Figura 3.** Eletromicrografias de neurônios em degeneração no neocórtex cerebral de ratos 48 horas após a hipóxia-isquemia neonatal, realizada no sétimo dia de vida pós-natal. (A) Neurônio apoptótico com um grande corpo apoptótico que inclui cromatina condensada. (B) Neurônio necrótico com grumos de cromatina dispersos e membranas nucleares e plasmáticas rompidas. (C) Neurônio híbrido com características apoptóticas e necróticas. Escala = 1 $\mu$ m (Adaptado de Johnston et al., 2001).

### 1.3 O Ácido Fólico

O folato é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, recebendo essa nomenclatura quando em sua forma natural e denominado ácido fólico quando se tratar da forma sintética. É um nutriente essencial da dieta não sintetizado pelos humanos, por isso deve ser adquirido através da dieta com o consumo de, principalmente, feijão, ervilha, lentilha, laranja, produtos de trigo integral, fígado, aspargos, beterraba, brócolis e espinafre. (Meshkin & Blum, 2007).



Entre as suas funções, encontram-se: metilação da homocisteína e participação no metabolismo de um-carbono (Mattson and Shea, 2003; Blom and Smulders, 2011). Foi encontrado pela primeira vez em alimentos com fungos, tendo efeito benéfico no tratamento da anemia megaloblástica (Féliz, 2002; Ferreira, 2005).

A forma natural é composta por um anel pteridínico, PABA (ácido para amino benzóico) e uma cauda com 1 a 6 moléculas de ácido glutâmico. Quanto maior for a quantidade de ácido glutâmico na cauda, menor é a disponibilidade do nutriente, pois tem que ser hidrolisado a monoglutamato para ser transportado (Féliz, 2002; Blom & Smulders, 2011) . A forma sintética é monoglutâmica, possuindo melhor absorção que o folato. Ao ser absorvido é reduzido a tetrahydrofolato (THF) que é o composto ativo encontrado no soro e nos tecidos (Féliz, 2002). A absorção do folato se dá, principalmente no primeiro terço do intestino delgado por processo ativo saturável, dependente de pH e sódio. Não há um grande reserva desse nutriente no organismo, sendo esta de 5 a 10 mg, metade encontrada no fígado na forma de poliglutamato. A excreção, tanto das formas metabolicamente ativas quanto das inativas, se dá pelas vias urinárias e biliares (Ferreira, 2005). O transporte do folato através das membranas se dá por 3 diferentes sistemas: carregador de folato reduzido, endocitose por receptores de folato e exportação celular ativa (Hyland, 2010).

A deficiência de folato é fortemente relacionada com defeitos na formação do tubo neural, por isso a RDA (Recommended Dietary Allowances) determina a ingestão de 400 µg/dia antes da gestação e até o 3º mês desta. O mecanismo de como o ácido fólico inibe os defeitos na formação do tubo neural

ainda é desconhecido. A prevenção pode ser feita através da dieta, suplementação com polivitamínicos e fortificação de alimentos (Ferreira, 2005; Oliveira, 2008). Em 1998, o FDA (Food and Drug Administration) determinou o enriquecimento de cereais e todas as farinhas com 140 µg de ácido fólico/ 100 g de farinha de trigo. Somente em 2002, através da resolução RDC 344, que o governo brasileiro obrigou todos os fabricantes de farinha de trigo e milho a adicionarem ferro e ácido fólico numa concentração mínima de 150 µg de ácido fólico por 100 g de farinha. E, ainda, os rótulos dos produtos devem conter a expressão: enriquecido, fortificado ou rico em ácido fólico (Ferreira, 2005).

A deficiência de folato também já foi relacionada com o desenvolvimento de aterosclerose e doença vascular cerebral e cardíaca (Barp, 2007). Já a sua suplementação foi associada à prevenção de eventos isquêmicos (Assaneli *et al.*, 2004), doença de Alzheimer (Mattson & Shea, 2003) e danos oxidativos causados pela homocisteinemia (Matté *et al.*, 2007).

Alguns estudos também já apontaram o potencial antioxidante do ácido fólico, não só por meio da participação do metabolismo da homocisteína, mas também na remoção de radicais livres (Joshi *et al.*, 2001; Stanger & Wonisch, 2012). Outros estudos também evidenciaram um possível papel antiapoptótico da suplementação de folato, onde foi observado diminuição da atividade da caspase-3 e degeneração celular (Jia *et al.*, 2008; Majumdar *et al.*, 2012). Também encontrou-se efeito do ácido fólico na diferenciação de células tronco embrionárias (Jia *et al.*, 2008), bem como na neurogênese hipocampal após um modelo de isquemia cerebral (Zhang *et al.*, 2012).

Considerando os efeitos preventivos que a suplementação com ácido fólico mostrou em diversas patologias e também seu mecanismo de ação, nosso grupo de pesquisa ponderou sobre seu possível efeito na hipóxia-isquemia encefálica neonatal. Em um já estudo publicado pelo grupo, evidenciou-se os efeitos benéficos do tratamento com ácido fólico na hipóxia-isquemia encefálica neonatal, onde foram observados melhora na memória aversiva associada à reversão da inibição da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase no córtex cerebral e estriado de ratos adultos submetidos à HI neonatal (Carletti et al., 2012).

A hipóxia-isquemia encefálica neonatal gera seqüelas graves e permanentes em um número relativamente alto de crianças todos os anos, alterando suas qualidades de vida e de suas famílias, além de gerar um alto investimento em terapias. Com isso, torna-se de grande importância conhecer profundamente os mecanismos que levam a esses déficits para entender melhor a patologia e permitir a busca de tratamentos mais eficazes que poderão amenizar ou prevenir as seqüelas geradas por esse evento lesivo. A suplementação com ácido fólico já é bastante usual em mulheres grávidas, por evitar defeitos no fechamento do tubo neural, bem como na população em geral, através de produtos farináceos, evitando uma série de doenças relacionadas ao aumento dos níveis de homocisteína no plasma. Considerando o potencial preventivo já apresentado pelo ácido fólico, sua suplementação poderia intervir na cascata da fisiopatologia da hipóxia-isquemia neonatal, diminuindo/prevenindo o dano causado por esse evento lesivo.

## **2. OBJETIVO GERAL:**

O objetivo do presente estudo é avaliar marcos do desenvolvimento de ratos neonatos, bem como caracterizar a morte celular na região CA1 do hipocampo dorsal, 24 horas após a hipóxia-isquemia encefálica neonatal e após o tratamento com ácido fólico.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO EXPERIMENTO 1:**

- 1) Quantificar células positivas marcadas para caspase-3 clivada pela técnica de imunistoquímica, na região CA1 do hipocampo, 24 horas após a HI neonatal em ratos tratados ou não com ácido fólico;
- 2) Quantificar a densidade celular, por meio de seções semifinas na microscopia óptica, 24 horas após a HI neonatal em ratos tratados ou não com ácido fólico;
- 3) Verificar os efeitos do tratamento com ácido fólico na caracterização, por microscopia eletrônica, da morte celular nos neurônios da região CA1 do hipocampo, 24 horas após os animais serem submetidos à HI neonatal.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO DO EXPERIMENTO 2:**

- 1) Avaliar alguns marcos do desenvolvimento e possíveis efeitos do tratamento agudo com ácido fólico 24 horas antes, 24 horas, três e cinco dias após a HI neonatal.

### **3. Experimento 1**

*“Cell death in the CA1 region of the hippocampus 24 hours after neonatal hypoxia-ischemia: folic acid effects.”*

(Bruna Ferrary Deniz, Jaqueline Vieira Carletti, Iohanna Deckmann, Carolina Beatriz Müller, Patrícia Severo do Nascimento, Marilda da Cruz Fernandes, Fábio Klamt, Maria Cristina Faccioni-Heuser, Lenir Orlandi Pereira)

Artigo à ser submetido à revista Neuroscience

**“Cell death in the CA1 region of the hippocampus 24 hours after neonatal hypoxia-ischemia: folic acid effects.”**

Bruna Ferrary Deniz<sup>1,2</sup>, Jaqueline Vieira Carletti<sup>1,2</sup>, Iohanna Deckmann<sup>2</sup>, Carolina Beatriz Müller<sup>3</sup>, Patrícia Severo do Nascimento<sup>2</sup>, Marilda da Cruz Fernandes<sup>4</sup>, Fábio Klamt<sup>3</sup>, Maria Cristina Faccioni-Heuser<sup>1,2</sup>, Lenir Orlandi Pereira<sup>1,2</sup>

1 Programa de Pós Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 107, 90050- 170, Porto Alegre, RS, Brazil;

2 Departamento de Ciências Morfológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, 90050- 170, Porto Alegre, RS, Brazil;

3 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Prédio Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil;

4 Programa de Pós Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

\* Corresponding author: Fax: +55 51 3308 3599

E-mail address: lenir.orlandi@ufrgs.br

## ABSTRACT

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) causes permanent motor and cognitive sequelae due to extensive cellular degeneration that occurs in neonate brain. This damage is progressive and generates visible atrophy in several brain structures, particularly the hippocampus, cerebral cortex and striatum. A recent study from our research group demonstrated that treatment with folic acid (FA) reversed cognitive deficits and decreased activity of the enzyme  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in rats submitted to neonatal HI. Thus, in order to better understand the possible effectiveness of folic acid in recovering and / or preventing the damage caused by neonatal HI, the aim of this study was to evaluate the treatment effects of folic acid on cell degeneration in dorsal hippocampus CA1 region 24 hours after neonatal HI. Wistar rats of both sexes were submitted to Rice – Vanucci model on the 7<sup>th</sup> postnatal day, divided into four experimental groups: 1) control treated with saline (CTS); 2) control treated with folic acid (CTAF); 3) HI treated with saline (HIS) 4) HI treated with folic acid (HIAF). Animals received an intraperitoneal dose of FA (0.011 $\mu\text{mol/g}$  of body weight) 24 hours before, immediately before and 12 hours after the HI procedure. Our results demonstrated that there are no differences in positive cells quantification for cleaved caspase-3 in immunohistochemistry technique, but in cell density outcome it was observed a decrease of cells in HIS group when compared with CTFA and HIFA groups in right hippocampus. In ultrastructure analysis of pyramidal neurons at hippocampal CA1 region was also possible to detect an important cellular degeneration in groups subjected to neonatal HI,

predominantly characterized by necrotic pattern, but in the group treated with FA this degeneration was less expressive. Concluding, 24 hours after HI occurs cell density reduction and evident degeneration process to hippocampal tissue, most significantly with death by necrosis. In addition, supplementation with folic acid was able to reduce and / or prevent cell damage in the CA1 region of the hippocampus ipsilateral to the arterial occlusion.

**KEYWORDS:** hypoxia-ischemia, folic acid, cellular degeneration, cleaved caspase-3, necrosis.

## **INTRODUCTION**

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HI) is a common disorder that occurs in 1.5 per 1000 live full term births. Of these, 15% to 20% newborns die in postnatal period and about 25% will have permanent sequelae (Kurinczuk et al., 2010). The most frequent disabilities that occur after HI are: cognitive and learn difficulties, gross motor dysfunction and motor coordination problems (Mwaniki et al., 2012).

Some experimental models are used to study the HI, but the Levine method (Levine, 1960) modified by Rice et al. (1981) is generally utilized because its reproduces the brain damage, especially in the ipsilateral hemisphere to the arterial occlusion (Jansen and Low, 1996; Kumral et al., 2004; Xia et al., 2005). Due to extensive cellular loss, the atrophy in some



structures are evident, such as hippocampus, striatum and cerebral cortex in the ipsilateral hemisphere (Pereira et al., 2007; Pereira et al., 2008).

Some studies which using electron microscopy describes that after HI, present both necrotic and apoptotic features, representing a “continuum” phenotype of cell death that was classified as “continuum apoptosis-necrosis” or “parapoptosis” (Sheldon et al., 2001; Liu et al., 2004; Northington et al., 2007). This process can occur due to initial energy failure caused by hypoxia-ischemia, leading to a death by necrosis, but with energy recovery cell could initiate a process of apoptosis (Liu et al., 2004). Summarizing, typical features of necrosis cell death are: early rupture of plasma membrane, swelling of the intracellular organelles and inflammation due to extravasation of cytosolic contents into the extracellular matrix (Edinger and Thompson, 2004). On the other hand, apoptosis is characterized by cell shrinkage, chromatin condensation and fragmentation of the nucleus. Cell membrane form bubbles and the cell break into vesicles surrounded by membrane (apoptotic bodies) containing varying amounts of cytoplasm, organelles and DNA fragments (Kerr et al. 1972; Edinger and Thompson, 2004). This cascade involves several molecules as caspases that are responsible for its execution, especially caspase-3 which is one of the final points of this via and is highly activated after neonatal HI (Martin et al. 1998; Nakajima et al., 2000; Northington et al. 2001; Stefanis, 2005; Elmore, 2007).

Trying to revert or alleviate this damage caused by neonatal HI we have recently adopted folic acid supplementation. Folic acid (FA) is a water-soluble B-vitamin considered an essential nutrient that is not synthesized by human, so

it must be acquired by diet consumption, especially obtained in green leafy vegetables and citric fruits (Meshkin and Blum, 2007). It is associated with the prevention of neural tube defects (Czeizel and Duda's, 1992), ischemic events (Assaneli et al., 2004), Alzheimer's disease (Mattson & Shea, 2003) and oxidative damage caused by homocysteine (Matté et al., 2007). Its potential antioxidant activity has already been described (Joshi et al., 2001; Stanger and Wonisch, 2012) and some researchers have demonstrated its possible antiapoptotic effect (Jia et al., 2008; Sangita et al., 2012), making it possible to be used, also, as treatment and not only for prevention. Our research group recently published the first study using the folic acid as a pharmacological treatment strategy in rats submitted to neonatal HI. We found that folic acid treatment prevented memory deficit and anxiety-like behavior, as well as prevents Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition in the striatum and frontal cortex caused by neonatal hypoxia–ischemia (Carletti et al., 2012).

Considering this, the aim of this study is to investigate the effects of folic acid treatment on cellular loss (by quantification in semithin sections), characterization of cell death (by electron microscopy analysis) and on quantification of activated caspase-3 cells (by immunohistochemistry), that is essential in apoptosis pathway, in animals submitted to neonatal hypoxia-ischemia.

## EXPERIMENTAL PROCEDURE

### Animals

Seven days old male and female Wistar rats were obtained from a local breeding colony (Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil). They received food and water available *ad libitum* and were maintained in temperature-controlled room ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) on a 12/12 light/dark cycle. Animals were randomly divided into four experimental groups: 1) control treated with saline (CTS), 2) control treated with folic acid (CTFA), 3) hypoxia-ischemia treated with saline (HIS), and 4) hypoxia-ischemia treated with folic acid (HIFA). Five to six animals per group were used to cell count and 3-4 for ultrastructural analysis (electron microscopy). For the measure of cleaved caspase-3, five animals per group were used.

All procedures were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA) and with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology. This project were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (nº 23630).

## **Hypoxia-ischemia**

At the seventh postnatal day (PND), animals were submitted to the Levine method (1960), as modified by Rice et al. (1981). They were anesthetized with halothane and an incision was made in the ventral surface of the neck. The right common carotid artery were identified, isolated from the adjacent structures and permanently occluded with surgical silk thread. After a 15 minute recovery period under a heating light, the animals were returned to their dams. Two hours after, pups were exposed to an hypoxic atmosphere (8% oxygen and 92% nitrogen) during 90 minutes in a 1500 mL chamber partially immersed in a 37°C water bath. Control animals were sham-operated, i.e., they were submitted to anesthesia and neck incision, but did not received arterial occlusion nor hypoxia.

## **Folic acid treatment**

Folic acid groups received, i.p., a folic acid solution (0.011  $\mu\text{mol}$  folic acid/g body weight) 24 hours before, immediately before and 12 hours after the hypoxia-ischemia procedure (Lalonde et al, 1993; Matté et al, 2007, Carletti et al., 2012). Control animals received saline solution in the same volumes as those administered to folic acid groups. Folic acid was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

## **Morphological procedure**

### **Immunohistochemistry**

Twenty-four hours after the hypoxia-ischemia procedure 5 animals per group were anesthetized, i.p., with ketamine (80mg/kg) and xylazine (10mg/kg) and transcardially perfused with 0.9% saline solution followed by a 4% formaldehyde solution. Brains were removed from the skull and reserved in the same fixative solution during four hours. After, they were changed for a 70% alcohol solution until the paraffinization procedure that was carried out by an automatic machine. Sections (5  $\mu\text{m}$ ) were obtained using a microtome for posterior analysis with the Apoptosis Marker: SignalStain® Cleaved Caspase-3 (Asp 175) IHC Detection kit from Cell Signaling Technology, USA. The slides were deparaffinized, rehydrated and submitted to peroxidase and peptide blocking. Then, they were incubated with the primary antibody for cleaved caspase-3 overnight at 4°C. Biotinylated secondary antibody was applied in the slices for 30 minutes at room temperature. Avidin DH and biotinylated horseradish peroxidase were mixed to bind the secondary antibody. The macromolecular complex was localized by incubation with NovaRed™ enzyme substrate. Cell positives for cleaved caspase-3 were quantified per unit area (33793,38  $\mu\text{m}^2$ ) in each section in CA1 region of hippocampus in both hemispheres. Six sections per animal, five animals per group were used in this analysis.

## **Cellular density and electron microscopy**

Twenty-four hours after the hypoxia-ischemia procedure, animals were anesthetized, i.p., with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and transcardially perfused with 0.9% saline solution followed by a solution composed of 2.5% glutaraldehyde, 2% formaldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB) pH 7.4. Brains were removed from the skull and reserved in the same fixative solution. Coronal sections of the brain (1000  $\mu\text{m}$ ) were obtained using a vibratome and postfixed, again, in the same fixative solution for at least 1 hour. Later, the sections were washed in phosphate solution and postfixed, for 1 hour, in 1% osmium tetroxide at room temperature. The material was dehydrated in an ascending graded series of acetone and then embedded in Araldite. After that they were put onto slides with resin and polymerized for 48h at 60°C. The CA1 field of the dorsal hippocampus were selected, removed from the slides and glued onto resin blocks and newly polymerized for 48h at 60°C.

Semithin sections (1  $\mu\text{m}$ ) were obtained using an ultramicrotome (M T 600-XL, RMC, Tucson, USA) with a glass knife and stained with 1% toluidine blue. This procedure allowed the identification of hippocampus CA1 region pyramidal neurons (From bregma -2.30 mm to -3.60mm in accordance to Paxinos and Watson, 1986; Rodrigo et al., 1996). Images of these cells were captured and digitalized using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Tokio, Japan, magnification: 1000x) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Image Pro Plus Software 6.0 (media Cybernetics, USA). Only cells with viable nuclei and evident nucleolus were counted for cellular density estimation

per unit area (997,456  $\mu\text{m}^2$ ) in five fields in each section (five in each hemisphere) in CA1 region of the hippocampus in both hemispheres.

For the electron microscopy, ultrathin sections (90-100 nm) were obtained using the same ultramicrotome with a diamond knife and stained with 2% uranyl acetate (Merck, Germany) followed by 1% lead citrate (Merck, Germany) (Reynolds, 1963). The material was examined with a JEM 120 EX II transmission electron microscope (CME, UFRGS). Three to four animals per group were used for the characterization of pyramidal neurons and their changes due to cell death in CA1 region of hippocampus in the ipsilateral hemisphere to the arterial occlusion (right hemisphere). Fifteen to twenty images per animal were analyzed to quantification, and the percentage was expressed per animal (considering the total cells analyzed) and, then, an average per group was performed.

### **Statistical Analysis**

Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, with lesion and treatment as factors, followed by Tukey's test. All statistical tests were performed using the Statistica® software package running on a compatible personal computer; differences were considered statistically significant whenever  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Immunohistochemistry

It was evaluated the presence of immunopositive cleaved caspase-3 cells at dorsal hippocampus CA 1 area (Figure 1). Data analysis demonstrated no differences in the counting of positive cleaved-caspase-3 cells in right hippocampus: *lesion* ( $F(1,15) = 0.31$ ;  $p=0.58$ ), *treatment* ( $F(1,15) = 0.12$ ;  $p=0.72$ ). No differences were found in left hippocampus either: *lesion* ( $F(1,18) = 0.21$ ;  $p=0.65$ ) and *treatment* ( $F(1,18) = 0.32$ ;  $p=0.57$ ) (Figure 2).

### Cellular density

Cell number was estimated in the same region of hippocampus (Figure 3). Two-way ANOVA presented a significant main effect on *lesion* ( $F(1,18) = 15.08$ ;  $p<0.01$ ), *treatment* ( $F(1,18) = 21.46$ ;  $p<0.05$ ) and *lesion\*treatment interaction* ( $F(1,18) = 6.15$ ;  $p<0.05$ ) in ipsilateral hippocampus. Tukey's *post hoc* comparison demonstrated that hypoxic-ischemic treated with saline (HIS) had fewer cells in right hippocampus when compared to all groups. In contralateral hippocampus there were no differences between groups (Figure 4).



## Electron microscopy

Ultrastructural analysis was performed in pyramidal neurons in the CA1 region of the dorsal hippocampus in the right hemisphere, by electron microscopy. For a better presentation and interpretation of this analysis, categorization of cell characteristics is presented in Table 1.

Our results in Table 1 demonstrated that both **control groups**, treated with saline and treated with folic acid, presented typical pyramidal neurons (Fig. 6A). The nucleus appears with a pale round or oval (8% in CTS and 11% in CTFA presented nuclear indentations) shape with the characteristic trilaminar nuclear membrane intact (Fig. 5B, D) and well defined (less than 30% of cells from both groups had one of the membranes, nuclear or plasmatic, disrupted). Also, the nucleolus was easily identified, especially near the inner nuclear membrane (Fig. 6B,C). The cytoplasm was well organized (about 5% showed empty cytoplasm) (Fig. 5D) with intact organelles and with the typical well-developed Nissl bodies (Fig. 5A, 5B). This structure is characterized by tubules presence and vesicles with ribosomes adhered to its membranes, giving a granular appearance to the cytoplasm. Mitochondria presented their cristae and electron-dense matrix to electrons (6% in CTS and 2% in CTFA of the cells presented mitochondria with unidentifiable cristae) (Fig. 5C). In some images we observe the Golgi complex with its tubules and vesicles spouting from their ends (Fig. 6D). Mostly cells had intact plasmatic membrane (Fig. 5A-D, 6C) and we found few neurons with some alterations in their structure.

In ***hypoxia-ischemia treated with saline group*** were visualized several alterations in pyramidal cells compatible with degeneration, as expected for this group. Some nuclei had varied formats and indentations (13%). The majority of cells presented the nuclear membrane disrupted (Fig. 7B) or disintegrated (Fig. 7D), allowing the extravasation of the nuclear contents (65% had nuclear or plasmatic or both membranes disrupted). In a few cases, this leaking left the nucleus with several empty spaces (Fig. 7B). Some neurons also showed nuclear membrane dilatations or with wavy appearance (Fig. 7E) and several clumps of chromatin near the inner nuclear membrane. Besides, commonly were observed in the HIS group neurons with heterochromatic nucleus (43%) (Fig. 7C,F). Considering the cytoplasm organization, the rough endoplasmic reticulum (RER) was hardly identified with its typical characteristic, it was very common the visualization of vesicles fragmentation (Fig. 7D,E), free ribosomes that gave a granular appearance to the cytoplasm (Fig. 7B). Sometimes the RER were intact or had dilated vesicles. In some cells, the mitochondria were swollen, becoming difficult to visualize the cristae (21%). It was not common to see the Golgi complex in the images, but when it was possible, it was usually intact or, in a very few cases, dilated. Considering the plasmatic membrane, it was very frequently disrupted or very hard to identify. Consequently, the cytoplasm was apparently extravasated, (Fig. 7B,D) losing its typical appearance. In just a few cells, the nucleus was surrounded by an empty space (Fig. 7C,F), with no organelle around it, indicating an advanced stage of degeneration (21% of the cells showed lost of its contents). Many neuritis were found and the cells presented various degrees of vacuolization in the nucleus

and in the cytoplasm (19%) (Fig. 7E). And also it was found a minimal number of intact cells with all the characteristic of preserved pyramidal neuron (Fig. 7A).

In right hippocampus of the animals submitted to **hypoxia-ischemia** insult and **treated with folic acid** we could observe different ultrastructural alterations, but more intact cells or with less degeneration when compared to HIS group (Table 1). More cells showed typical shape of nucleus in pyramidal neurons (Fig. 8A), but it was possible to note some cells with indentations or other nuclear shapes (13%) (Fig. 8C). Frequently, the nuclear membrane was dilated or with wavy appearance (Fig. 8B). And, as seen in HIS group, it was also found disrupted or disintegrated nuclear membrane (Fig. 8C), but we can observe in Table 1 that it was less frequent (44% in HIFA and 65% in HIS). The nucleus presented clumps of chromatin near the inner nuclear membrane, some were heterochromatic (32% of the cells) (Fig. 8C) and other had empty spaces because of alterations in the nuclear membrane structure. However, it was possible to identify more cells with the nucleus in the control pattern. Observing the cytoplasm content, were found cells with altered organelles, with no organelles (16% of the cells had extravasation of their contents) (Fig. 8D) and with the characteristic organization of pyramidal neurons. When it was possible to observe the RER, it was swollen but still had the ribosomes attached (Fig. 8B). In some cases, it was fragmented with a large number of free ribosomes in the cytoplasm. The mitochondrial cristae were more easily identifiable (Fig. 8B), but some were dilated (14%, an improvement of 1/3 of the cells). The Golgi complex, when visualized, it was intact. The plasmatic membranes were intact in a great number of cells, although it was easily to see

cells with it disrupted or, more rarely, disintegrated. Some cells had vacuolization in their cytoplasm (10%, almost 50% less than the HIS group) and many neuritis were identified. With the observations and the table data, our outcomes suggest that there were more intact neurons or with less degeneration in this group.

## **DISCUSSION**

This study proposed to investigate the folic acid effects on hippocampal cell damage caused by neonatal hypoxia-ischemia (HI) in rats, twenty-four hours after the HI. Present data indicated prevention of the cell density decreased in dorsal hippocampus of animals submitted to HI treated with folic acid. In consonance with this finding, ultrastructural analysis by electron microscopy also demonstrated a hippocampal tissue preservation in rats suffering folate supplementation, compared to hypoxic-ischemic rats. No difference was found when observed the quantification of cleaved caspase-3 positive-cells in CA1 region of the dorsal hippocampus.

Cellular density was estimated to verify the early cell death in the CA1 area. It was found that the hypoxia-ischemia treated with saline group (HIS) had fewer cells in the ipsilateral hippocampus, when compared to both control groups (CTS and CTFA). This fact represents the initial damage caused by neonatal HI. Various studies have demonstrated that there is a progressive damage in nervous tissue due to apoptosis (McLean & Ferriero, 2004; Hossain,

2008) and necrosis (Carlioni et al., 2007). Both may extend for days after injury, resulting in extensive cellular loss and extensive atrophy in some structures as hippocampus, striatum and cortex in the ipsilateral hemisphere (Pereira et al., 2007; Pereira et al., 2008). This tissue degeneration will culminate in cognitive deficits: aversive, reference, working, spatial and recognition memory (Arteni et al., 2003; Pereira et al., 2007; Pereira et al., 2008; Rojas et al., 2013). It is also important to note that folic acid prevented cell death, since hypoxia-ischemia treated with folic acid group had more cell density compared to HIS group in hippocampal CA1.

It is well established that cellular death by apoptosis can occur for days in the ipsilateral hemisphere after an arterial occlusion (Nakajima et al., 2000; Northington et al., 2001). However we didn't find differences between experimental groups in the counting of cleaved caspase-3 (responsible for execution of apoptosis) positive-cells in CA1 region of hippocampus in both hemispheres twenty-four hours after HI. In accordance to our finding, Nakajima and collaborators (2000) found that apoptosis increased after 24 hours of HI injury, becoming more evident 48h after the insult. Ness et al. (2008) also demonstrated that there were no differences in cleaved caspase-3 cells in CA1 24h after HI, but they showed that the activation of this protein occurs at different time periods at different structures. Similarly, another study showed 24 hours after neonatal hypoxia-ischemia there were much more cell death by necrosis than apoptosis (Carlioni et al., 2007). We believe that, at this point, it is more prominent the cell death by necrosis because of the great energy failure that occurs after neonatal hypoxia-ischemia. Cell death by apoptosis may

increase after the first 24 hours, as shown by Nakajima and collaborators (2000) or it may be occurring by a caspase independent pathway, as proposed by West and collaborators (2006).

Aiming to better comprehend cell damage events following neonatal hypoxia-ischemia, we observed neurons in CA1 region of hippocampus in the ipsilateral hemisphere to arterial occlusion, by electron microscopy. As expected, in both controls groups it was observed typical features of pyramidal cells: euchromatic round or oval shape nucleus with a well organized cytoplasm, compound, specially, by Nissl substance, and intact membranes. We also found a few cells with some alterations in their structure, this can happen because in the postnatal period its common the death of neurons that don't make effective connections (Hipfner & Cohen, 2004; Ikonomidou & Kaindl, 2011).

Analyzing the hypoxia-ischemia treated with saline (HIS) group, extensive cell damage were evidenced. It was possible to identify apoptosis features such as chromatin condensation and vacuolization with intact plasmatic membrane; and, more evident, necrosis features such as membranes fragmentation, nuclear alterations, like pyknosis, structural mitochondrial and RER alterations, and vacuolization. This necrosis predominance supports our finding, because we can observe cellular loss in CA1 hippocampus but it's not by caspase-dependent apoptosis. We believe that this necrosis prevalence twenty-four hours after HI is due to energy failure caused by this insult and because the immature brain is more susceptible to oxidative damage (McLean & Ferriero, 2004; Gill & Perez-Polo, 2008; Blomgren & Hagberg, 2006; Weis et

al., 2011). Also, it was already demonstrated that in permanent ischemia exists a predominance of necrosis over apoptosis (Ferrer & Planas, 2003).

It was also observed heterogeneity in degeneration levels in cells of the same animal, as Pagnussat and collaborators (2007) found in their research with transient global ischemia in adult rats. In addition, it was found heterogeneity in the same cell, that is, in one cell we could see both apoptotic and necrotic features. Several reports have reported the existence of a “*continuum*” between apoptosis and necrosis after neonatal hypoxia ischemia (Nakajima et al., 2000; Sheldon et al., 2001; Liu et al., 2004; Northington et al., 2007). An explanation for this finding is that the initial failure energy caused by hypoxia-ischemia lead to death by necrosis, but with energy recovery cell could initiate a process of apoptosis (Sheldon et al., 2001; Liu et al., 2004; Northington et al., 2011).

The folic acid supplementation seems to be useful in preserve pyramidal cells of the hippocampus of rats submitted to neonatal HI. In electron microscopic analysis we could visualize different levels of degeneration in HIFA group. However, it was evident a substantial number of intact cells, particularly when compared with HIS group. In accordance with these data, Assaneli and coworkers (2004) have already been reported that folic acid is effective in prevent ischemic damage by reducing homocysteine levels. Hwang and collaborators (2008) demonstrated that folic acid deficiency increased cerebral damage after transient cerebral ischemia. Also, in a recent metanalysis, it was observed in populations with no or partial folic acid supplementation, strokes were prevented with its supplementation (Huo et al., 2012).

Our research group, at the first time, has demonstrated the beneficial effects of FA treatment in neonatal HI by reversing aversive memory impairment and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase inhibition in striatum and cortex (Carletti et al., 2012). Considering this data, we can suggest that preserving Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, folic acid treatment could prevent cell death. In addition it was well established the antioxidant effect of FA (Joshi et al., 2001; Stanger and Wonisch, 2012). Considering the extreme oxidative stress that occurs in neonatal HI (McLean & Ferriero, 2004) and the particular vulnerability to oxidative damage in neonates (Blomgren & Hagberg, 2006; Gill & Perez-Polo, 2008), we can also propose that this is another hypothesis for the protective effect of folate treatment.

Yet, the positive results found in hypoxic-ischemic rats may be due to antiapoptotic effect already describe after a folic acid supplementation (Jia et al., 2008; Majumdar et al., 2012). Since necrosis appears to be the dominant cell death pathway 24h after HI, it is possible to understand why folic acid treatment wasn't able to revert completely HI cell damage in hippocampus. Thus, a more prolonged period of FA could show better results in HI damage.

In conclusion, our data presenting the wide cellular damage twenty-four hours after neonatal hypoxia-ischemia. It seems that cell death by necrosis and a "*continuum*" necrosis-apoptosis are more prominent in this period, in the CA1 region hippocampus. In addition, it was also observed the beneficial effect of folic acid treatment in preserves or alleviates nervous tissue lesion consequent to hypoxic-ischemic event. Considering the importance and the incidence of neonatal hypoxia-ischemia, it is very important to know the pattern and the mechanisms of cell death after this injury to facilitate the research for more



specific and potent therapeutic drugs that will alleviate or prevent future damage and deficits.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brazil).

## **REFERENCES**

Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA (2003), Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res* 973(2): 171-178.

Assanelli D, Bonamone A, Pezzini A, Albertini F, Maccali P, Grassi M, Archetti S, Negrini R, Visioli F (2004), Folic Acid and Vitamin E Supplementation Effects on Homocysteinemia, Endothelial Function and Plasma Antioxidant Capacity in Young Myocardial-Infarction Patients. *Pharmacol Res* 49: 79-84.

Blomgren K, Hagberg C (2006), Free radicals, mitochondria, and hypoxia – ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med* 40(3): 388– 97.

Carletti JV, Deniz BF, Miguel PM, Rojas JJ, Kolling J, Scherer EB, de Souza Wyse AT, Netto CA, Pereira LO (2012), Folic acid prevents behavioral impairment and Na(+), K(+) -ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochem Res* 37(8): 1624-30.

Carlioni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini A (2007), Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Journal Pienal Reserch* 44: 157-167.

Czeizel AE, Duda's I (1992), Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 26: 1832–1835.

Edinger AL, Thompson CB (2004), Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16:663–669.

Elmore S (2007), Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35(4): 495–516.

Ferrer I, Planas AM (2003), Signaling of Cell Death and Cell Survival Following Focal Cerebral Ischemia: Life and Death Struggle in the Penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(4): 329-339.

Gill MB, Perez-Polo JR (2008), Hypoxia Ischemia-Mediated Cell Death in Neonatal Rat Brain. *Neurochem Res* 33: 2379-2389.

Hipfner DR, Cohen SM (2004), Connecting proliferation and apoptosis in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10): 805-15.

Hossain MA (2008), Hypoxic-Ischemic Injury in Neonatal Brain: Involvement of a Novel Neuronal Molecule in Neuronal Cell Death and Potential Target for Neuroprotection. *Int J Dev Neurosci* 29: 93-101.

Huo Y, Qin X, Wang J, Sun N, Zeng Q, Xu X, Liu L, Xu X, Wang X (2012), Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: new insight from a meta-analysis. *Int J Clin Pract* 66(6):544-51.

Hwang IK, Yoo KY, Suh HW, Kim YS, Kwon DY, Kwon YG, Yoo JH, Won MH (2008), Folic acid deficiency increases delayed neuronal death, DNA damage, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 immunoreactivity, and gliosis in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 86(9):2003-15

Ikonomidou C, Kaindl AM (2011), Neuronal Death and Oxidative Stress in the Developing Brain. *Antioxid Redox Signal* 14(8):1535-50.

Jansen EM, Low WC (1996), Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav Brain Res* 78: 189–194.

Jia DY, Liu HJ, Wang FW, Liu SM, Ling EA, Liu K, Hao AJ (2008), Folic acid supplementation affects apoptosis and differentiation of embryonic neural stem cells exposed to high glucose. *Neurosci Lett* 440(1): 27–31.

Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T (2001), Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 30: 1390–1399.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972), Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239–257.

Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, Kiray M, Genc S, Duman N, Koroglu TF, Ozkan H, Genc K (2004), Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia–ischemia in rats. *Behav Brain Res* 153: 77–86.

Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N (2010), Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev* 86: 329–38.

Lalonde R, Joyal CC, Botez MI (1993), Effects of Folic Acid and Folinic Acid on Cognitive and Motor Behaviors in 20-Month-Old Rats. *Pharmacol Biochem Behav* 44(3): 703-707.

Levine S (1960), Anoxic–ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36: 1–17.

Liu CL, Siesjo BK, Hu BR (2004), Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia–ischemia changes during brain development. *Neuroscience* 127: 113–123.

Majumdar S, Maiti A, Karmakar S, Das AS, Mukherjee S, Das D, Mitra C (2012), Antiapoptotic Efficacy of Folic Acid and Vitamin B12 Against Arsenic-Induced Toxicity. *Environ Toxicol* 27(6): 351-63.

Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998), Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and

target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46: 281–309.

Matté C, Scherer EBS, Stefanello FM, Barschak AG, Vargas CR, Netto CA, Wyse ATS (2007), Concurrent folate treatment prevents Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and memory impairments caused by chronic hyperhomocysteinemia during rat development. *Int J Dev Neurosci* 25: 545-552.

Mattson MP, Shea TB (2003), Folate and homocysteine metabolism in neuralplasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26(3): 137-46.

Mclean C, Ferriero D (2004), Mechanisms of Hypoxic-Ischemic Injury in the Tern Infant. *Semin Perinatol* 28: 425-432.

Meshkin B, Blum K (2007), Folate nutrigenetics: A convergence of dietary folate metabolism, folic acid supplementation and folate antagonism pharmacogenetics. *Drug Metab Lett* 1: 55-60.

Mwaniki MK, Atieno M, Lawn JE, Newton CR (2012), Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *Lancet* 379: 445–52.

Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV (2000), Apoptosis Has a Prolonged Role in the Neurodegeneration after Hypoxic Ischemia in the Newborn Rat. *J Neurosci* 20(21): 7994-8004.

Ness JM, Harvey CR, Washington JD, Roth KA, Carroll SL, Zhang J (2008), Differential activation of c-Fos and caspase-3 in hippocampal neuron

subpopulations following neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci Res* 86(5): 1115–1124.

Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ (2001), Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. *Neurobiol Dis* 8: 207–219.

Northington FJ, Zelaya ME, O'Riordan DP, Blomgren K, Flock DL, Hagberg H, Ferriero DM, Martin LJ (2007), Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia–ischemia manifests as “continuum” phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain. *Neuroscience* 149(4): 822–833.

Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ (2011), Neuronal Cell Death in Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Ann Neurol* 69: 743–758.

Pagnussat AS, Faccioni-Heuser MC, Netto CA, Achaval M (2007), An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion. *J Anat* 211: 589–599.

Paxinos G, Watson C (1986), *The rat brain in stereotaxic coordinates* (2nd ed.). Sydney: Academic Press.

Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, da Rocha AP, Achaval M, Netto CA (2007), Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia–ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 87: 101–108.

Pereira LO, Strapasson AC, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA (2008), Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia–ischemia. *Brain Res* 1218: 257–266.

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208–212.

Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981), The influence of immaturity on hypoxic–ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9: 131–141.

Rodrigo J, Peinado MA, Sanchez E, Pedrosa JA, Bentura ML, Esteban FJ, Torres MI, Martínez-Murillo R (1996), Técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopía electrónica. In *Inmunocitoquímica y Técnicas Relacionadas* (eds Peinado MA, Pedrosa JA, Rodrigo J), pp. 177–201. Editorial de la Universidad de Jaén, Jaén, Spain.

Rojas JJ, Deniz BF, Miguel PM, Diaz R, Hermel Edo E, Achaval M, Netto CA, Pereira LO (2013), Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Exp Neurol* 241: 25-33.

Sheldon RA, Hal JJ, Noble LJ, Ferriero DM (2001), Delayed cell death in neonatal mouse hippocampus from hypoxia-ischemia is neither apoptotic nor necrotic. *Neurosci Lett* 304(3): 165-8.

Stanger O, Wonisch W (2012), Enzymatic and non-enzymatic antioxidative effects of folic acid and its reduced derivatives. *Subcell Biochem* 56: 131–161.

Stefanis L (2005), Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist* 11:50–62.

Xia WJ, Yang M, Fok TF, Li K, Chan WY, Ng PC, Ng HK, Chik KW, Wang CC, Gu GJ, Woo KS, Fung KP (2005), Partial neuroprotective effect of pretreatment with tanshinone IIA on neonatal hypoxia–ischemia brain damage. *Pediatr Res* 58: 784–790.

Weis SN, Schunck RV, Pettenuzzo LF, Krolow R, Matté C, Manfredini V, do Carmo R Peralba M, Vargas CR, Dalmaz C, Wyse AT, Netto CA (2011), Early biochemical effects after unilateral hypoxia–ischemia in the immature rat brain. *Int J Dev Neurosci* 29(2): 115–120.

West T, Atzeva M, Holtzman DM (2006), Caspase-3 deficiency during development increases vulnerability to hypoxic–ischemic injury through caspase-3-independent pathways. *Neurobiol Dis* 22 523 – 537.

## **LEGENDS TO FIGURES**

Figure 1. Photomicrography of immunohistochemistry in the right hippocampus (ipsilateral to arterial occlusion). A) control treated with saline; B) control treated with folic acid; C) hypoxia-ischemia treated with saline; D) hypoxia-ischemia treated with folic acid. Cell positive for cleaved caspase-3 (arrow), but not in the CA1 region. Magnification of 200x. Scale bar = 40  $\mu$ m



Figure 2. Immunohistochemistry – Number of caspase-3 positive cells in the dorsal hippocampus. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Two-way ANOVA was performed followed by Tukey's test. N=5 animals per group. CTS=control treated with saline, CTFA=control treated with folic acid, HIS=hypoxia-ischemia treated with saline and HIFA=hypoxia-ischemia treated with folic acid.

Figure 3. Photomicrography of cell quantification in the right hippocampus (ipsilateral to arterial occlusion). A) control treated with saline; B) control treated with folic acid; C) hypoxia-ischemia treated with saline; D) hypoxia-ischemia treated with folic acid. Magnification of 1000x.

Figure 4. Cell density – Number of cells. \* Difference from CTFA group. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Two-way ANOVA was performed followed by Tukey's test, differences were considered statistically significant whenever  $p < 0.05$ . CTS=control treated with saline (n=5), CTFA=control treated with folic acid (n=6), HIS=hypoxia-ischemia treated with saline (n=5) and HIFA=hypoxia-ischemia treated with folic acid (n=6).

Figure 5. Electron micrography of the right hippocampus of control treated with saline group (n=4). A: Cytoplasm organization of a pyramidal cell with the typical rough endoplasmic reticulum with attached ribosomes (RER), mitochondria and their cristae (M) and intact plasmatic membrane (PM). B:

Neuron with euchromatic nucleus (N) and intact nuclear membrane with typical trilaminar appearance (NM), mitochondria (M), rough endoplasmic reticulum (RER) and intact plasmatic membrane (PM). C: Details of the precise boundaries between pyramidal cells across the plasmatic membrane (PM), rough endoplasmic reticulum (RER) of both cells, intact mitochondrias (M) and nucleus (N) with nuclear membrane (NM) with wavy appearance. D: Typical pyramidal cell with nuclear (NM) and plasmatic membranes (PM) intact, pale round nucleus (N), mitochondria (M) and dilated rough endoplasmic reticulum (RER). Scale bar: A: 1  $\mu$ m, B: 1  $\mu$ m, C: 1  $\mu$ m, D: 1  $\mu$ m.

Figure 6. Electron micrography of the right hippocampus of control treated with folic acid group (n=3). A: Characteristic hippocampal neurons with pale round nucleus (N) and intact nuclear membranes (NM). B: Neuron at higher magnification, allowing visualization of the trilaminar aspect of the nuclear membrane (NM), pale nucleus (N) with nucleolus (nu) close to the inner nuclear membrane, rough endoplasmic reticulum (RER) and plasmatic membrane (PM). C: Details of the precise boundaries between pyramidal cells across the plasmatic membrane (PM), nucleus (N) with nucleolus (nu) close to the inner nuclear membrane (NM), rough endoplasmic reticulum (RER) and mitochondrias (M). D: Pyramidal neurons with pale nucleus (N), nuclear (NM) and plasmatic membranes (PM), mitochondria (M), rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex (G). Scale bar: A: 5  $\mu$ m, B: 1  $\mu$ m, C: 1  $\mu$ m, D: 1  $\mu$ m.

Figure 7. Electron micrograph of the right hippocampus of animals submitted to hipoxia-ischemia and treated with saline (n=4). A: Typical pyramidal cell with pale round nucleus (N) intact nuclear membrane (NM), characteristic rough endoplasmic reticulum (RER) and plasmatic membrane (PM). B: Neuron with disrupted nuclear membrane (NM, arrow), nucleus (N) with empty space (star) due to extravasation of nuclear material, mitochondria (M), rough endoplasmic reticulum debris (RER) and plasmatic membrane (PM). C: Pyramidal cell with condensed chromatin in the nucleus (N), nuclear membrane (NM), cytoplasm without organelles (star) and plasmatic membrane (PM). D: Detail of a pyramidal cell with a dissolved (arrow) nuclear membrane (NM) and mixing the contents with the nuclear cytoplasmic (star), fragments of rough endoplasmic reticulum (RER) with plenty of free ribosomes and mitochondrias (M). E: Neuron with heterochromatic nucleus (N), nuclear membrane with wavy appearance (NM), cytoplasmic vacuoles (V), rough endoplasmic reticulum debris (RER), mitochondria and cytoplasm with almost no organelles (star). F: Two pyramidal cells with heterochromatic nucleus (N), nuclear membrane (NM), disorganized cytoplasm (star) and unidentifiable plasmatic membrane (arrow) separating the cells. Scale bar: A: 2  $\mu\text{m}$ , B: 1  $\mu\text{m}$ , C: 2  $\mu\text{m}$ , D: 1  $\mu\text{m}$ , E: 1  $\mu\text{m}$ , F: 2  $\mu\text{m}$ .

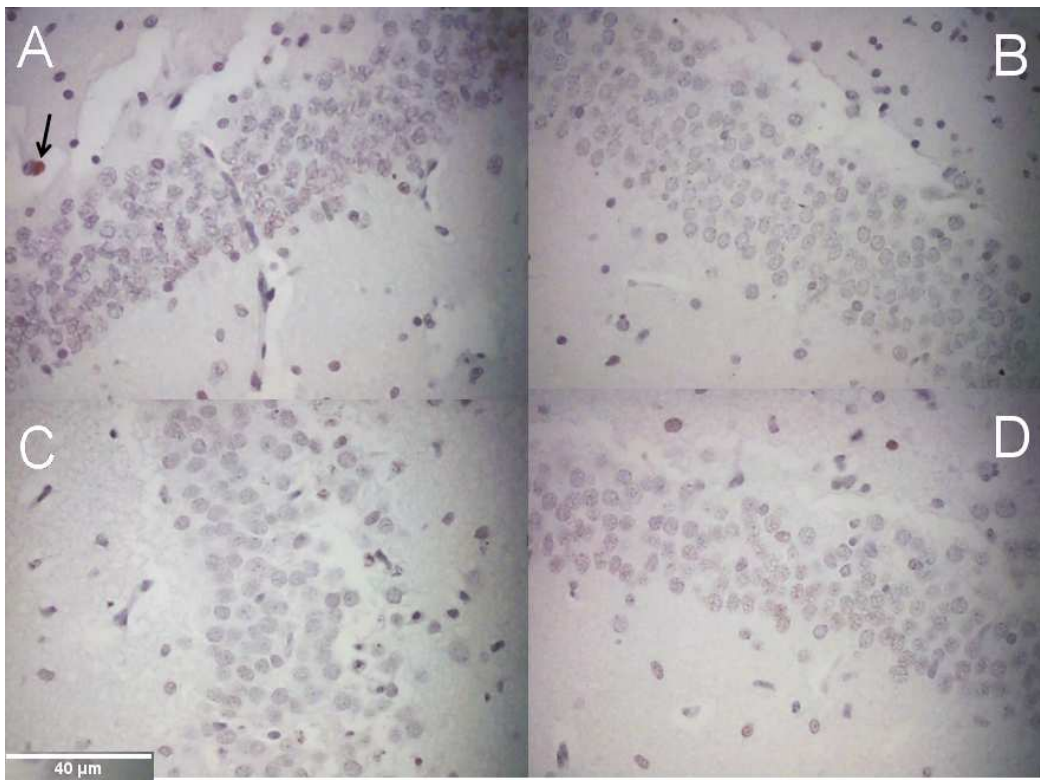
Figure 8. Electron micrograph of the right hippocampus of animals submitted to hipoxia-ischemia and treated with folic acid (n=4). A: Typical pyramidal neurons with pale round nucleus (N) and nuclear membrane (NM). B: Higher magnification of an intact neuron with euchromatic nucleus (N), nucleolus (nu) close to the inner nuclear membrane (NM) that shows wavy appearance, rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondrias (M) and plasmatic membrane

(PM). C: Images of neurons with different nuclear (N) formats including recesses and angles (arrow), and dissolved nuclear membrane (arrowhead). D: Degenerated neuron with heterochromatic nucleus (N), nuclear (NM) and plasmatic membranes (PM), rough endoplasmic reticulum debris (RER) and empty cytoplasm. Scale bar: A: 5  $\mu$ m, B: 1  $\mu$ m, C: 5  $\mu$ m, D: 2  $\mu$ m.

## LEGEND TO TABLE

**Table 1** – Comparison of ultrastructural characteristics between groups. The percentage was expressed per animal (considering the total cells analyzed in its images) and, then, an average per group was performed. CTS=control treated with saline (n=4), CTFA=control treated with folic acid (n=3), HIS=hypoxia-ischemia treated with saline (n=4) and HIFA=hypoxia-ischemia treated with folic acid (n=4).

Figure 1



**Figure 2**

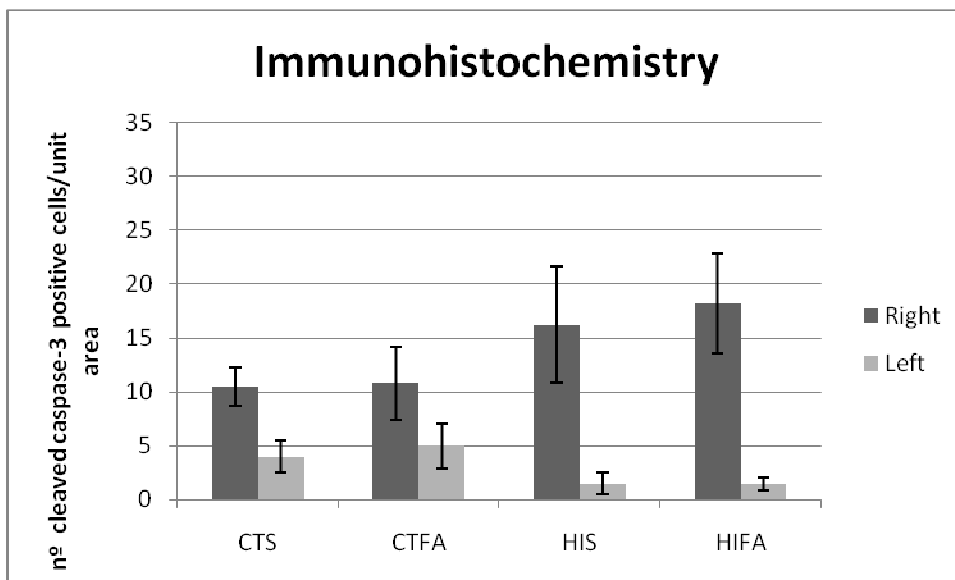


Figure 3

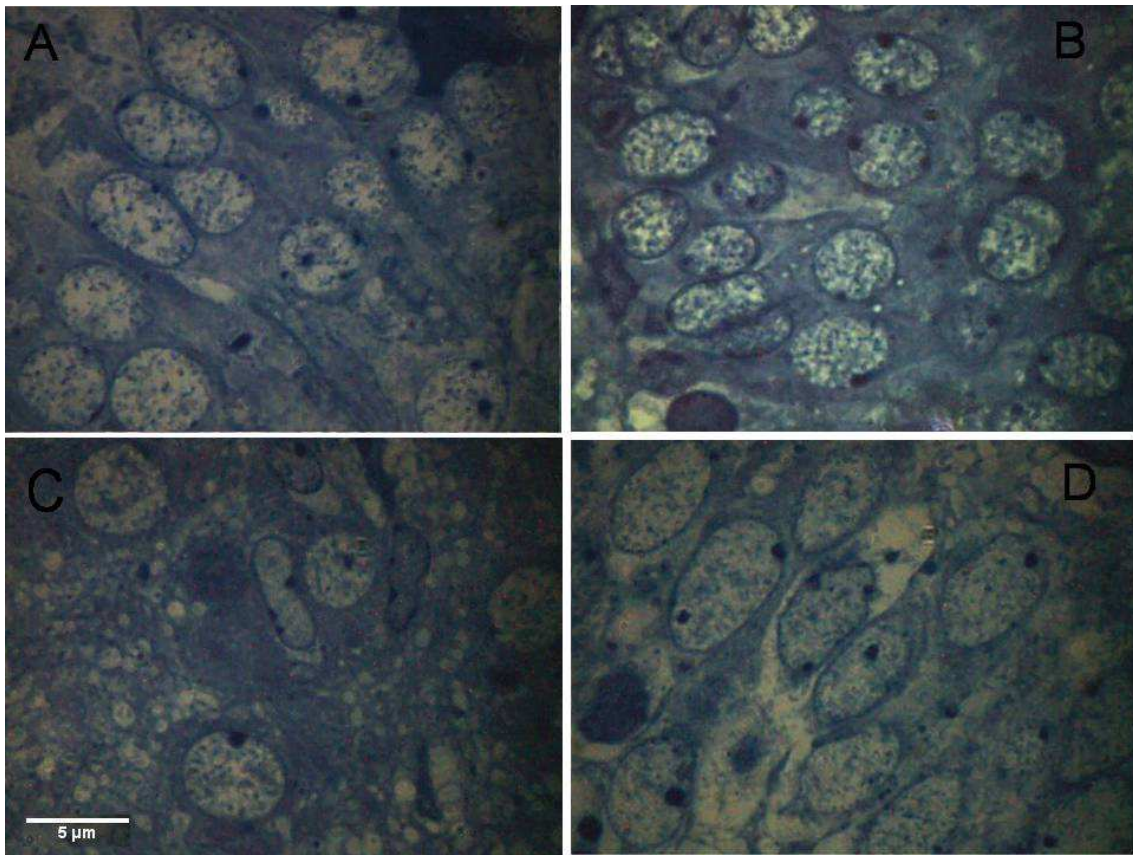


Figure 4

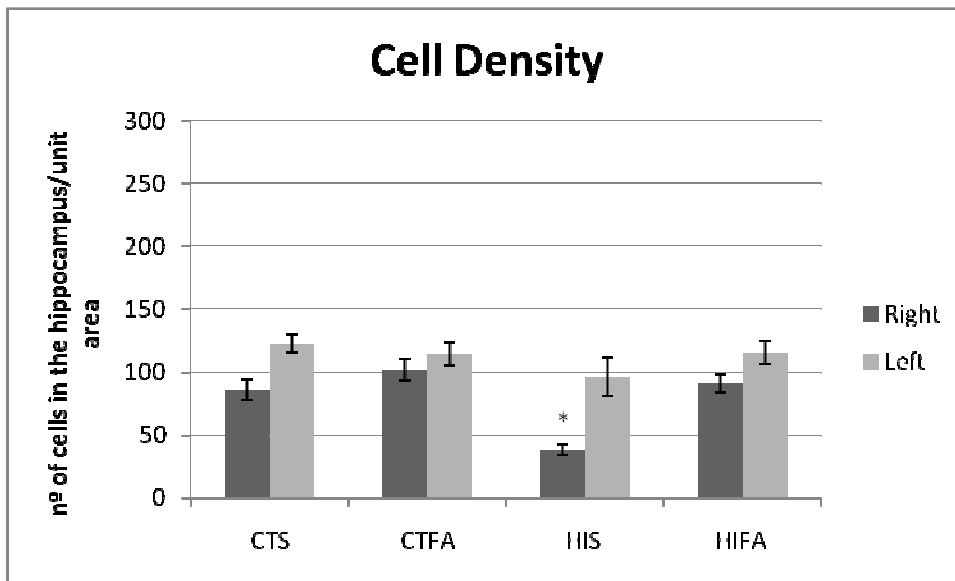




Figure 5

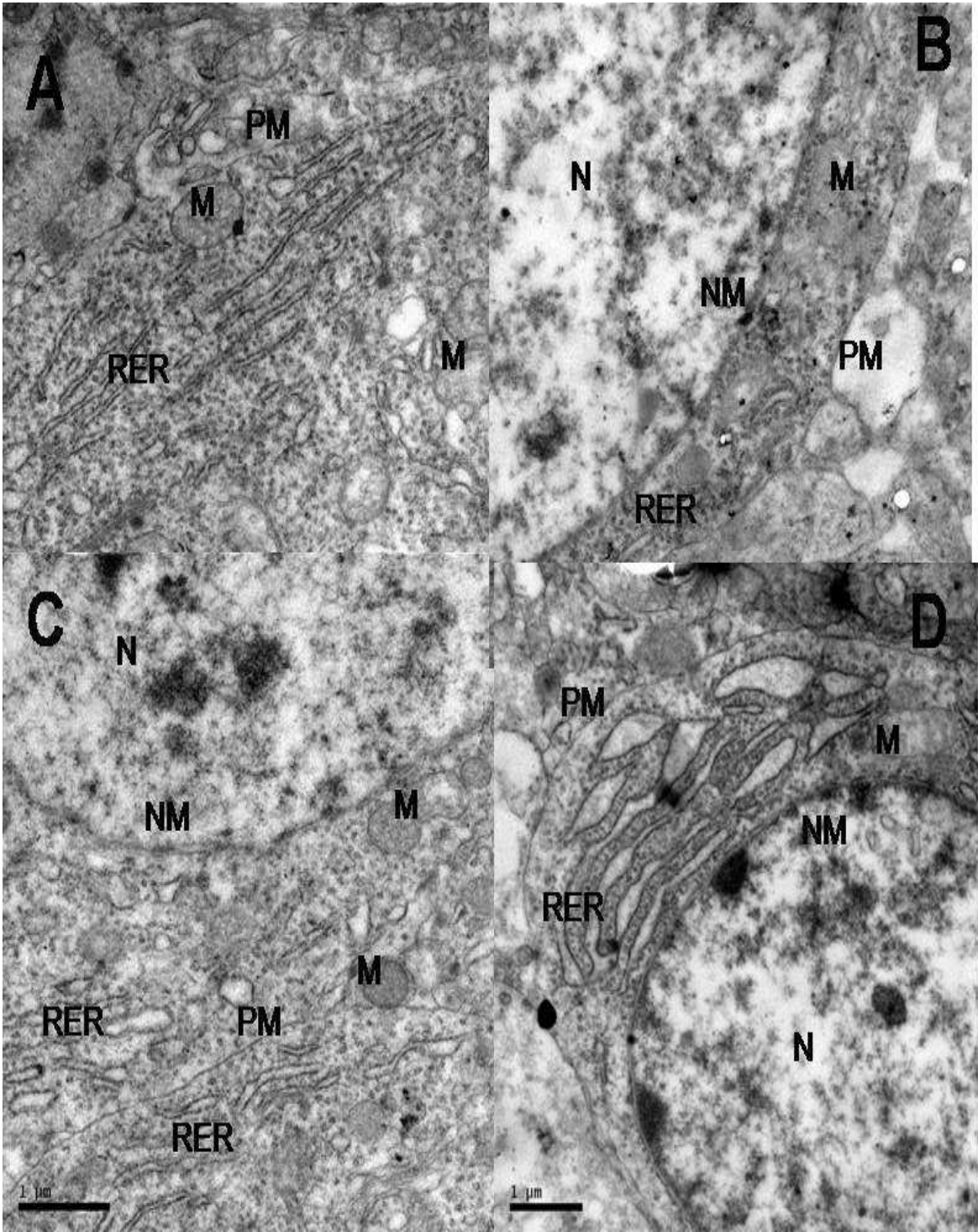


Figure 6

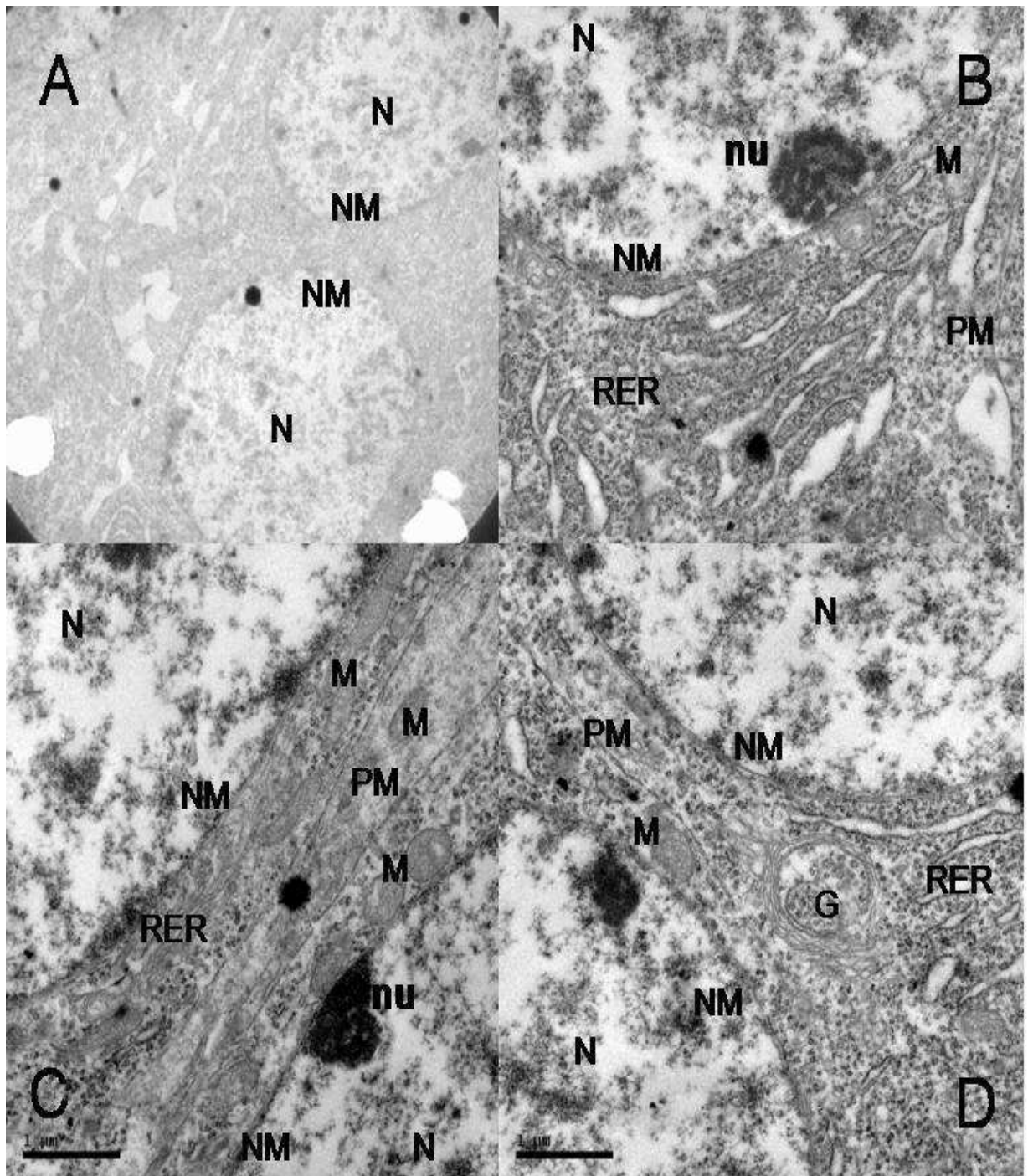


Figure 7

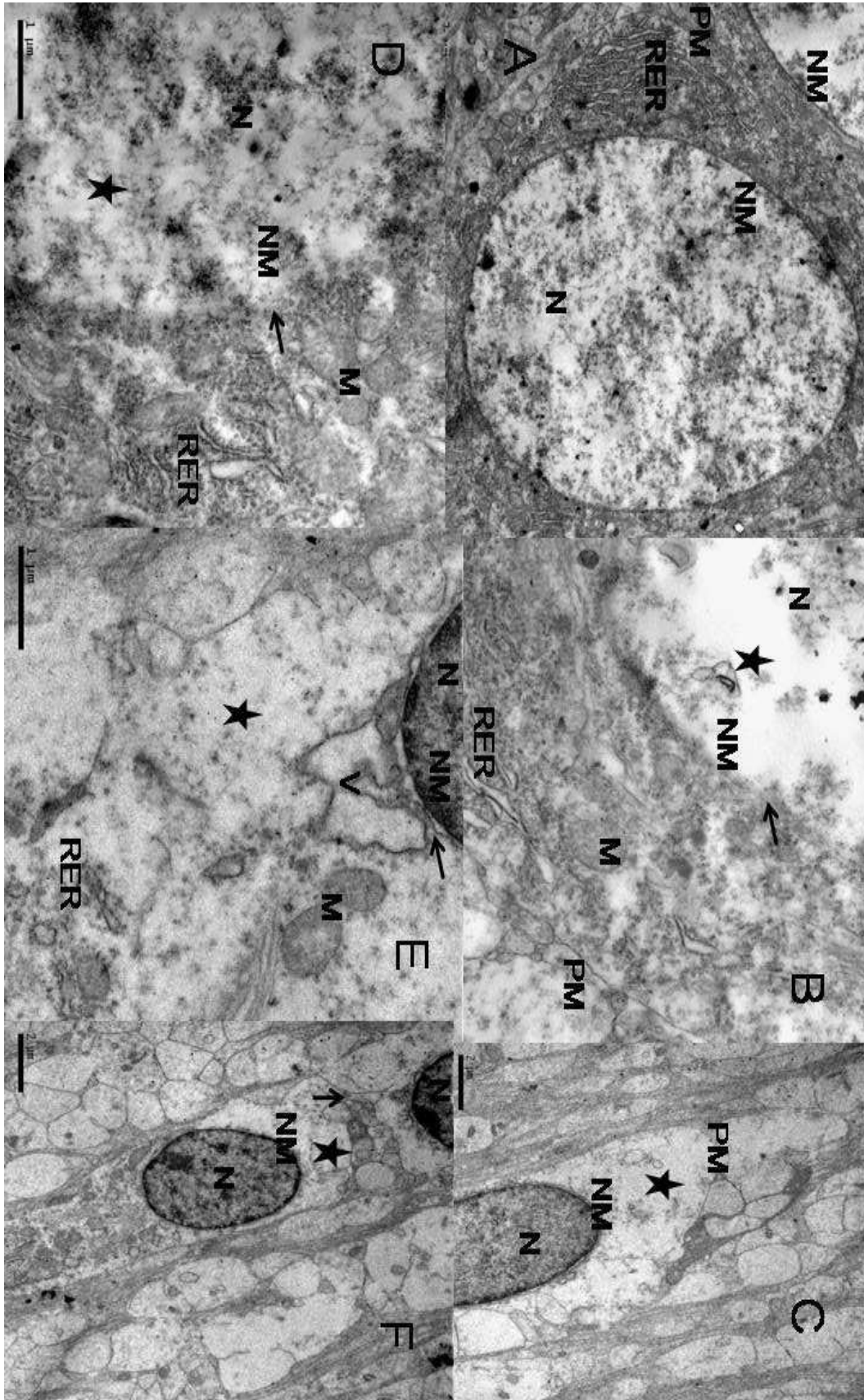
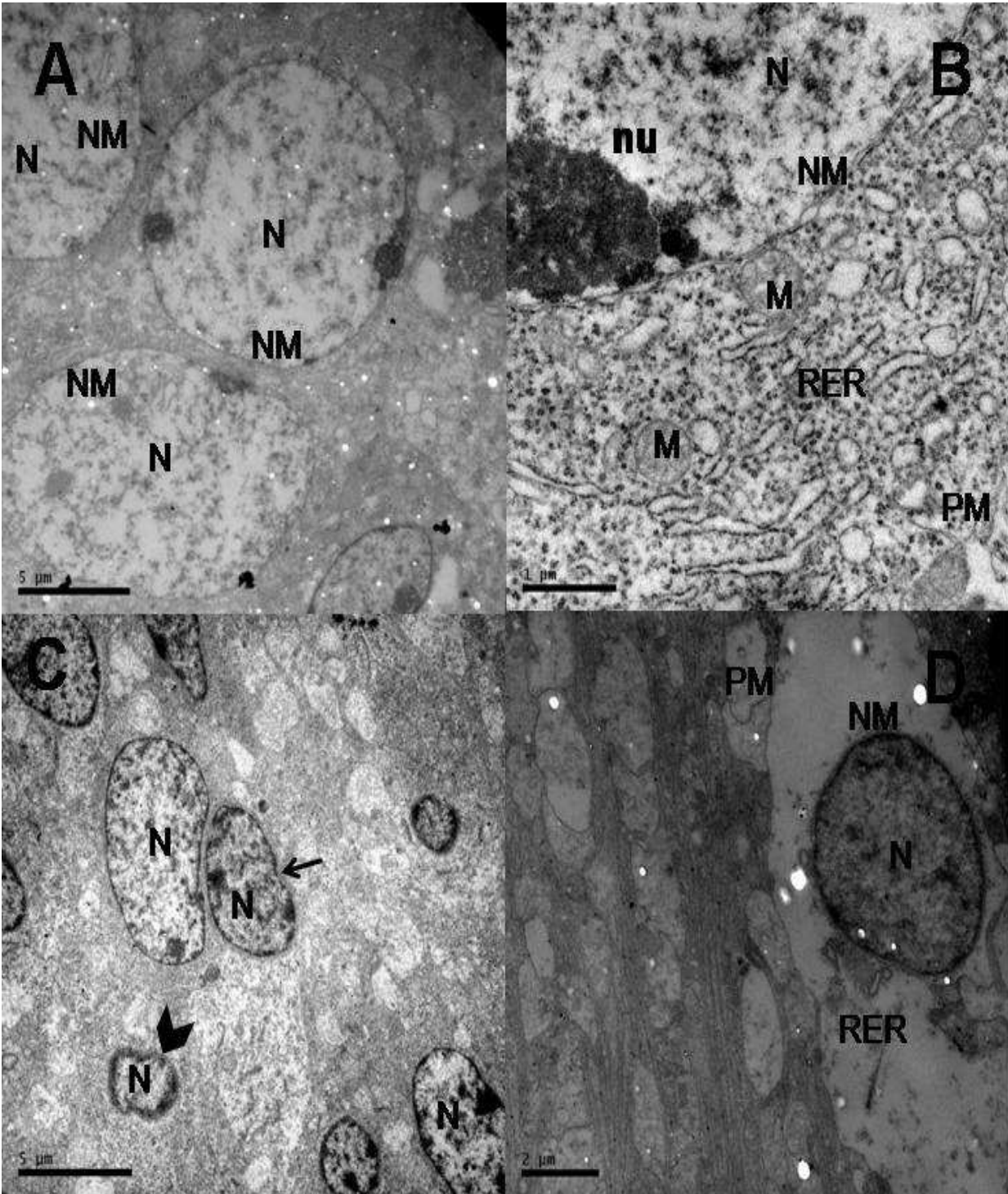


Figure 8



**Table 1**

<b>Group</b>	<b>Vacuoles</b>	<b>Disrupted membranes</b>	<b>Condensed chromatin</b>	<b>Empty cytoplasm</b>	<b>Mitochondria with unidentifiable cristae</b>	<b>Nuclear identantions</b>
CTS	3%	28%	15%	3%	6%	8%
CTFA	7%	25%	16%	5%	2%	11%
HIS	19%	65%	43%	21%	21%	13%
HIFA	9%	40%	34%	23%	10%	14%

## 4. EXPERIMENTO 2

### 4.1 Material e Métodos

#### 4.1.1 Animais

Foram utilizados 144 ratos Wistar machos e fêmeas provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS), que ficaram alojados no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas desta Universidade e receberam ração e água *ad libitum*, sendo eles mantidos em ambiente climatizado (22° C), com ciclo claro / escuro de 12 horas.

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- 1) Grupo controle tratado com salina;
- 2) Grupo controle tratado com ácido fólico;
- 3) Grupo hipóxia-isquemia tratado com salina;
- 4) Grupo hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico;

O protocolo experimental deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade, sob o N°23630 e está de acordo com a Lei AROUCA de 8 de Outubro de 2008, que regulamenta procedimentos para uso científico de animais.

#### **4.1.2 Hipóxia-isquemia**

Foi utilizado o modelo experimental para ratos neonatos de Levine (1960), modificado por Rice e colaboradores (1981) que consiste na reprodução de um dano unilateral através da associação da oclusão permanente da carótida comum direita com posterior exposição a uma atmosfera hipóxica, modelo amplamente utilizado. Aos sete dias de vida pós-natal (DPN), os animais foram anestesiados com halotano 2-4% para que fosse realizada uma incisão na linha média da face anterior da região cervical, permitindo que a carótida comum direita seja identificada, isolada de estruturas adjacentes e ocluída permanentemente com fio cirúrgico de seda 4.0. Após período de recuperação em suas caixas moradia por duas horas, os animais foram colocados em uma câmara (1500 ml) em banho-maria à 37°C, em grupos de cinco, para exposição à atmosfera hipóxica (8% de oxigênio e 92% de nitrogênio, com fluxo de 5L/min) durante 90 minutos, sendo posteriormente devolvidos às suas caixas de origem. Os animais controles também foram submetidos à incisão cirúrgica, porém não houve oclusão da artéria carótida comum direita e tampouco exposição ao ambiente hipóxico.

#### **4.1.3 Tratamento Agudo com Ácido Fólico**

A solução de ácido fólico utilizada foi dissolvida em soro fisiológico e preparada na concentração 0,011 $\mu$ M/g de peso corporal (10 $\mu$ l/g de peso corporal) com o pH ajustado para 7,4 com NaOH. A solução foi injetada por via

intraperitoneal 24 horas antes, imediatamente antes e 12 horas após o procedimento de hipóxia-isquemia, continuando de 24 em 24 horas até o último dia de avaliação dos animais (Lalonde et al., 1993 adaptado por Matté et al., 2007).

#### **4.1.4 Análises comportamentais:**

As análises dos marcos do desenvolvimento foram realizadas 24 horas antes e 24 horas após a hipóxia-isquemia neonatal para todos os animais e o grupo de animais que foi submetido a eutanásia 7 dias após a HI foi avaliado, também, três e cinco dias após a indução do insulto hipóxico-isquêmico. Todos os testes foram baseados nos protocolos de Lubics e colaboradores (2005), Marcuzzo e colaboradores (2010) e Sanches e colaboradores (2012).

#### **Aversão à queda:**

Os animais foram posicionados com os membros dianteiros e o focinho voltados para a borda de uma mesa. Foi analisado o tempo que o animal leva para se virar e se locomover em sentido oposto à borda, sendo 60 segundos o tempo máximo para execução do teste.



## **Endireitamento**

Os animais foram colocados na posição de decúbito dorsal e foi avaliada a latência para eles se virarem para a posição de decúbito ventral, com os quatro membros no chão. O tempo máximo de teste era de 30 segundos.

## **Geotaxia Negativa:**

Os animais foram submetidos a um plano inclinado de 30° com a face virada em direção ao solo. Foi medida a latência do animal em adotar uma posição contrária, ou seja, virar-se 180° (direção cefálica contrária ao solo). Ao ser realizado o movimento, foi registrada para o animal a resposta (+), caso contrário (-). O tempo máximo do teste foi de 60 segundos.

## **Locomoção:**

O animal foi posicionado no centro de um círculo em uma folha de papel branca de 13 cm de diâmetro e foi avaliada a latência para sair do círculo com os quatro membros. O tempo máximo deste era de 30 segundos.

## **Comportamento olfatório:**

O teste foi realizado em uma caixa de acrílico retangular transparente (400x320x200mm), onde o animal foi exposto de um dos lados à maravalha da caixa-moradia e de outro à maravalha limpa. Foi verificada a latência para direcionar-se à maravalha da caixa-moradia ou a limpa (quando recebia valor

máximo do teste). Cada animal foi posicionado na linha média entre as duas porções de maravalha voltado para a linha central da caixa. O tempo máximo destinado ao teste era de 300 segundos. Este teste foi realizado apenas nos dias 6 e 8 pós-natal.

#### 4.1.5 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguido de teste de post hoc de Tukey. Os dados foram expressos como média±erro padrão. Os valores foram considerados significativos para  $p<0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas através do Software Statistica.

## 4.2 Resultados

### 1. *Vinte e quatro horas antes e vinte e quatro horas depois do procedimento de hipóxia-ischemia*

Aversão à queda: o resultado geral da ANOVA de medidas repetidas mostrou significância na variável dia ( $F(1,154) = 14,88, p<0,05$ ) e na interação lesão X tratamento ( $F(1,154) = 8,46, p<0,05$ ). O teste *post hoc* de Tukey demonstrou que o grupo controle tratado com ácido fólico (CTAF) diminuiu a latência para se esquivar da borda da primeira para a segunda avaliação ( $p<0,05$ ). Ainda, no

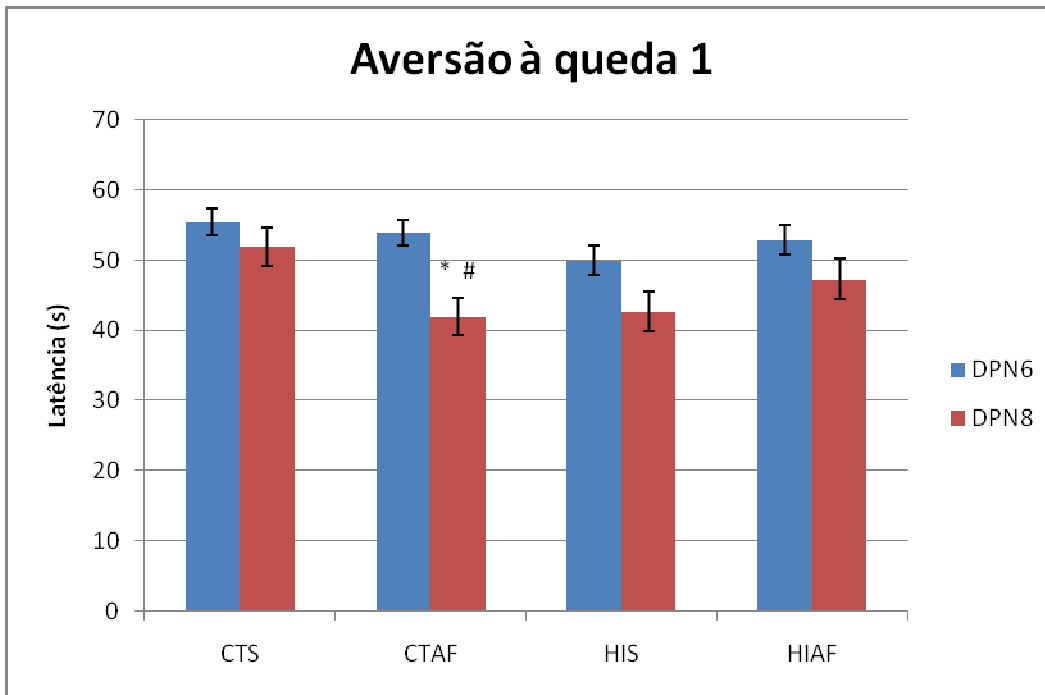
8º DPN, o grupo CTS levou mais tempo que o CTAF para engatinhar em direção contrária à borda ( $p < 0,05$ ) (Fig.1).

Endireitamento: o resultado geral da ANOVA apresentou significância na variável dia ( $F(1,152) = 36,24, p < 0,05$ ) e o teste de *post hoc* revelou que os grupos tratados com ácido fólico obtiveram uma melhor desempenho no segundo dia quando comparado com o primeiro ( $p < 0,05$ ) (Fig.2).

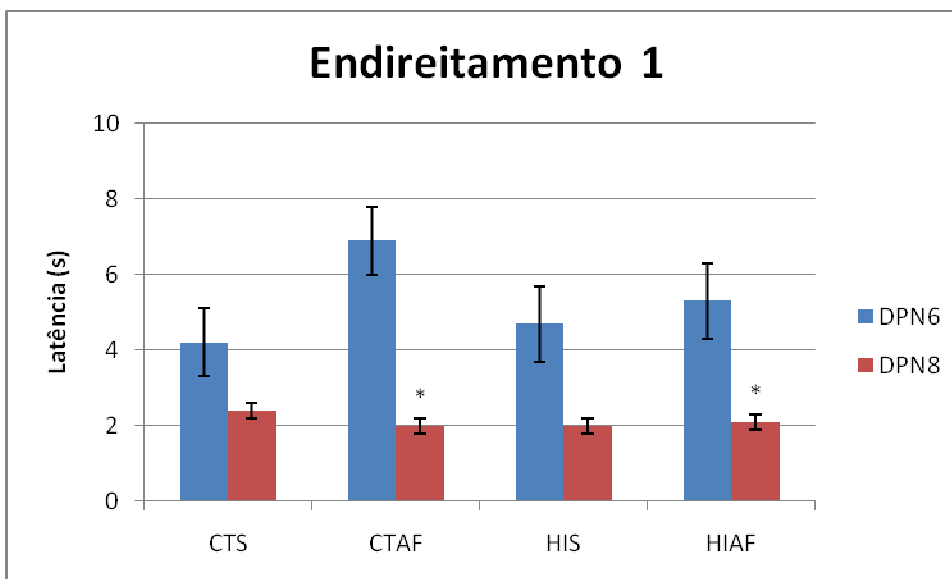
Geotaxia negativa: a ANOVA seguida do teste de Tukey demonstrou que todos os grupos, com exceção do CTS, diminuíram o tempo para se virar em direção contrária ao solo no segundo dia de avaliação, comparando-se com o primeiro (CTAF:  $p < 0,005$ ; HIS:  $p < 0,001$ ; HIAF:  $p < 0,001$ ) (Fig.3).

Locomoção: o resultado geral da ANOVA de medidas repetidas não mostrou efeito em nenhum dos parâmetros analisados, como mostrado na figura 4.

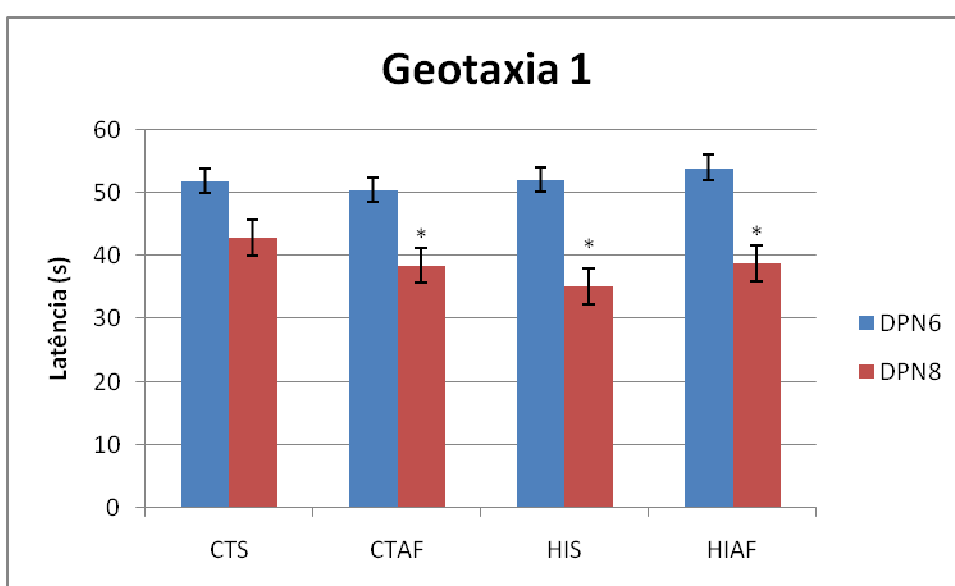
Comportamento olfatório: houve efeito nas variáveis tratamento ( $F(1,153) = 4,87, p < 0,05$ ) e dia ( $F(1,153) = 72,73, p < 0,05$ ). Todos os grupos diminuíram o tempo para alcançar a maravalha da caixa-moradia no 8º DPN quando comparado com o 6º DPN (CTS:  $p < 0,001$ ; CTAF:  $p < 0,001$ ; HIS:  $p < 0,01$ ; HIAF:  $p < 0,01$ ), entretanto não foram evidenciadas diferenças entre os grupos (Fig.5).



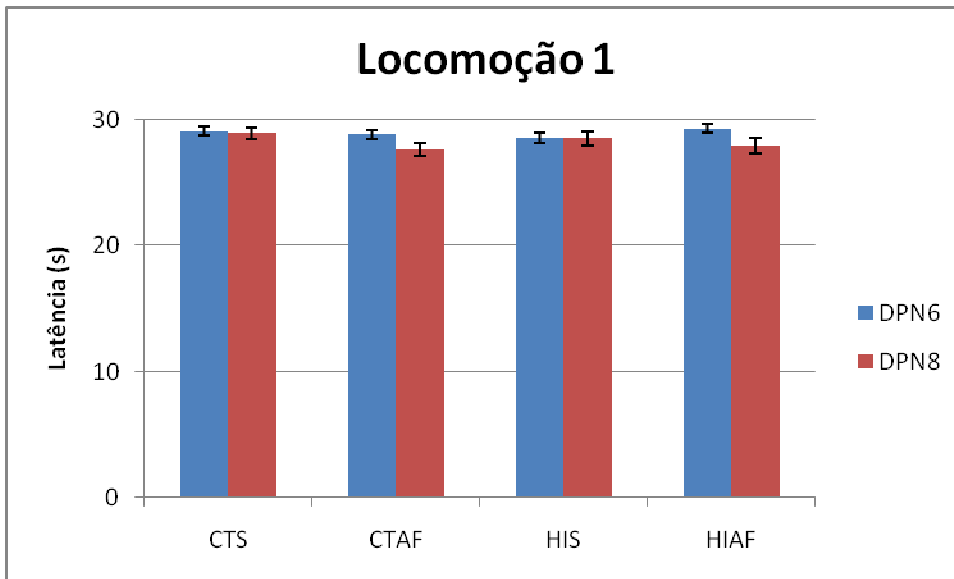
**Figura 1.** Latência para se locomover em sentido contrário à borda da mesa (tempo máximo para execução do teste=60s). \* Diferença do DPN8 quando comparado com o DPN6. # CTAF é diferente do CTS no DPN8. Os dados foram expressos como média±erro padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . CTS=controle tratado com salina (n=41), CTAF=controle tratado com ácido fólico (n=43), HIS=hipóxia-isquemia tratado com salina (n=37) e HIAF=hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico (n=37).



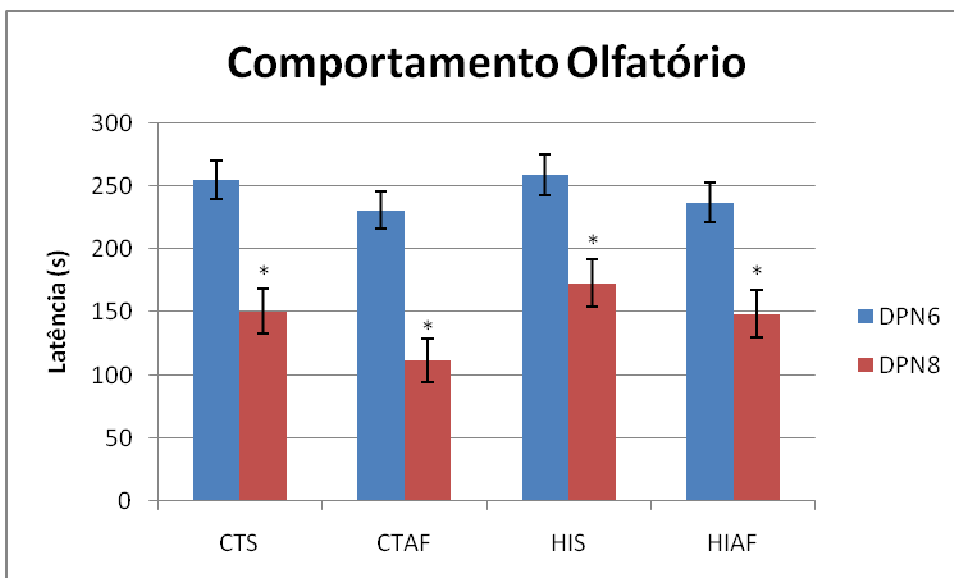
**Figura 2.** Latência para saírem da posição de decúbito dorsal para ventral, com os quatro membros no chão (tempo máximo de 30s). \* Diferença do DPN8 quando comparado com o DPN6. Os dados foram expressos como média±erro padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . CTS=controle tratado com salina (n=41), CTAF=controle tratado com ácido fólico (n=43), HIS=hipóxia-isquemia tratado com salina (n=37) e HIAF=hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico (n=37).



**Figura 3.** Latência para se locomover em sentido contrário ao solo (tempo máximo 60s). \* Diferença do DPN8 quando comparado com o DPN6. Os dados foram expressos como média±erro padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . CTS=controle tratado com salina (n=41), CTAF=controle tratado com ácido fólico (n=43), HIS=hipóxia-isquemia tratado com salina (n=37) e HIAF=hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico (n=37).



**Figura 4.** Latência para sair do círculo com os quatro membros (tempo máximo 30s). Os dados foram expressos como média±erro padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . CTS=controle tratado com salina (n=41), CTAF=controle tratado com ácido fólico (n=43), HIS=hipóxia-isquemia tratado com salina (n=37) e HIAF=hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico (n=37).



**Figura 5.** Latência para direcionar-se à maravalha da caixa-moradia (tempo máximo 300s). \* Todos os grupos são diferentes no DPN8 quando comparados com o DPN6. Os dados foram expressos como média±erro padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . CTS=controle tratado com salina (n=41), CTAF=controle tratado com ácido fólico (n=43), HIS=hipóxia-isquemia tratado com salina (n=37) e HIAF=hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico (n=37).

## 2. Animais submetidos a todas as avaliações

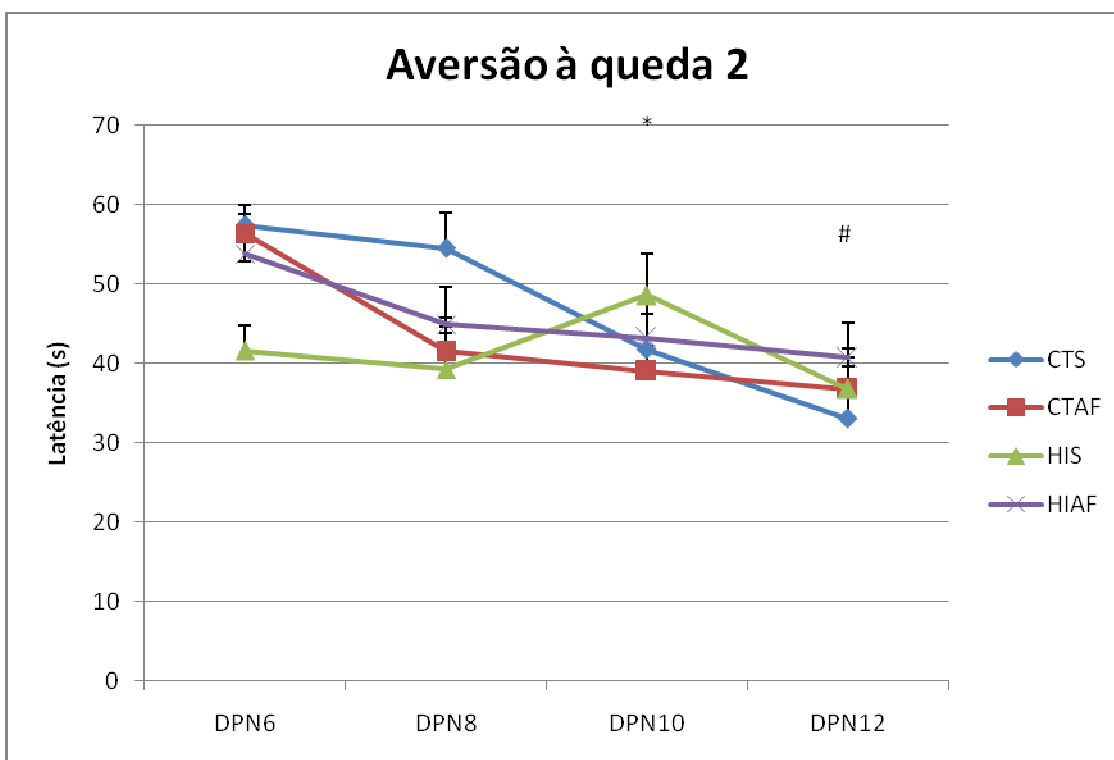
Aversão à queda: houve efeito nas variáveis dia ( $F(3,165) = 9,89$ ,  $p < 0,05$ ) e interação dia X lesão ( $F(3,165) = 3,19$ ,  $p < 0,05$ ). No 10º DPN, o grupo CTAF ( $p < 0,05$ ), e no 12º DPN os grupos controles diminuíram a latência para realizar a tarefa (CTS:  $p < 0,001$ ; CTAF:  $p < 0,05$ ), comparando-se com o 6º DPN (Fig.6).

Endireitamento: também foi indicado efeito na variável dia ( $F(3,165) = 13,87$ ,  $p < 0,05$ ) e o teste *post hoc* mostrou que os grupos tratados com ácido fólico tiveram uma melhora no 12º DPN em relação ao 6º DPN (CTAF:  $p < 0,05$ ; HIAF:  $p < 0,05$ ) (Fig.7).

Geotaxia negativa: o resultado geral da ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito na variável dia ( $F(3,165) = 101,81$ ,  $p < 0,05$ ), mostrando que todos os grupos levaram menos tempo para engatinhar na direção contrária ao solo no 12º DPN em relação ao 6º e 8º DPN (CTS:  $p < 0,001$ ; CTAF:  $p < 0,001$ ; HIS:  $p < 0,001$ ; HIAF:  $p < 0,001$ ) (Fig.8).

Locomoção: o resultado geral da ANOVA mostrou efeito em: dia ( $F(3,165) = 65,20$ ,  $p < 0,05$ ), interação dia X tratamento ( $F(3,165) = 2,78$ ,  $p < 0,05$ ), interação dia X lesão X tratamento ( $F(3,165) = 3,29$ ,  $p < 0,05$ ) e uma tendência na

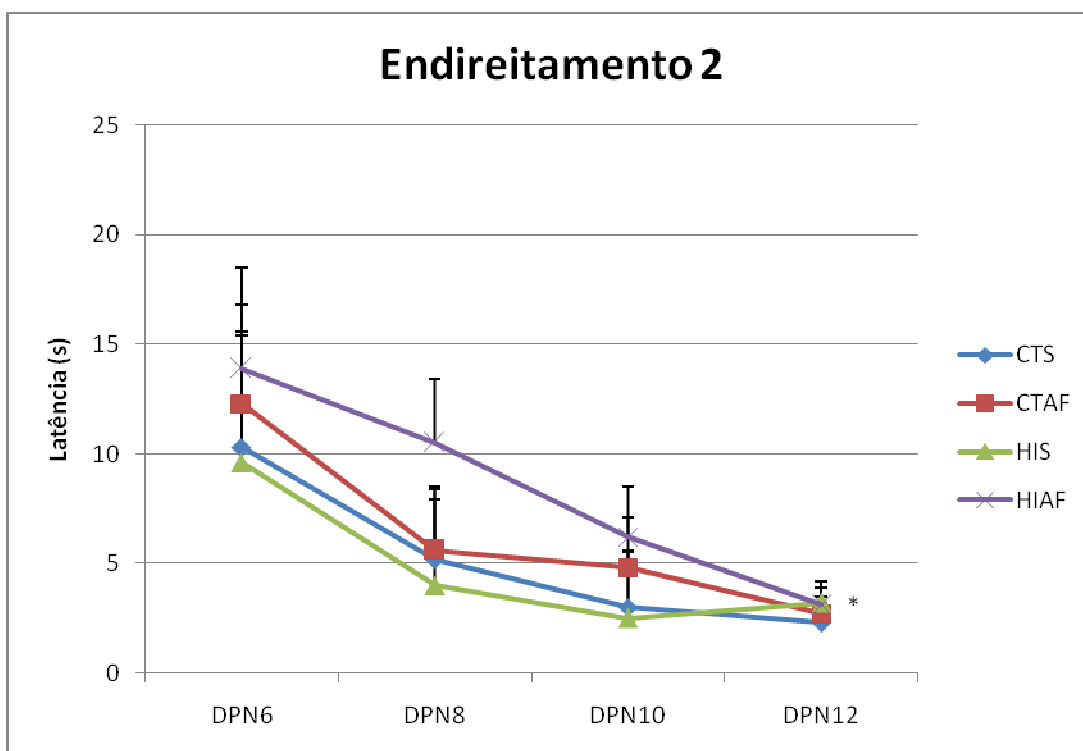
interação dia X lesão ( $F(3,165) = 2,54, p=0,057$ ). No 12º DPN todos os grupos melhoraram seu desempenho em comparação com o 6º e 8º DPN ( $p<0,005$  para todos os grupos). Ademais, no 12º DPN os grupos controles (CTS:  $p<0,001$ ; CTAF:  $p<0,05$ ) e HIAF ( $p<0,005$ ) levaram menos tempo para executar a tarefa do que no dia pós-natal 10. Ainda, o grupo CTS teve um melhor desempenho que os grupos CTAF e HIAF no 12º DPN ( $p<0,05$ ) (Fig.9).



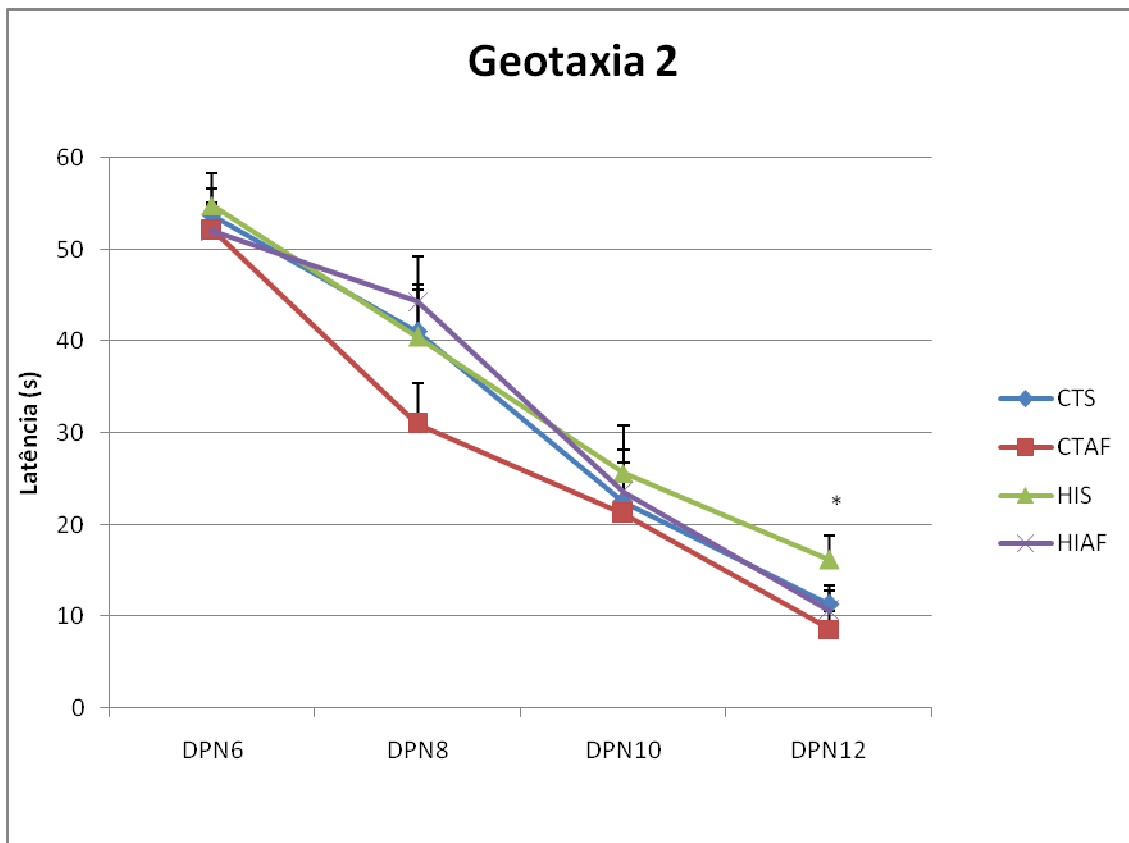
**Figura 6.** Latência para se locomover em sentido contrário à borda da mesa (tempo máximo 60s). \* Diferença do grupo CTAF no DPN10 quando comparado com o DPN6. # CTAF e CTS são diferentes no DPN12 quando comparados com o DPN6, respectivamente. Os dados foram expressos como média±erro padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p<0,05$ . CTS=controle tratado com salina (n=16), CTAF=controle tratado com ácido fólico (n=18), HIS=hipóxia-isquemia



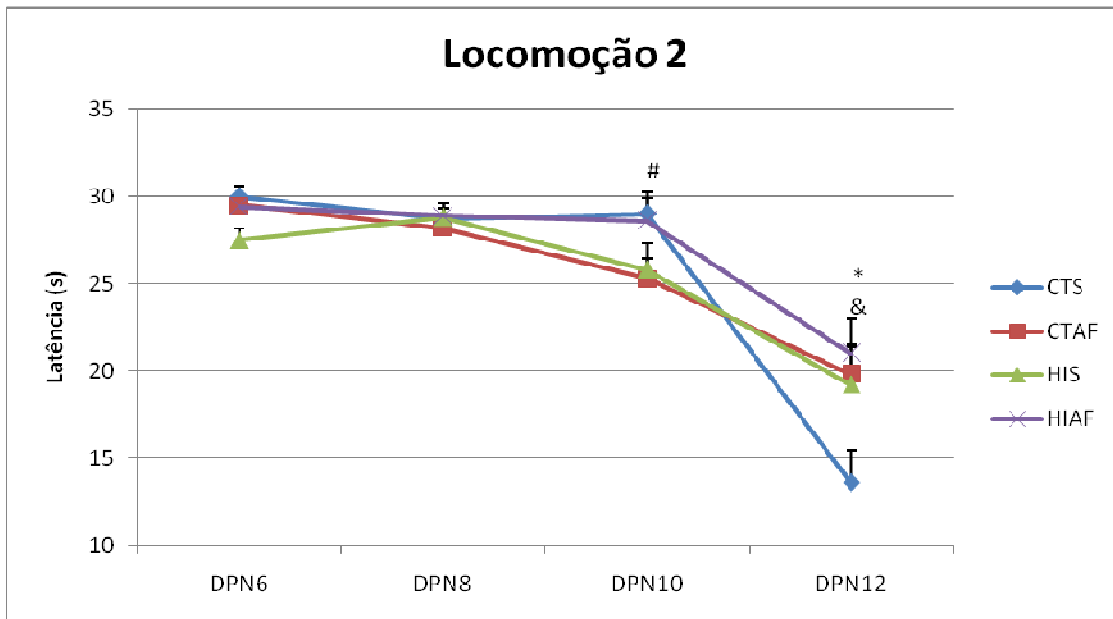
tratado com salina (n=11) e HIAF=hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico (n=14).



**Figura 7.** Latência para saírem da posição de decúbito dorsal para ventral, com os quatro membros no chão (tempo máximo 30s). \* Diferença do DPN12 quando comparado com o DPN6 nos grupos CTAF e HIAF. Os dados foram expressos como média±erro padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . CTS=controle tratado com salina (n=16), CTAF=controle tratado com ácido fólico (n=18), HIS=hipóxia-isquemia tratado com salina (n=11) e HIAF=hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico (n=14).



**Figura 8.** Latência para se locomover em sentido contrário ao solo (tempo máximo 60s). \* Diferença DPN12 quando comparado com o DPN6 e 8 em todos os grupos. Os dados foram expressos como média±erro padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . CTS=controle tratado com salina (n=16), CTAF=controle tratado com ácido fólico (n=18), HIS=hipóxia-isquemia tratado com salina (n=11) e HIAF=hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico (n=14).



**Figura 9.** Latência para sair do círculo com os quatro membros (tempo máximo 30s). \* Todos os grupos são diferentes no DPN12 quando comparado com DPN 6 e 8. # CTS, CTAF e HIAF são diferentes no DPN10 quando comparado com o DPN12. & CTS é diferente do CTAF e do HIAF no DPN12. Os dados foram expressos como média±erro padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . CTS=controle tratado com salina (n=16), CTAF=controle tratado com ácido fólico (n=18), HIS=hipóxia-isquemia tratado com salina (n=11) e HIAF=hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico (n=14).

### 4.3 DISCUSSÃO

Considerando os resultados das avaliações realizadas vinte e quatro horas antes e após o procedimento da hipóxia-isquemia neonatal, podemos observar que não houve diferenças expressivas mostrando efeito tanto da lesão quanto do tratamento. Foi possível observar a evolução natural da expressão dos diferentes comportamentos avaliados, com melhor desempenho ao longo dos dias, independente da HI, bem como possível efeito da suplementação com ácido fólico.

Até o momento, poucos estudos têm utilizado a avaliação de marcos de desenvolvimento no modelo de hipóxia-isquemia neonatal (Ten et al., 2003; Lubics et al., 2005; Sanches et al., 2012). Contudo, em humanos que sofreram asfixia severa, a análise de reflexos neonatais mostrou ser altamente preditiva no desenvolvimento tardio de paralisia cerebral e retardo mental (Ishikawa et al., 1987; Zafeiriou et al., 1999; Zafeiriou, 2004). Assim, através da utilização dessas avaliações pode-se estabelecer ainda mais possibilidades de comparações entre a encefalopatia hipóxico-isquêmica, especialmente o modelo de Levine (1960) modificado por Rice (1981), em roedores com neonatos humanos. Da mesma maneira como encontrado em humanos, o comprometimento no desempenho nos testes dos marcos do desenvolvimento em roedores poderia prever déficits futuros. Ten e colaboradores (2003) mostraram em seu trabalho que os testes realizados (endireitamento, aversão à queda e geotaxia negativa) 1 e 24 horas após a HI foram um indicador sensível de danos neurofuncionais a longo prazo, bem como de atrofia

cerebral. Porém, é possível encontrar resultados inconsistentes que podem ser explicados tanto pelo modelo utilizado (oclusão da carótida direita ou esquerda, tempo de hipóxia de 30, 60, 90 ou 120 minutos e dia pós natal em que o procedimento é realizado) quanto pelo período em que as avaliações são realizadas, sendo algumas 1 hora após, 4 horas, 24 horas ou ao longo de um período (Ten et al., 2003; Lubics et al., 2005; Sanches et al., 2012; Brockmann et al., 2013).

No presente estudo, observamos que ao longo do tempo o desempenho dos animais hipóxico-isquêmicos em quase todos os testes se igualou ao desempenho dos animais controles, corroborando com os dados apresentados por Lubics e colaboradores (2005) e Brockmann e colaboradores (2013). Tal resultado pode representar a alta plasticidade encefálica presente nos animais neonatos, sendo bem maior que nos humanos neonatos (Barth & Stanfield, 1990; Felt et al., 2002).

Estudos envolvendo outros modelos de paralisia cerebral também utilizaram a avaliação de aparecimento de alguns marcos do desenvolvimento e também não encontraram expressivas diferenças em relação aos controles (Marcuzzo et al., 2010; Stigger et al., 2013). Acreditamos que devido à importância ontogênica do aparecimento desses reflexos para a sobrevivência da espécie, eles não seriam tão seriamente afetados por alguns danos, como a hipóxia-isquemia neonatal, nesse caso (Fox, 1985).

A partir dos nossos resultados foi possível observar algum efeito do tratamento com ácido fólico. Porém, acreditamos ser muito precoce afirmar esse efeito benéfico, ainda mais por que não foi encontrado em todos os

testes. Contudo alguns trabalhos já demonstraram melhoras comportamentais a partir da suplementação com ácido fólico (Lalonde et al., 1993; Budni et al., 2011; Brocardo et al., 2012; Budni et al., 2013), inclusive um trabalho do nosso grupo nesse modelo de hipóxia-isquemia neonatal (Carletti et al., 2012). Zhang e colaboradores (2012) em seu estudo demonstraram que o tratamento com ácido fólico aumentou a proliferação celular no hipocampo em um modelo de isquemia em adultos. Possivelmente esse pode ser um dos mecanismos pelos quais o ácido fólico leva a melhoras cognitivas em diversos modelos de doenças (Czeizel and Duda's, 1992; Mattson & Shea, 2003; Assaneli et al., 2004).

Resumidamente, a partir da avaliação dos marcos do desenvolvimento foi possível observar que ao longo do tempo todos os grupos apresentam um mesmo desempenho, demonstrando uma melhora por parte dos animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal, bem como um possível efeito do tratamento com ácido fólico.

## **5. DISCUSSÃO GERAL**

Nossos resultados mostraram que ao longo de um período de tempo todos os animais passam a apresentar o mesmo desempenho nos reflexos neurológicos, não sendo evidenciado um grande déficit por conta da hipóxia-isquemia neonatal. Também foi possível observar que em alguns testes o

tratamento com ácido fólico melhorou o desempenho tanto de animais controles quanto submetido à HI. Ainda analisamos a morte neuronal 24 horas após a HI na região CA1 do hipocampo dorsal e foi possível verificar uma grande degeneração celular, especialmente por necrose. Ademais, foi possível mais uma vez verificar que o tratamento com ácido fólico reduziu a degeneração ocorrida após a lesão.

Como já mencionado anteriormente, a avaliação de alguns marcos do desenvolvimento são importantes indicadores preditivos de futuras seqüelas como a paralisia cerebral, retardo mental, déficits cognitivos e motores tanto em humanos quanto em ratos (Ishikawa et al., 1987; Zafeiriou et al., 1999; Ten et al., 2003; Zafeiriou, 2004). Contudo, os resultados encontrados no modelo de hipóxia-isquemia neonatal ainda são bastante controversos (Ten et al., 2003; Lubics et al., 2005; Sanches et al., 2012; Brockmann et al., 2013). No presente estudo não foi observado prejuízos na maturação dos reflexos após o procedimento de hipóxia-isquemia neonatal. Talvez isso ocorra devido à importância do aparecimento desses reflexos para a sobrevivência da espécie; sendo estes então preservados (Fox, 1985). Também é importante ressaltar que nesse modelo não são encontrados prejuízos motores significativos, já que os animais se locomovem e se alimentam normalmente após a lesão. Outro fator que influencia essa melhora é o fato da alta plasticidade presente em ratos neonatos (Barth & Stanfield, 1990; Felt et al., 2002).

No estudo morfológico foi observada expressiva degeneração e perda celular na região CA1 do hipocampo ipsilateral à oclusão arterial. Já é bem estabelecido que o dano na HI é progressivo, podendo ocorrer morte celular

tanto por apoptose quanto por necrose durante dias e até semanas após um evento isquêmico (McLean & Ferriero, 2004; Hossain, 2008; Carloni et al., 2007). Tal processo culmina com a atrofia de diversas estruturas, como córtex cerebral, estriado e hipocampo, levando a déficits cognitivos em ratos jovens e adultos (Arteni et al., 2003; Pereira et al., 2007; Pereira et al., 2008; Rojas et al., 2013).

Nossos resultados mostraram que 24 horas após a lesão há predominância de morte celular por necrose e não por apoptose, corroborando com os resultados de Nakajima e colaboradores (2000), Carloni et al., 2007 e Ness et al. (2008). Também foi possível observar a ocorrência de um “*continuum*” apoptose-necrose na análise por microscopia eletrônica, onde as células apresentam características de ambos os fenótipos de morte celular (Nakajima et al., 2000; Sheldon et al., 2001; Liu et al., 2004; Northington et al., 2007).

O tratamento com ácido fólico se mostrou eficaz na diminuição e/ou prevenção da degeneração celular em 24 horas após a HI neonatal, bem como na maturação de alguns reflexos importantes no desenvolvimento. Nosso grupo já mostrou que o tratamento crônico com ácido fólico foi capaz de reverter o prejuízo na memória aversiva bem como a inibição da atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase no estriado e no córtex cerebral que ocorrem em decorrência da lesão hipóxico-isquêmica neonatal (Carletti et al., 2012). Outros estudos já mostraram efeitos antiapoptóticos (Jia et al., 2008; Majumdar et al., 2012), antioxidante (Joshi et al., 2001; Stanger e Wonisch, 2012) e de proliferação celular (Zhang et al., 2012) após a suplementação com ácido fólico.



Possivelmente esses são alguns dos mecanismos pelos quais o ácido fólico exerce seus efeitos benéficos após a lesão hipóxico-isquêmica, já que o estresse oxidativo e a intensa morte neuronal estão entre as principais vias que levam ao dano após o insulto.

Em conjunto, os resultados deste estudo permitem concluir que a hipóxia-isquemia encefálica neonatal gera uma intensa degeneração celular na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas após o evento e que essa perda celular não gera alteração na maturação de reflexos do desenvolvimento dos animais. O tratamento com ácido fólico foi capaz de prevenir/reverter, pelo menos em parte, a degeneração celular e melhorar o desempenho dos animais em alguns testes dos marcos do desenvolvimento. Estudos que visem conhecer mais profundamente os mecanismos envolvidos na patologia da hipóxia-isquemia encefálica neonatal, bem como a busca de novas terapias são de suma importância para melhorar ou prevenir os déficits dessa lesão que, muitas vezes, são graves, incapacitantes e permanentes.

## 6. CONCLUSÕES:

- Vinte e quatro horas após a hipóxia-isquemia neonatal não foi observada alteração no número de células positivas para caspase-3 clivada na região CA1 do hipocampo em nenhum dos grupos experimentais, indicando que não há predominância de morte celular por apoptose nesse período;
- A hipóxia-isquemia neonatal causa diminuição de células neuronais na região CA1 do hipocampo e o tratamento com ácido fólico parece diminuir/prevenir essa perda neuronal;
- A hipóxia-isquemia neonatal resultou em degeneração celular 24 horas após o evento lesivo no hipocampo direito, porém foi mais visível a presença de células com características necróticas do que apoptóticas, bem como a presença do “*continuum*” apoptose-necrose. O tratamento com ácido fólico teve como consequência uma maior quantidade de células íntegras ou em estágio de degeneração mais inicial, indicando um possível efeito do tratamento;
- Não foram encontradas diferenças expressivas na avaliação dos reflexos do desenvolvimento pela lesão, porém foi encontrado um possível efeito pelo tratamento com ácido fólico nos testes de aversão à queda e endireitamento.

## **7. PERSPECTIVAS:**

- Quantificar o número de células totais e de células positivas para caspase-3 clivada no hipocampo 48 horas e 7 dias após a hipóxia-isquemia neonatal para verificar o padrão de morte celular ao longo do tempo após a lesão;
- Analisar a atividade de diferentes caspases 24, 48 horas e 7 dias após a lesão no hipocampo, estriado e córtex cerebral;
- Caracterizar os neurônios e o possível padrão de morte celular no hipocampo contralateral à lesão (esquerdo), vinte e quatro horas após a hipóxia-isquemia neonatal, por microscopia eletrônica.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA (2003), Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res* 973(2): 171-178.

Assanelli D, Bonamone A, Pezzini A, Albertini F, Maccali P, Grassi M, Archetti S, Negrini R, Visioli F (2004), Folic Acid and Vitamin E Supplementation Effects on Homocysteinemia, Endothelial Function and Plasma Antioxidant Capacity in Young Myocardial-Infarction Patients. *Pharmacol Res* 49: 79-84.

Barp J (2007). Avaliação do Dano Oxidativo e Função Cardiovascular em Diferentes Modelos de Hiperhomocisteína: Papel Protetor do Folato e do Estrogênio. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Barth TM, Stanfield BB (1990), The recovery of forelimb-placing behavior in rats with neonatal unilateral cortical damage involves the remaining hemisphere. *J Neurosci* 10: 3449–59.

Blom HJ, Smulders Y (2011), Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis* 34: 75 –81.

Bona E, Johansson BB, Hagberg H (1997), Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatr Res* 42 (5): 678-683.

Brocardo PS, Budni J, Pavesi E, Franco JL, Uliano-Silva M, Trevisan R, Terenzi MG, Dafre AL, Rodrigues AL (2010), Folic acid administration prevents ouabain-induced hyperlocomotion and alterations in oxidative stress markers in the rat brain. *Bipolar Disord* 12(4): 414–424.

Brockmann MD, Kukovic M, Schönfeld M, Sedlacik J, Hanganu-Opatz IL (2013), Hypoxia-Ischemia Disrupts Directed Interactions within Neonatal Prefrontal-Hippocampal Networks. *PLoS One* 8(12): e83074.

Budni J, Freitas AE, Binfaré RW, Rodrigues AL (2012), Role of potassium channels in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 101(1): 148–154.

Budni J, Zomkowski AD, Engel D, Santos DB, dos Santos AA, Moretti M, Valvassori SS, Ornell F, Quevedo J, Farina M, Rodrigues AL (2013), Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Exp Neurol* 240: 112–121.

Carletti JV, Deniz BF, Miguel PM, Rojas JJ, Kolling J, Scherer EB, de Souza Wyse AT, Netto CA, Pereira LO (2012), Folic acid prevents behavioral impairment and Na(+), K(+)-ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochem Res* 37(8): 1624-30.

Carlioni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini A (2007), Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Journal Pienal Reserch* 44: 157-167

Czeizel AE, Duda's I (1992), Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 26: 1832–1835.

Distefano G, Praticò AD (2010), Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ital J Pediatr* 16: 36-63.

Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007 ; 35(4): 495–516.

Edinger AL, Thompson CB (2004), Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16:663–669.

Féliz TM (2002). *Metabolismo da Homocisteína e Defeitos do Tubo Neural: um Estudo Bioquímico e Molecular no Sul do Brasil.* 2002. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas: Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Felt BT, Schallert T, Shao J, Liu Y, Li X, Barks JD (2002), Early appearance of functional deficits after neonatal excitotoxic and hypoxic–ischemic injury: fragile recovery after development and role of the NMDA receptor. *Dev Neurosci* 24: 418–25.

Ferreira AFS (2005). *Consumo de farináceos fortificados e de alimentos ricos em folatos por mulheres em idade fértil de Porto Alegre, RS, Brasil.* 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas: Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Ferrer I, Planas AM (2003), Signaling of Cell Death and Cell Survival Following Focal Cerebral Ischemia: Life and Death Struggle in the Penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(4): 329-339.

Fox MW (1965), Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim Behav* 13 :234–41.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. Revista Brasileira de Cancerologia 2007; 53(3): 335-343

Hossain MA (2008), Hipoxic-Ischemic Injury in Neonatal Brain: Involvement of a Novel Neuronal Molecule in Neuronal Cell Death and Potential Target for Neuroprotection. Int J Dev Neurosci 29: 93-101.

Hyland K, Shoffner J, Heales SJ (2010), Cerebral folate deficiency. J Inherit Metab Dis 33: 563–570.

Ikeda, T (2008), Stem cells and neonatal brain injury Cell Tissue Res 331(1): 263-269.

Ishikawa T, Ogawa Y, Kanayama M, Wada Y (1987), Long-term prognosis of asphyxiated full-term neonates with CNS complications. Brain Dev 9(1): 48–53.

Jia DY, Liu HJ, Wang FW, Liu SM, Ling EA, Liu K, Hao AJ (2008), Folic acid supplementation affects apoptosis and differentiation of embryonic neural stem cells exposed to high glucose. Neurosci Lett 440(1): 27–31.

Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W (2001), Neurobiology of Hypoxic-Ischemic Injury in the Developing Brain. Pediatr Res 49(6): 735-41.

Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T (2001), Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. Free Radic Biol Med 30: 1390–1399.

Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N (2010), Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. Early Hum Dev 86: 329–38.

Lai M & Yang SN. Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2011, Article ID 609813, 6 pages

Lalonde R, Joyal CC, Botez MI (1993), Effects of Folic Acid and Folinic Acid on Cognitive and Motor Behaviors in 20-Month-Old Rats. *Pharmacol Biochem Behav* 44(3): 703-707.

Levine S (1960), Anoxic–ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36: 1–17.

Liu CL, Siesjo BK, Hu BR (2004), Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia–ischemia changes during brain development. *Neuroscience* 127: 113–123.

Lubics A, Reglodi D, Tamás A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I (2005), Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic–ischemic injury. *Behav Brain Res* 157(1): 157–165.

Majumdar S, Maiti A, Karmakar S, Das AS, Mukherjee S, Das D, Mitra C (2012), Antiapoptotic Efficacy of Folic Acid and Vitamin B12 Against Arsenic-Induced Toxicity. *Environ Toxicol* 27(6): 351-63.

Marcuzzo S, Dutra MF, Stigger F, do Nascimento PS, Ilha J, Kalil-Gaspar PI, Achaval M , Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain Dev* 32(4) 323–331.

Matté C, Scherer EBS, Stefanello FM, Barschak AG, Vargas CR, Netto CA, Wyse ATS (2007), Concurrent folate treatment prevents Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and memory impairments caused by chronic hyperhomocysteinemia during rat development. *Int J Dev Neurosci* 25: 545-552.



Mattson MP, Shea TB (2003), Folate and homocysteine metabolism in neuralplasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26(3): 137-46.

Mclean C, Ferriero D (2004), Mechanisms of Hypoxic-Ischemic Injury in the Tern Infant. *Semin Perinatol* 28: 425-432.

Meshkin B, Blum K (2007), Folate nutrigenetics: A convergence of dietary folate metabolism, folic acid supplementation and folate antagonism pharmacogenetics. *Drug Metab Lett* 1: 55-60.

Mwaniki MK, Atieno M, Lawn JE, Newton CR (2012), Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *Lancet* 379: 445–52.

Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV (2000), Apoptosis Has a Prolonged Role in the Neurodegeneration after Hypoxic Ischemia in the Newborn Rat. *J Neurosci* 20(21): 7994-8004.

Ness JM, Harvey CR, Washington JD, Roth KA, Carroll SL, Zhang J (2008), Differential activation of c-Fos and caspase-3 in hippocampal neuron subpopulations following neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci Res* 86(5): 1115–1124.

Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ. Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. *Neurobiology of Disease* 8, 207–219 (2001).

Northington FJ, Zelaya ME, O'Riordan DP, Blomgren K, Flock DL, Hagberg H, Ferriero DM, Martin LJ (2007), Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia–ischemia manifests as “continuum” phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain. *Neuroscience* 149(4): 822–833.

Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal Cell Death in Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Ann Neurol* 2011;69:743–758.

Oliveira, ALP (2008). Epidemiologia dos Defeitos de Fechamento do Tubo Neural no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, da Rocha AP, Achaval M, Netto CA (2007), Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia–ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 87: 101–108.

Pereira LO, Strapasson AC, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA (2008), Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia–ischemia. *Brain Res* 1218: 257–266.

Procianoy Rs, Silveira Rc (2001), Hypoxic-Ischemic Syndrome. *Jornal de Pediatria Sociedade Brasileira de Pediatria* 77, Supl 1/S63.

Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981), The influence of immaturity on hypoxic–ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9: 131–141.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Fundamentos de Robbins. Patologia Estrutural e Funcional*. 6ª Ed., 2000

Rojas JJ, Deniz BF, Miguel PM, Diaz R, Hermel Edo E, Achaval M, Netto CA, Pereira LO (2013), Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Exp Neurol* 241: 25-33.

Sanches EF, Arteni NS, Spindler C, Moysés F, Siqueira IR, Perry ML, Netto CA (2012), Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic–ischemic rats. *Brain Res* 1438: 85–92.

Sanders RD, Patel N, Hossain M, Ma D, Maze M (2005), Isoflurane exerts antinociceptive and hypnotic properties at all ages in fischer rats. *Br J Anaesth* 95(3): 393–399.

Sheldon RA, Hal JJ, Noble LJ, Ferriero DM (2001), Delayed cell death in neonatal mouse hippocampus from hypoxia-ischemia is neither apoptotic nor necrotic. *Neurosci Lett* 304(3): 165-8.

Siegel G, Alberts RW, Brady S, Price D (2006). *Basic neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Ch. 32 p. 561. 7<sup>a</sup> Ed.

Stanger O, Wonisch W (2012), Enzymatic and non-enzymatic antioxidative effects of folic acid and its reduced derivatives. *Subcell Biochem* 56: 131–161.

Stigger F, Lovatel G, Marques M, Bertoldi K, Moysés F, Elsner V, Siqueira IR, Achaval M, Marcuzzo S (2013), Inflammatory response and oxidative stress in developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS and perinatal anoxia. *Int. J. Dev Neurosci* 31(8): 820–827.

Ten VS, Bradley-Moore M, Gingrich JA, Stark RI, Pinsky DJ (2003), Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behav Brain Res* 145(1-2): 209–219.

Weis SN, Schunck RV, Pettenuzzo LF, Krolow R, Matté C, Manfredini V, do Carmo R Peralba M, Vargas CR, Dalmaz C, Wyse AT, Netto CA (2011), Early biochemical effects after unilateral hypoxia–ischemia in the immature rat brain. *Int J Dev Neurosci* 29(2): 115–120.

Yuan J, Lipinski M, Degterev A (2003), Diversity in the Mechanisms of Neuronal Cell Death. *Neuron* 40(2): 401–413.

Zafeiriou DI, Tsikoulas IG, Kremenopoulos GM, Kontopoulos EE (1999), Moro reflex profile in high-risk infants at the first year of life. *Brain Dev* 21(3): 216–7.

Zafeiriou DI (2004), Primitive reflexes and postural reactions in the neurodevelopmental examination. *Pediatr Neurol* 31(1): 1-8.

Zhang X, Huang G, Liu H, Chang H, Wilson JX (2012), Folic acid enhances Notch signaling, hippocampal neurogenesis, and cognitive function in a rat model of cerebral ischemia. *Nutr Neurosci* 15(2): 55-61.