



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

**Efeitos da administração de galantamina no modelo de Hipóxia-
Isquemia neonatal em ratos**

Felipe Kawa Odorcyk

Porto Alegre, fevereiro de 2015.



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Efeitos da administração de galantamina no modelo de Hipóxia-
Isquemia neonatal em ratos**

Felipe Kawa Odorcyk

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Porto Alegre, fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Carlos Alexandre Netto por acreditar nas minhas ideias, pela oportunidade e pelos seus ensinamentos.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelos recursos para a realização do projeto e pela bolsa.

Ao Prof. Eduardo Konrath que purificou a galantamina usada nesse trabalho.

Ao Fabrício Figueiredo pela colaboração na técnica de Citometria de Fluxo.

À Profa. Angela Wyse e Prof. Carlos Alberto Gonçalves e seus alunos, em especial, à Janaína Kolling e Adriana Vizuete, pela colaboração e parceria de trabalho.

A todos os meus colegas e amigos do laboratório 35 pelo apoio, inspiração, ajuda e companheirismo, em especial para Fabrício Nicola e Elena Duran que foram cruciais para o sucesso do trabalho.

À minha família, namorada e amigos que sempre me apoiaram e motivaram em todos os momentos.

Muito obrigado a todos! Sem vocês esse trabalho não seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Hipóxia-isquemia neonatal (HI)	10
1.2 HI e o sistema colinérgico	13
2. OBJETIVOS	19
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.2 Hipóxia-isquemia	20
3.3 Desenho Experimental	21
3.4 Purificação da galantamina a partir da forma farmacêutica comercial	22
3.5 Administração das substâncias	23
3.6 Análise histológica	23
3.7.1 Volume da lesão	23
3.8 Análises bioquímicas	24
3.8.1 Citometria	24
3.8.2 ELISA	25
3.8.2.1 ELISA de S100b	25
3.8.2.2 ELISA de GFAP	25
3.8.2.3 ELISA TNF- α	26
3.8.3 Parâmetros de estresse oxidativo	26
3.8.3.1 Medida da oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCF)	26
3.8.3.2 Medida da Superóxido Dismutase (SOD)	27
3.8.3.3 Medida da Catalase (CAT)	27
3.8.4 Atividade da acetilcolinaesterase	28
3.8.5 Dosagem de proteínas	28
3.9 Análise Estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Galantamina injetada pré-hipóxia reverte os danos teciduais causados pela HI	29
4.2 Galantamina injetada pré-hipóxia previne a redução no número de neurônios no hipocampo causada pela HI	32
4.3 Galantamina injetada pré-hipóxia previne a astrogliose reativa no hipocampo causada pela HI	34
4.4 Galantamina injetada pré-hipóxia previne a astrogliose reativa no córtex causada pela HI	36
4.5 Os níveis de TNF- α não foram alterados 24 horas após a lesão.	37
4.6 O número de células T colinérgicas no baço não foi alterado 24 horas após a lesão.	38
4.7 O pré-tratamento com galantamina aumenta a atividade da enzima antioxidante CAT no hipocampo 24 horas após a lesão.	39
4.8 A AChE não permanece inibida no hipocampo 24 horas após a lesão.	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	49
7. BIBLIOGRAFIA	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos da evolução da lesão neural.....	14
Figura 2. Funcionamento da via colinérgica anti-inflamatória.....	17
Figura 3. Esquema do desenho experimental.....	22
Figura 4. Histologia do hipocampo.....	31
Figura 5. Número de neurônios no hipocampo ipsilateral 24h após a lesão.....	32
Figura 6. Citometria no hipocampo ipsilateral 24h após a lesão.....	33
Figura 7. Expressão de GFAP e S100b no hipocampo ipsilateral.....	35
Figura 8. Expressão de S100b e GFAP no córtex 24h após a lesão.....	36
Figura 9. Expressão de TNF- α 24 após a lesão.	37
Figura 10. Citometria do baço 24h horas após a lesão.....	38
Figura 11. Parâmetros de estresse oxidativo e atividade da AChE no hipocampo ipsilateral 24h após a lesão.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação do protocolo de administração de substâncias.....	24
Tabela 2. Volumes das estruturas encefálicas.....	30

RESUMO

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) faz parte da etiologia de diversas patologias neurológicas e é causa de graves sequelas. Os mecanismos patofisiológicos dessa lesão começam com o insulto imediato após a HI e se estendem por dias ou semanas, pelo aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio associada a redução das defesas anti-oxidantes e reação glial, sendo a lesão secundária parte crucial no processo que culmina no dano final. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) que parece ter uma importante ação neuroprotetora após a HI. A acetilcolinaesterase (AChE) é responsável pela degradação da ACh, inibidores dessa enzima vêm sendo utilizados para o tratamento de danos neurológicos. Sua ação positiva sobre a HI foi demonstrada em estudos realizados em nosso laboratório, onde a administração do extrato de *Huperzia quadrifariata* (inibidor de AChE) reduziu os déficits cognitivos e histológicos causados por essa lesão.

Para avaliar os efeitos das administrações pré e pós-hipóxia de galantamina, inibidor da AChE, no modelo de HI perinatal, ratos Wistar no 7º dia de vida pós-natal (DPN7) foram submetidos à combinação da oclusão unilateral da artéria carótida direita e exposição a uma atmosfera hipóxica (8% de O₂) durante 60 minutos. Foram aplicadas injeções intraperitoneais de salina para os grupos Sham e HI+Salina (HIS) e de galantamina nos grupos HI+Galantamina 5 mg/kg pré-hipóxia (HIG5-Pré), HI+Galantamina 10 mg/kg pré-hipóxia (HIG10-Pré), HI+Galantamina 5 mg/kg pós-hipóxia (HIG5-Pós) e HI+Galantamina 10 mg/kg pós-hipóxia (HIG10-Pós). Os grupos Pré receberam galantamina imediatamente antes da hipóxia e os grupos Pós nos intervalos de 1, 24, 48 e 72 horas após a cirurgia.

No DPN45 foi feita a análise do volume das estruturas encefálicas que demonstrou a redução do volume do hipocampo do grupo HIS em relação ao Sham e uma prevenção desse efeito no grupo HIG10-Pré, mas não nos demais grupos. Análises bioquímicas foram feitas no hipocampo ipsilesional 24 horas após a lesão e revelaram: através da citometria de fluxo uma redução na sobrevivência de neurônios no grupo HIS em relação ao Sham que foi prevenida no grupo HIG10-Pré; através de ELISA uma hipertrofia dos astrócitos no grupo HIS que foi revertida no grupo HIG10-Pré e um aumento na atividade da enzima anti-oxidante catalase. O tratamento pré-hipóxia com galantamina foi capaz de prevenir os déficits histológicos, aumentar a sobrevivência celular, reduzir a reação astrocitária e aumentar a atividade anti-oxidante em ratos submetidos à HI.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia (HI), acetilcolinaesterase (AChE), galantamina, inflamação, neuroproteção.

ABSTRACT

Neonatal hypoxia ischemia (HI) has a role in etiology of several neurological pathologies and causes severe sequelae. The pathophysiological mechanisms of this lesion start immediately after HI and last for days or weeks, with the secondary injury being a crucial part the process that culminates in the final damage. Acetylcholine (ACh) is a neurotransmitter of the central nervous system that seems to have an important neuroprotective action after HI. Acetylcholinesterase (AChE) degrades ACh and inhibitors of this enzyme have been used to treat neurological damage. Its positive action on HI has been demonstrated in studies performed in our laboratory, where the administration of the alkaloid extract of *Huperzia quadrifariata* (An inhibitor of AChE) reduced the cognitive and histological deficits caused by this lesion.

To evaluate the effects of the pre and post-hypoxia administrations of galantamine, a cholinesterase inhibitor, in the model of perinatal HI, Wistar rats in the post-natal day 7 (PND7) were subjected to a combination of unilateral occlusion of the right carotid artery and of exposure to a hypoxic exposure (8% O₂) for 60 minutes. Intraperitoneal injections of saline in the groups Sham and HI+Saline (HIS) and of galantamine in the groups HI+Galantamine 5 mg/kg pre-hypoxia (HIG5-Pre), HI+Galantamine 10 mg/kg pre-hypoxia (HIG10-Pre), HI+Galantamine 5 mg/kg post-hypoxia (HIG5-Post) and HI+Galantamine 10 mg/kg post-hypoxia (HIG5-Post). The Pre groups received galantamine immediately before hypoxia and the Post groups in the intervals of 1, 24, 48 and 72 hours after HI.

On PND45 the analysis of the volume of brain structures showed a reduction of the volume of the ipsilesional hippocampus in the HIS group when compared to the sham and a prevention of this effect in the HIG10-Pre, but not in any other group. Biochemical analysis was performed in the ipsilesional hippocampus 24 hours after the lesion and revealed: a reduction of the number of surviving neurons in the HIS group when compared to the Sham that was prevented in the HIG10-Pre; a hypertrophy of the astrocytes in the HIS group that was prevented in the HIG10-Pre group and an increase in the activity of the anti-oxidant enzyme catalase in the HIG10-Pre group. The treatment with galantamine was able to prevent the histological deficits, increase the survival of neurons, reduce astrocytic reaction and increase the anti-oxidant activity in rats submitted to HI.

Key Words: Hypoxia ischemia (HI), acetylcholinesterase (AChE), galantamine, inflammation, neuroprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS

HI: Hipóxia-isquemia neonatal
SNC: Sistema Nervoso Central
ATP: Trifosfato de Adenosina
ERO: Espécies Reativas de Oxigênio
SOD: Superóxido-dismutase
CAT: Catalase
PMAD: Padrão molecular associado ao dano (PMAD)
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α
ChAT: Colinacetiltransferase
ACh: Acetilcolina
AChE: Acetilcolinesterase
AMP: Monofosfato de Adenosina
BuChE: Butirilcolinesterase
DPN: Dia Pós-natal
HIS: Grupo HI+Salina
HIG5-Pré: HI+Galantamina 5 mg/kg pré-hipóxia
HIG10-Pré: HI+Galantamina 10 mg/kg pré-hipóxia
HIG5-Pós: HI+Galantamina 5 mg/kg pós-hipóxia
HIG10-Pós: HI+Galantamina 10 mg/kg pós-hipóxia
DCF: 2'7'-diclorofluoresceína

1.INTRODUÇÃO

1.1 Hipóxia-isquemia neonatal (HI)

A HI é uma importante causa de dano encefálico ocorrido durante o desenvolvimento de recém-nascidos. Ela pode levar a óbito ou gerar incapacidade neurológica em variados graus, que vão desde comprometimentos leves a danos cognitivos graves, como os observados nos casos graves de paralisia cerebral (Volpe, 2009). A HI é considerada uma das principais etiologias de paralisia cerebral, epilepsia, autismo, déficit de atenção e dos transtornos de aprendizagem. Além de causar deficiências cognitivas e intelectuais nos indivíduos, compromete em diferentes graus a atividade motora (Huang *et al.*, 2009; Volpe, 2009).

Disfunções circulatórias e/ou complicações obstétricas como a hipóxia materna, infecções intrauterinas, descolamento prematuro da placenta e a compressão do cordão umbilical podem interferir na transferência de substratos e levar à asfixia fetal, causando a hipóxia-isquemia neonatal (Berger & Garnier, 1999; McLean & Ferriero, 2004; Volpe, 2009). Complicações sistêmicas da asfixia neonatal frequentemente ocorrem e incluem alterações cardiovasculares, respiratórias, metabólicas e renais, sendo, no entanto, o sistema nervoso central (SNC) a estrutura mais comprometida (Vannucci & Perlman, 1997).

O modelo experimental de hipóxia-isquemia perinatal desenvolvido em roedores, combina a ligação unilateral de uma das artérias carótidas comuns à posterior exposição dos animais a um período variável de hipóxia, visando mimetizar a combinação de hipoxemia e isquemia encontrada em neonatos humanos após um quadro de asfixia (Rice *et al.*, 1981). A soma da isquemia com a hipóxia causa danos localizados predominantemente no hemisfério ipsilateral à carótida ocluída, sendo o hemisfério contralateral afetado em menor grau ou mesmo não afetado morfológicamente (Jansen & Low, 1996; Rice *et al.*, 1981). O modelo de

HI perinatal é realizado no sétimo dia após o nascimento para mimetizar o desenvolvimento encefálico e os danos observados em humanos nascidos a termo que sofrem HI (Volpe, 2009). Esse modelo causa lesões no córtex cerebral, substância branca periventricular e subcortical, estriado (núcleos da base) e principalmente no hipocampo (Arteni *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2007). Dados prévios de nosso grupo evidenciam que lesões em tais estruturas após a HI causam danos tanto histológicos quanto bioquímicos, tais como perda de volume encefálico, aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e diminuição das defesas antioxidantes (Dafre *et al.*, 2003; Sanches *et al.*, 2015).

O dano cerebral causado pela HI é um processo progressivo, que se inicia durante o insulto e estende-se no período de recuperação após a ressuscitação (lesão por reperfusão). A evolução da HI pode ser dividida em diferentes fases: A lesão primária, fase latente, lesão secundária e terciária que culminam na lesão encefálica final (Figura 1). Estas fases possuem diversos mecanismos que se sobrepõem e promovem uma retroalimentação positiva, que aumenta a severidade da lesão (Davidson *et al.*, 2015; Hassell *et al.*, 2015).

A lesão primária ocorre imediatamente após o insulto, afetando a atividade neuronal devido a uma diminuição da oferta de oxigênio e glicose aos tecidos. Conforme o dano isquêmico progride, a atividade metabólica necessária para a manutenção da integridade funcional das células nervosas diminui (Hossmann, 2008). Este processo leva a um dano encefálico por meio da ativação de mecanismos excitotóxicos e apoptóticos, causadores de dano e morte celular que permanecem ativos na fase latente (Barks & Silverstein, 1992; Portera-Cailliau *et al.*, 1997).

A falência nos mecanismos de manutenção dos potenciais de membrana aumenta durante a fase latente, isso ocorre devido a uma inibição da fosforilação oxidativa

mitocondrial e à queda da produção de trifosfato de adenosina (ATP) após a falta de aporte sanguíneo (Johnston, 2001). A fase secundária se estende de 6 a 72 horas após a lesão, porém atinge seu auge em 24 horas (Davidson *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013). Nesse período a glicólise anaeróbica é insuficiente para manter a produção de ATP, assim como o suporte energético requerido para a manutenção das funções cerebrais. Isso acarreta na desativação das bombas iônicas, despolarização das membranas e abertura dos canais iônicos dependentes de voltagem, que levam a um elevado influxo de Ca^{2+} (Dugan *et al.*, 1999). O déficit energético decorrente da HI induz alterações no metabolismo celular, aumento rápido na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Dafre *et al.*, 2003; Davidson *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo é causado quando há liberação excessiva de EROs. O ânion superóxido é uma das principais EROs produzidas fisiologicamente pela mitocôndria, uma vez produzido ele é convertido em peróxido de hidrogênio, que também é uma ERO, pela enzima superóxido-dismutase (SOD) (Saito *et al.*, 2005; Weis *et al.*, 2011). O peróxido de hidrogênio, por sua vez, tem sua redução catalisada pela enzima catalase (CAT) convertendo-o em água e oxigênio, produtos que não causam dano celular (Saito *et al.*, 2005; Weis *et al.*, 2011). Por essa razão as enzimas como SOD e CAT são chamadas de defesas anti-oxidantes, pois combatem com eficiência as EROs formadas em situações fisiológicas (Saito *et al.*, 2005). Em patologias como a HI, no entanto, há uma produção excessiva de EROs muitas vezes associada com a redução das defesas anti-oxidantes provocando dano celular a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Dafre *et al.*, 2003; Davidson *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2009).

A resposta imunitária aguda no sistema nervoso central é mediada principalmente por células gliais, como astrócitos e microglia. Esses atuam como sensores intrínsecos na detecção de padrões moleculares associados ao dano (PMADs), reagindo a insultos de forma

rápida e efetiva, principalmente na liberação de citocinas pró-inflamatórias (Zhao *et al.*, 2013). O conjunto de reações das células gliais frente a um insulto é chamado de gliose reativa (Burda & Sofroniew, 2014; Liu & McCullough, 2013). As células microgliais são o componente imunitário do sistema nervoso, com uma importante função, mesmo na ausência de lesões. Estas, ao detectarem PMADs, tornam-se reativas, passando a liberar citocinas e adquirindo uma função fagocítica (Burda & Sofroniew, 2014; Liu & McCullough, 2013).

Os astrócitos, por sua vez, são protagonistas nos eventos relacionados com a progressão da lesão HI. Essas células dão suporte metabólico para os neurônios, fator que é de especial importância em eventos isquêmicos, pois neles o suprimento de glicose é reduzido; astrócitos também fazem a recaptação de neurotransmissores, que durante insultos como a HI são liberados em excesso e geram excitotoxicidade; por fim, eles participam do combate às EROs que também são liberadas em excesso após a lesão (Burda & Sofroniew, 2014; Saito *et al.*, 2005). Na presença de PMADs, no entanto, passam a participar também na regulação do processo inflamatório liberando mediadores como citocinas e a proteína S100b. Outra característica da reação dessas células a lesões é a hipertrofia observada nessas células e a formação da cicatriz astrocítica nas áreas mais afetadas (Burda & Sofroniew, 2014; Liu & McCullough, 2013).

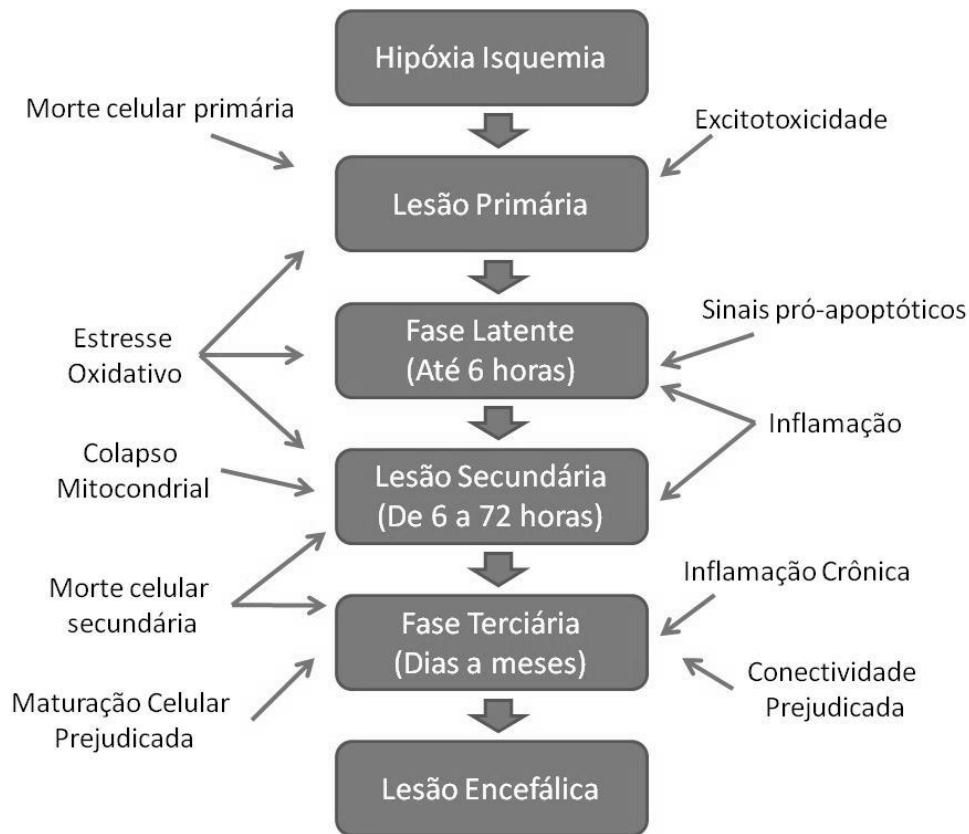


Figura 1. Mecanismos da evolução da lesão neural - nas fases primária, latente, secundária e terciária que contribuem para o dano de longo prazo (Adaptado de Davidson *et al.*, 2015).

A liberação de citocinas como TNF- α pelas células gliais pode agravar a reação inflamatória e a consequente mobilização e ativação de células inflamatórias periféricas (McLean & Ferriero, 2004; Mishra & Delivoria-Papadopoulos, 1999). É bem descrito na literatura que eventos que provocam estresse ao sistema nervoso como a HI, causam uma alteração na atividade do sistema imunitário (Fathali *et al.*, 2013; Jellema *et al.*, 2013; Liu & McCullough, 2013). A ativação da resposta imunitária é um dos fatores que determinam a gravidade da lesão, sendo que, quanto maior for a resposta imunitária, maiores serão as sequelas (Fathali *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2009). Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias provocam a mobilização de células do sistema imunitário em todo o organismo, principalmente no baço, como células T e *natural killer* (NK), que migram para o sistema nervoso central e ocasionam o aumento na morte de células nervosas (Fathali *et al.*, 2013; Liu

& McCullough, 2013). O estresse oxidativo e a inflamação exacerbada são os principais fatores que definem a morte celular secundária, pois levam à ativação de caspases (em particular a caspase-3), uma família de enzimas que atuam dando início e executando a morte neuronal por apoptose principalmente 24 horas pós lesão (Liu & Zhang, 2014; Low *et al.*, 2001; Rossiter *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2013).

Durante a lesão terciária inicia a fase de reconstrução tecidual, frequentemente com processos inflamatórios crônicos e morte celular ainda presentes, ainda que em menor grau em relação à fase secundária (Burda & Sofroniew, 2014). As células remanescentes, apesar de funcionais, amadurecem de forma tardia e não são capazes de fazer as conexões normais. O tecido, portanto, tem um desenvolvimento muito prejudicado que culmina na redução do volume das estruturas encefálicas afetadas, assim como, a formação de cicatriz glial pelos astrócitos (Arteni *et al.*, 2003; Burda & Sofroniew, 2014; Davidson *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo, a apoptose, a gliose reativa e a ativação exacerbada do sistema imunitário promovem a morte celular secundária e o consequente aumento da severidade da lesão. Esses processos têm grande importância na evolução e conseqüentemente sobre o prognóstico a longo prazo. Desta forma, torna-se necessário o estudo de estratégias terapêuticas focadas nos mecanismos da lesão secundária. Logo, drogas que agem sobre o sistema colinérgico mostram-se promissoras, uma vez que estas já demonstraram aumentar as defesas anti-oxidantes, anti-inflamatórias e anti-apoptóticas em lesões no sistema nervoso.

1.2 HI e o sistema colinérgico

Os neurônios colinérgicos estão amplamente distribuídos no sistema nervoso e são relevantes em diversas funções, tais como: aprendizado, memória, emoções, atenção, regulação do crescimento e diferenciação neuronal, estando, portanto, relacionados com as

principais funções do SNC (Mesulam et al., 2002; Okada et al., 2013; Wang et al., 2010). Duas enzimas possuem especial importância no sistema colinérgico, a colinaacetiltransferase (ChAT), que sintetiza acetilcolina (ACh) a partir de colina e acetil-CoA, e a acetilcolinesterase (AChE), que hidrolisa a ACh ocasionando sua inativação (Soreq & Seidman, 2001). Na tentativa de aumentar a ação da ACh no sistema colinérgico, uma das alternativas é o uso de inibidores da enzima AChE. A galantamina é um inibidor de AChE e está entre os fármacos mais frequentemente prescritos para o tratamento de pacientes portadores de doenças neurodegenerativas, tais como o mal de Alzheimer (Schwarz *et al.*, 2012).

Além das funções supracitadas, a acetilcolina (ACh) participa da modulação do sistema imunitário. Células como mastócitos e microglias possuem receptores colinérgicos. Esses uma vez ativados provocam a elevação dos níveis de AMP cíclico pelo aumento da atividade da adenilato ciclase, e subsequentemente promovem a ação de cinases que ativarão o fator de transcrição CREB, que provoca a síntese de proteínas inibitórias da liberação de citocinas como o TNF- α (Andersson & Tracey, 2012; Metz & Tracey, 2005; Tracey, 2009). A via colinérgica anti-inflamatória, por meio do nervo vago, inerva importantes e diversas estruturas imunitárias, como o baço. Esse nervo promove liberação de acetilcolina no gânglio celíaco, que uma vez estimulado, favorece a secreção de noradrenalina pelo nervo esplênico no baço (figura 2). Algumas das células T lá presentes podem sintetizar e liberar ACh quando estimuladas pela noradrenalina. A ACh liberada se liga a receptores de células imunitárias e impede sua ativação, provocando um efeito anti-inflamatório (Andersson & Tracey, 2012; Metz & Tracey, 2005; Tracey, 2009).

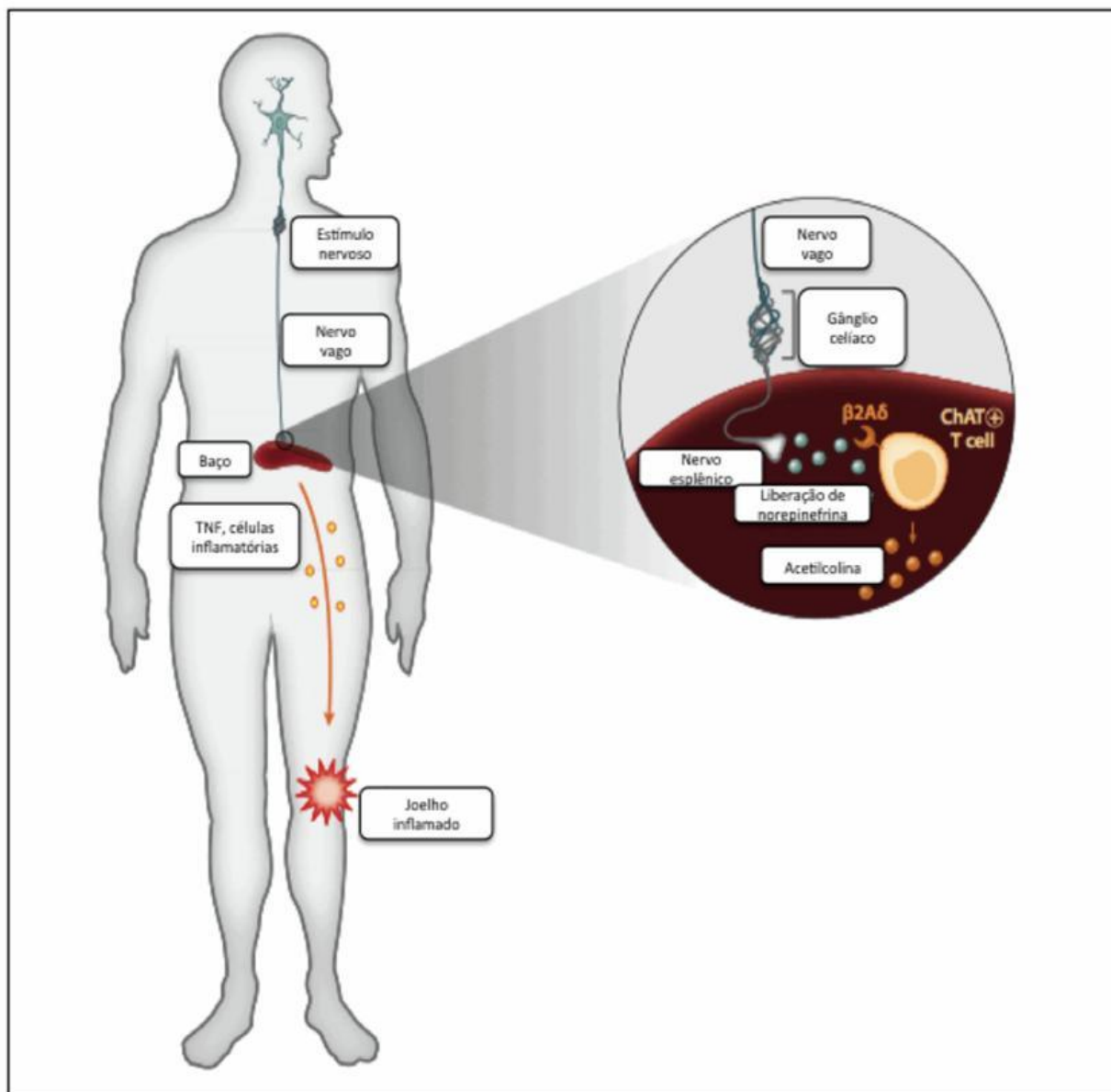


Figura 2. Funcionamento da via colinérgica anti-inflamatória (Adaptado de Anderson *et al.*, 2012).

No modelo de HI neonatal já foi demonstrado que agonistas da ACh reduzem significativamente o volume da lesão e o acúmulo de células microgлияis no local (Furukawa *et al.*, 2011), da mesma forma que antagonistas da ACh aumentam a lesão causada pela HI (Furukawa *et al.*, 2013). Já foi demonstrado, também, que a HI provoca alterações na atividade da AChE (Pimentel *et al.*, 2013) e inibidores da AChE já foram usados como tratamento neste modelo. A administração de huperzina A iniciada imediatamente pós-hipóxia

de maneira contínua até a idade adulta demonstrou ação neuroprotetora na atenuação dos déficits cognitivos e lesão encefálica após a HI (Wang *et al.*, 2002). Um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a administração diária do extrato de alcalóides de *Huperzia quadrifariata* 1 hora pós-hipóxia até 72 horas após a lesão, foi capaz de: reverter os danos cognitivos sobre a memória aversiva e espacial; alterar parâmetros bioquímicos, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio no baço e normalizando os níveis da enzima butirilcolinesterase (BuChE) - enzima sérica responsável pela degradação da ACh e reduzir o dano tecidual, em particular no hipocampo 38 dias após a HI (Odorcyk & Netto, 2013). A galantamina age como inibidor reversível e competitivo da AChE e como agonista de receptores nicotínicos que já é utilizado na área clínica (Reminyl[®]) (Greenblatt *et al.*, 1999). Furukawa e colaboradores (2014) utilizaram essa substância administrada em dose única de 1 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5 mg/kg pré ou pós-hipóxia, sendo que, só o pré-tratamento na maior dose foi capaz de reduzir o dano tecidual causado pela HI (Furukawa *et al.*, 2014b).

Tendo em vista a importância do sistema colinérgico, as ações neuroprotetoras dos inibidores da AChE na HI, e a abordagem translacional facilitada pelo uso de um fármaco amplamente utilizado na clínica, este trabalho investigou o possível efeito e mecanismos neuroprotetores da administração de galantamina tanto em dose única pré-hipóxia quanto de forma contínua pós-hipóxia. Foram avaliados os mecanismos de lesão secundária no período de 24h, quando os níveis de morte neuronal e inflamação atingem seu pico (Liu & Zhang, 2014), e a lesão encefálica resultante 38 dias pós HI, no dia pós-natal (DPN) 45. A partir desses resultados foi possível elucidar o melhor protocolo de administração, dose e mecanismo de ação desse tratamento sobre o modelo de HI neonatal, podendo ser considerada uma possível abordagem terapêutica para o tratamento da HI em humanos.

2.OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos da administração de galantamina pré e pós-hipóxia, identificando os efeitos e os mecanismos de neuroproteção desse inibidor da AChE no modelo experimental de hipóxia isquemia perinatal sobre parâmetros bioquímicos e histológicos em ratos Wistar.

2.2 Específicos

- 1) Determinar a dose e o protocolo de administração mais efetivo para o tratamento da HI por meio das análises do volume do hemisfério, do hipocampo e do córtex no DPN45;
- 2) Verificar os efeitos do tratamento sobre a preservação de neurônios, de astrócitos e de microglia 24 horas após a lesão, no hipocampo;
- 3) Identificar o efeito desse tratamento na reação das células gliais à HI por meio da quantificação das proteínas GFAP e S100b 24 horas após a lesão;
- 4) Avaliar a ativação do sistema imunitário por meio da quantificação dos níveis de TNF- α no hipocampo, córtex e baço 24 horas após a lesão;
- 5) Verificar se a ação neuroprotetora envolve a ativação da via colinérgica anti-inflamatória no baço, pela quantificação de células T que produzem acetilcolina 24 horas após a lesão;
- 6) Avaliar o efeito do tratamento sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT 24 horas após a lesão, no hipocampo;
- 7) Verificar o efeito do tratamento na atividade da enzima AChE no hipocampo 24 horas após a lesão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para esse trabalho foram utilizadas as proles de 12 ratas fêmeas Wistar nulíparas. As ratas-mães com idade superior a 90 dias foram obtidas do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. As fêmeas foram mantidas em caixas isoladas (a partir do 19º dia gestacional) até o momento do parto. As proles de ambos os sexos dessas fêmeas foram padronizadas em ninhadas de 9 a 12 animais. Todos os animais foram mantidos em ciclos claro e escuro de 12h em salas climatizadas ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS com alimentação e água *ad libitum* durante todas as etapas do projeto. Os procedimentos foram realizados de acordo com *Principles of Laboratory Animal Care* (NIH publication 85-23, 1985) e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul nº 27881.

3.2 Hipóxia-isquemia

Aos 7 dias de vida (DPN7), os animais foram anestesiados com halotano 4% e submetidos ao procedimento cirúrgico de oclusão da artéria carótida direita, com duração máxima de 10 minutos por animal. Os animais foram anestesiados e posicionados em decúbito dorsal. O procedimento inicia por meio de uma incisão na linha média da face anterior da região cervical, sendo então a artéria carótida comum direita identificada, isolada das estruturas adjacentes e ocluída com fio cirúrgico de seda 4.0 (isquemia). Os animais receberam aplicação tópica de lidocaína 10% (Xilocaína[®]) após a oclusão da carótida. Os animais do grupo Sham (controle cirúrgico) foram anestesiados para posterior realização da

incisão e exposição da carótida, porém, não foram submetidos à oclusão da carótida e à hipóxia. Ao final desse procedimento, os animais permaneceram aquecidos durante um período de recuperação de 15 minutos antes de serem devolvidos às caixas moradia, onde permaneceram por um intervalo de 2 horas junto às mães. Por fim, foram gentilmente colocados em uma câmara hermeticamente fechada de 1500 ml de volume, e expostos a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio e 92% de nitrogênio, com fluxo de 5 L/min) por 60 minutos, em grupos de quatro a seis animais. A câmara de hipóxia permaneceu parcialmente submersa em banho-maria a 37°C a fim de manter a temperatura corporal dos ratos lactentes dentro dos limites fisiológicos. Ao final da hipóxia, os animais foram retirados da câmara, permanecendo por 15 minutos sob aquecimento para a recuperação e posteriormente foram devolvidos à caixa de origem junto às mães (Arteni *et al.*, 2003).

3.3 Desenho Experimental

Para a realização do experimento os animais foram aleatoriamente separados em 6 grupos: Sham, HI+Salina (HIS), HI+Galantamina 5mg/kg pré-hipóxia (HIG5-Pré), HI+Galantamina 10mg/kg pré-hipóxia (HIG10-Pré), HI+Galantamina 5mg/kg pós-hipóxia (HIG5-Pós) e HI+Galantamina 10mg/kg pós-hipóxia (HIG10-Pós). A coleta das amostras para as análises histológicas ocorreu no DPN45 e para as análises bioquímicas no DPN8 (24 horas após a HI). O esquema do desenho experimental está ilustrado na figura 3.

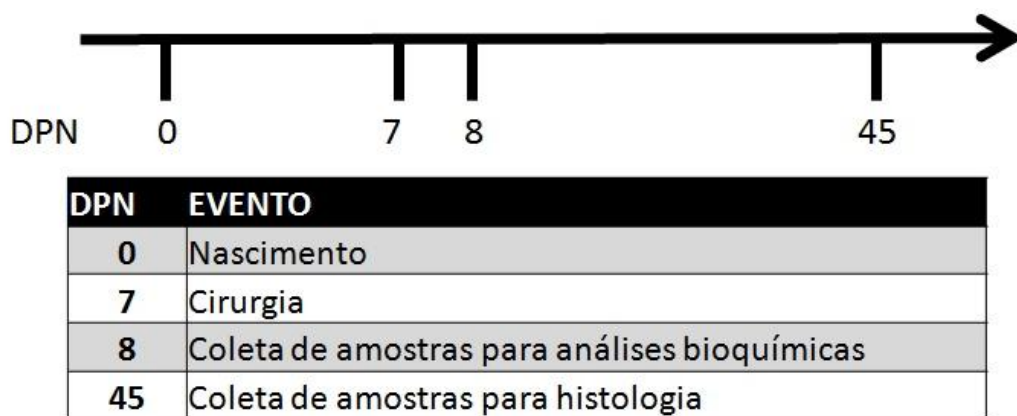


Figura 3. Esquema do desenho experimental - Indicando os dias contados após o nascimento (DPN0) e os procedimentos a serem realizados.

3.4 Purificação da galantamina a partir da forma farmacêutica comercial

O processo de purificação foi realizado no Laboratório de Farmacognosia, na Faculdade de Farmácia – UFRGS, pelo Prof. Dr. Eduardo L. Konrath. O alcaloide galantamina foi obtido a partir de cápsulas da especialidade farmacêutica Reminyl® (bromidrato de galantamina). Para tanto, os grânulos revestidos foram triturados em gral, resuspendidos em solução de ácido clorídrico (HCl) 10% e a solução foi lentamente filtrada com papel-filtro para eliminação dos excipientes. Em seguida, a solução ácida sofreu partição em funil de separação com diclorometano para eliminação dos demais interferentes restantes. Após alcalinização da solução até pH 9-10 com hidróxido de amônio (NH₄OH) para a obtenção da galantamina na forma de base livre, houve novo processo de partição com diclorometano, desta vez para a obtenção do alcaloide purificado.

A galantamina sofreu um processo de cristalização com acetona pura, sendo então verificada sua pureza por meio de métodos cromatográficos, como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) e métodos espectroscópicos, como ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H). A partir de tais métodos, foi possível confirmar a identidade do produto obtido, comparada com os dados

da galantamina obtidos da literatura (de Andrade *et al.*, 2015). O rendimento final do processo de purificação ficou em torno de 65%, enquanto que a pureza final do alcaloide foi de 95%.

3.5 Administração das substâncias

Após a purificação, a galantamina foi diluída em salina e administrada por injeções via intraperitoneal (i.p) no volume de 0,01 ml/g em 5 tempos distintos: imediatamente pré-hipóxia e 1h, 24h, 48h e 72h pós-hipóxia. Os animais do grupo Sham e HIS receberam salina no mesmo volume em todos os tempos. Os grupos HIG-Pré receberam galantamina apenas pré-hipóxia, recebendo somente salina nos demais tempos. Os grupos HIG-Pós receberam salina pré-hipóxia e galantamina nos tempos pós-hipóxia (Tabela 1).

Grupo	Pré-hipóxia	1h Pós	24h Pós	48h Pós	72h Pós
Sham e HIS	Salina	Salina	Salina	Salina	Salina
HIG-Pré	Galantamina	Salina	Salina	Salina	Salina
HIG-Pós	Salina	Galantamina	Galantamina	Galantamina	Galantamina

Tabela 1. Representação do protocolo de administração de substâncias. - Indicando o que era injetado em cada tempo nos diferentes grupos.

3.6 Análise histológica

No DPN45 os animais foram anestesiados com uma dose letal de tiopental sódico na dose de 100mg/kg de massa corporal por via intraperitoneal, submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina (0,9%), seguido de uma solução de paraformaldeído (4%). Os encéfalos foram removidos, pesados e mantidos na mesma solução de paraformaldeído por 4 horas. Após, foram crioprotetidos com soluções crescentes de sacarose 15% e 30%, após isso foram congelados e cortados no criostato (20 μ m) (Sanches *et al.*, 2015).

3.7.1 Volume da lesão

As lâminas histológicas contendo os cortes encefálicos foram coradas com Hematoxilina e Eosina. A análise volumétrica das estruturas de interesse foi realizada pelo

método de Cavalieri. As áreas do hipocampo, córtex e hemisfério foram delineadas em todos os cortes (Paxinos & Watson, 1986) e o volume das estruturas foi calculado por meio da soma das áreas multiplicadas pelo intervalo da secção dos cortes (Arteni *et al.*, 2010). As imagens dos encéfalos foram capturadas com uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio (Nikon), utilizando-se o *software* NIS-Elements Ar v4.3; as áreas foram avaliadas por meio do *software* Image J v1.49. A relação entre os lados ipsi e contralateral foi determinada pela razão entre o volume da estrutura do lado ipsilateral e o volume do lado contra lateral (Wang *et al.*, 2002).

3.8 Análises bioquímicas

Os animais foram decapitados para a coleta das amostras e para a posterior realização das análises bioquímicas. As estruturas de interesse foram dissecadas e armazenadas em eppendorfs à -80°C até a análise.

3.8.1 Citometria

As estruturas foram dissociadas em PBS, e em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,1% de PBS Triton X-100 por 10 min à temperatura ambiente, bloqueadas por 15 min com 3% de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich - A2153). Após o bloqueio, incubadas com os anticorpos primários, para neurônio MAP-2+ (Sigma Aldrich - M9942), astrócito GFAP+ (Sigma Aldrich - G3893), microglia CD11b+ (Millipore - CBL1512) e associados com S100b (Sigma Aldrich - SAB2108392) nas amostras hipocampais ou incubadas com marcador de célula T (BD Biosciences-550353) e ChAT (Millipore-AB144P) na concentração final de 1:100, incubadas à temperatura ambiente por 2h. Após, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 1h com anticorpo secundário IgG Alexa Fluor-633 anti-coelho, IgG Alexa-Fluor 488 anti-camundongo ou IgG Alexa-Fluor 488 anti-cabra, na concentração final 1:200. Os controles negativos (as amostras com o

anticorpo secundário) foram incluídos para configurar as tensões da máquina e para determinar a região negativa do gráfico de pontos. A emissão de fluorocromos foi calibrada em: vermelho (FL-4; 670 nm), amarelo (FL-2; 578nm) e verde (FL-1; 488 nm). 10.000 eventos (células intactas) foram adquiridos no hipocampo e 100.000 eventos no baço. O número de células foi determinado após a exclusão dos detritos (Heimfarth *et al.*, 2013). Todas as aquisições foram realizadas por meio do equipamento FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) para posterior análise no programa Flow Jo v10.1 (Weis *et al.*, 2012).

3.8.2 ELISA

3.8.2.1 ELISA de S100b

O imunocontéudo de S100b foi medido por ELISA, como previamente descrito (Leite *et al.*, 2008). Brevemente, 50 µL de amostra em 50 µL de tampão Tris foi incubada por 2 h em uma placa de microtitulação, revestida com o anticorpo monoclonal anti-S100b (Sigma-Aldrich - S2532). A amostra foi incubada na placa e posteriormente incubada com anti-S100b policlonal (Dako - Z0311) por 30 min; conjugada com peroxidase anti-coelho (GE - NA934V) por 30 min. A reação de cor com o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich - P8936) foi medida a 492 nm. A curva padrão foi determinada entre 0,002 a 1 ng/mL.

3.8.2.2 ELISA de GFAP

Resumidamente, a técnica iniciou-se com o revestimento das placas de microtitulação com 100 µL de amostra do homogeneizado do hipocampo ipsilateral por 24 h a 4° C. Posteriormente, foi realizada a incubação com anti-GFAP de coelho policlonal (DAKO - Z0334) por 1 h, seguida de incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase

(GE - NA934V) por 1 hora à temperatura ambiente. A reação colorimétrica com o-fenilenediamina (Sigma-Aldrich - P8936) foi medida a 492 nm. A GFAP humana foi utilizada para determinar a curva padrão (Calbiochem), nas concentrações de 0,1 a 5 ng/mL (Tramontina *et al.*, 2007).

3.8.2.3 ELISA TNF- α

Os níveis da expressão de TNF- α no hipocampo, córtex e baço foram detectados pelo método de ELISA utilizando um kit comercial para TNF- α da eBioscience (San Diego, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Baseado na reação de cor do extrato do citoplasma e anticorpos, o valor da absorbância foi determinado a 450 nm em um leitor de microplacas (Vizuete *et al.*, 2013).

3.8.3 Parâmetros de estresse oxidativo

O hipocampo foi homogeneizado: (1:10, p/v) em 20 mM PBS, pH 7.4 contendo 140 mM KCl. Após, o material foi centrifugado a 800xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi novamente diluído no mesmo tampão.

3.8.3.1 Medida da oxidação da 2'7'diclorofluoresceína (DCF)

A produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada de acordo com Lebel e colaboradores (1990). O método se baseia na oxidação da 2'7'-diclorofluoresceína (H₂DCF). 60 μ L da amostra foram incubados em uma solução contendo 240 μ L de 100 μ M 2'7'-diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCF-DA) por 30 minutos a 37 °C no escuro em uma placa de 96 poços. O H₂DCF-DA é clivado por esterases celulares e a H₂DCF resultante é por vezes oxidada por espécies reativas de oxigênio presentes nas amostras. A última reação produz um composto fluorescente que é medido a 488 nm de excitação e 525 nm de emissão, sendo os

resultados expressos como nmol DCF/mg de proteína. A curva de calibração foi realizada com DCF purificado como padrão (Lebel *et al.*, 1990).

3.8.3.2 Medida da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida usando o leitor de microplacas SpectraMax M5/M5 (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California, USA). Esse método de análise da atividade da SOD é baseado na capacidade do pirogalol se auto-oxidar, um processo altamente dependente de superóxido, que é substrato para a SOD. A inibição da auto-oxidação desse composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade foi medida indiretamente por espectromorfometria a 420 nm, usando espectrofotômetro de dupla emissão à temperatura ambiente (Marklund & Marklund, 1974). A curva de calibração foi realizada com SOD purificada como padrão, a fim de calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma inibição de 50% da auto-oxidação do pirogalol é definida como uma (01) unidade de SOD e a atividade específica está representada como unidades/mg de proteína.

3.8.3.3 Medida da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida usando leitor de microplacas SpectraMax M5/M5 (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California, USA). O método usado é baseado no consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 240 nm em um meio de reação contendo 20 mM de H_2O_2 , 0.1% de Triton X-100, 10 mM de PBS pH 7,0, e entre 0,1-0,3 mg de proteína/mL (Aebi, 1984). Uma (01) unidade de CAT é definida como um mmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto e a atividade específica foi calculada como unidades/mg de proteína.

3.8.4 Atividade da acetilcolinaesterase

Para determinar a taxa de hidrólise da AChE no hipocampo foi utilizado o método descrito por Ellman e colaboradores (1961). Essa taxa foi medida numa solução contendo 0,8mM de ACh em 1 mL de solução com 100mM de tampão de fosfato de potássio pH 7,5 e 1mM de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB). 50 µl de amostra foram adicionados à mistura e pré-incubados por 3 minutos. Para inibir a atividade da BuChE utiliza-se etopropazina. A hidrólise é medida pela formação do diânion de tiolato (DTNB) a 412nm por 2 minutos a 25°C. A atividade específica da enzima é expressa em µmol de acetilcolina hidrolizada por hora por miligrama de proteína (Ellman *et al.*, 1961).

3.8.5 Dosagem de proteínas

Os níveis de proteína foram determinados segundo o método de Bradford (1976). Foi utilizado o corante Coomassie Brilliant Blue, que ao ligar-se às proteínas, tem a sua absorvância alterada de 465nm para 595nm (comprimento de onda de leitura no espectrofotômetro). Foi utilizada albumina sérica bovina como padrão na concentração de 1mg/mL (Bradford, 1976).

3.9 Análise Estatística

A normalidade dos resultados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do *post hoc* de Duncan para múltiplas comparações. A significância aceita foi de $p < 0.05$ e os testes foram realizados utilizando o programa SPSS v19.0.

4. RESULTADOS

4.1 Galantamina injetada pré-hipóxia reverte os danos teciduais causados pela HI.

A análise dos volumes do hemisfério, hipocampo e córtex tanto ipsi quanto contralaterais à oclusão da carótida estão com suas médias representadas na Tabela 2. O volume dos hemisférios não apresentou diferença significativa entre os grupos Sham e HIS, não demonstrando o efeito da lesão nessa estrutura. Apesar disso, há diferença no volume do hemisfério ipsilateral entre os grupos HIG-Pós, que demonstra uma redução no hemisfério, e o grupo Sham ($F(5,42)=3.62$, $p<0.05$) e na relação dos volumes hemisféricos, com redução na relação ipsi/contralateral no grupo HIG-Pós ($F(5,42)=3.63$, $p<0.05$).

O volume do córtex também não demonstrou ser alterado pela lesão, pois não há diferença significativa entre os grupos Sham e HIS. No entanto, há diferença estatística entre os grupo Sham e HIG10-Pós tanto no volume do córtex ipsilateral ($F(5,42)=3.32$, $p<0.05$) quanto na relação entre os córtices ($F(5,42)=2.88$, $p<0.05$).

O hipocampo ipsilateral foi a estrutura mais afetada pela lesão, apresentando diferença significativa entre os grupos Sham e HIS. O grupo HIG10-Pré foi capaz de reverter a perda do volume hipocampal, sendo o único grupo lesado significativamente diferente do grupo HIS ($F(5,42)=6.5$, $p<0.05$) (Figura 4A). A relação entre os hipocampos demonstra o mesmo padrão, com diferença entre os grupos Sham e HIS e efeito protetor do tratamento do grupo HIG10-Pré, revertendo a redução do volume hipocampal causado pela lesão ($F(5,42)=7.93$, $p<0.05$) (Figura 4B).

		Volume do Hemisfério		Volume do Hipocampo		Volume do Córtex	
Sham	Ipsilateral	398.67	± 8.09	24.63	± 1.28	184.52	± 6.62
	Contralateral	387.47	± 10.13	25.01	± 1.58	183.75	± 4.07
	Ipsi/Contralateral	1.03	± 0.02	0.99	± 0.05	1.00	± 0.02
HIS	Ipsilateral	328.46	± 31.25	10.83	± 2.89*	168.33	± 17.42
	Contralateral	403.69	± 27.77	24.20	± 2.42	189.47	± 11.70
	Ipsi/Contralateral	0.81	± 0.04	0.40	± 0.10*	0.88	± 0.06
HIG5-Pré	Ipsilateral	322.26	± 34.49	15.73	± 3.47*	167.62	± 17.51
	Contralateral	395.32	± 5.99	23.35	± 1.84	188.67	± 4.01
	Ipsi/Contralateral	0.82	± 0.09	0.69	± 0.15*	0.89	± 0.09
HIG10-Pré	Ipsilateral	405.68	± 23.33	23.87	± 2.65#	217.16	± 10.12
	Contralateral	412.85	± 18.95	24.24	± 0.90	200.10	± 10.53
	Ipsi/Contralateral	0.98	± 0.32	0.99	± 0.11#	1.09	± 0.04
HIG5-Pós	Ipsilateral	300.62	± 26.49*	13.83	± 1.91*	159.25	± 17.27*
	Contralateral	392.70	± 7.00	26.24	± 1.80	183.30	± 4.37
	Ipsi/Contralateral	0.77	± 0.69*	0.55	± 0.09*	0.87	± 0.10
HIG10-Pós	Ipsilateral	242.51	± 42.37*	9.74	± 1.93*	118.39	± 24.05*
	Contralateral	346.27	± 6.72	23.20	± 0.73	167.29	± 3.46
	Ipsi/Contralateral	0.62	± 0.10*	0.37	± 0.07*	0.63	± 0.13*

Tabela 2. Volumes das estruturas encefálicas. Dados expressos em média do volume (mm³) ± erro padrão. n=7-9 por grupo. ANOVA de uma via seguida por Duncan. p<0,05. *Diferença para o grupo Sham, #Diferença para o grupo HIS.

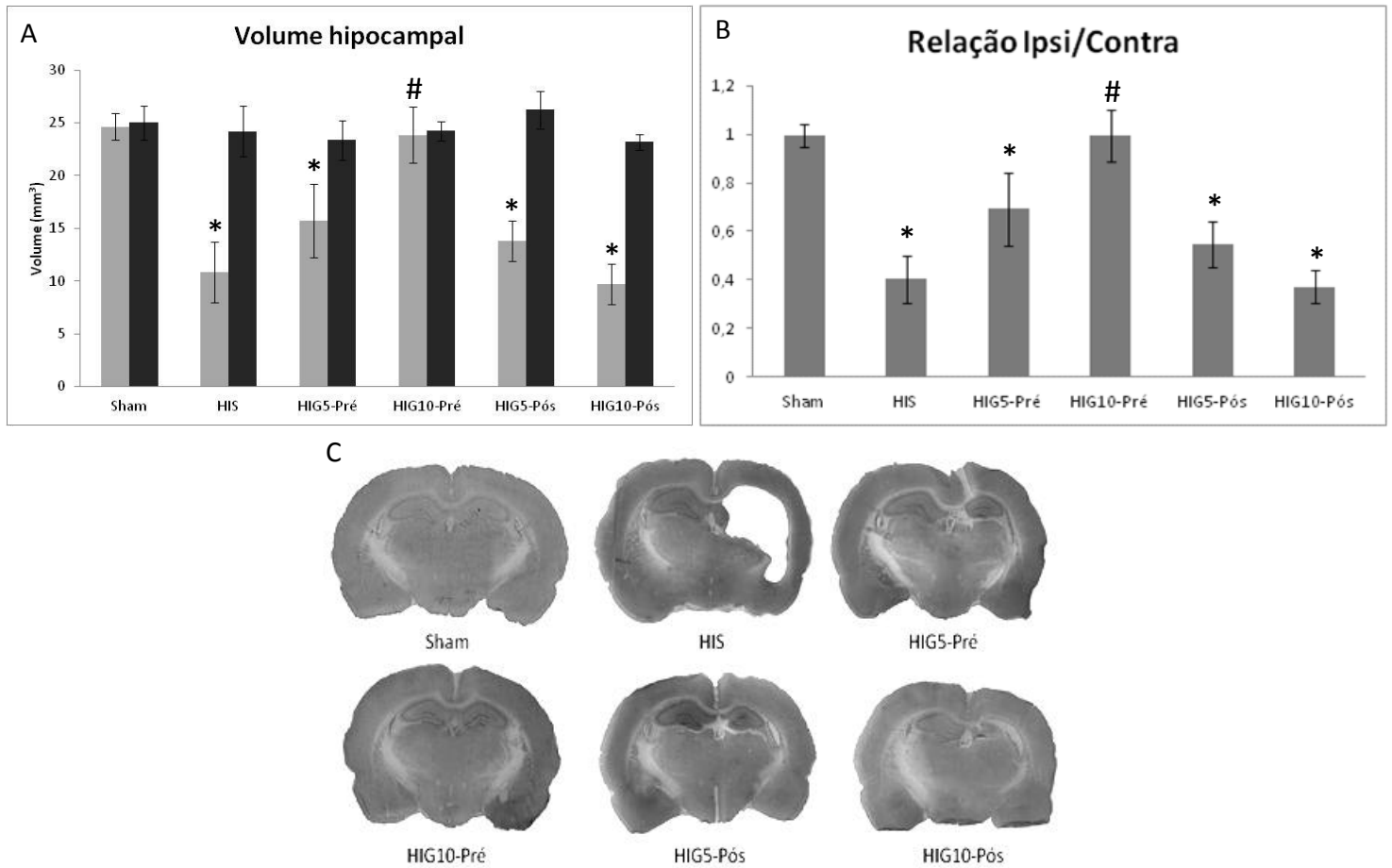


Figura 4. Histologia do hipocampo. Volume hipocampal no DPN45- Coluna da esquerda representa o volume do hipocampo ipsilateral à oclusão da carótida, coluna da direita representa o volume do contralateral (A). Razão do volume do hipocampo contralateral e ipsilateral à lesão 45 dias após a lesão (B). Dados expressos em média \pm erro padrão. $n=7-9$ por grupo. ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p<0,05$. *Diferença para o grupo Sham, #Diferença para o grupo HIS. Imagens representativas dos encéfalos corados com HE dos diferentes grupos (C).

4.2 Galantamina injetada pré-hipóxia previne a redução no número de neurônios no hipocampo causada pela HI.

A citometria realizada 24 horas após a HI no hipocampo ipsilateral demonstrou que a lesão alterou a proporção de neurônios com redução de células MAP2+ nos grupos HIS (5.30±0.59%) e HIG5-Pré (5.53±0.80%) quando comparados com o grupo Sham (9.60±1.24%). O efeito do tratamento foi observado no grupo HIG10-Pré (8.10±0.80%), que preservou o número de neurônios quando comparado aos demais grupos com lesão, não apresentando diferenças em relação ao grupo Sham ($F(3,25)=5.32$, $p<0.05$), evidenciando o efeito neuroprotetor do tratamento pré-hipóxia de galantamina na dose de 10 mg/kg (Figura 5).

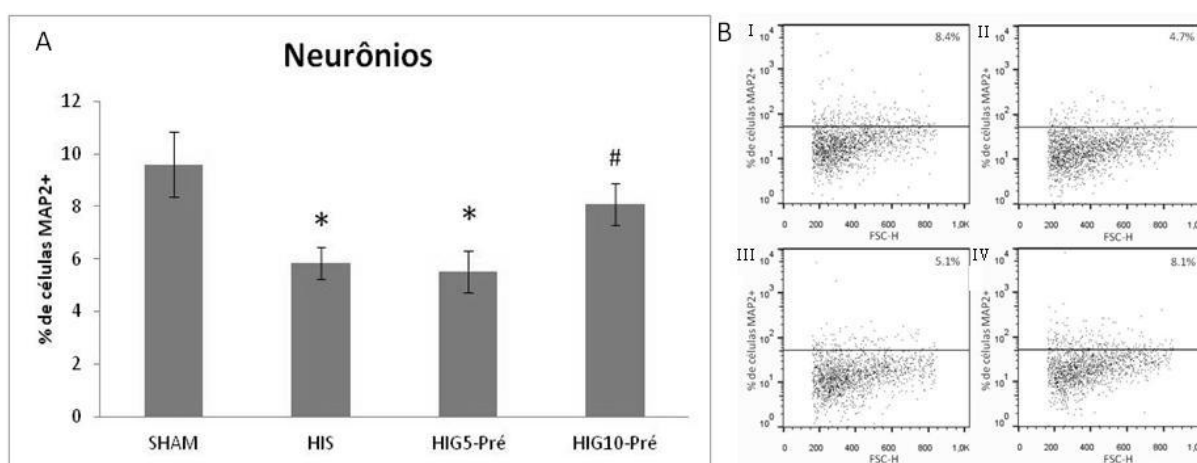


Figura 5. Número de neurônios no hipocampo ipsilateral 24h após a lesão. - Dados de citometria expressos em média de células MAP2+ ± erro padrão. Linha representa a divisão entre células MAP2+ (acima) e MAP2- (abaixo). n=7-8 por grupo. ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p<0,05$. *Diferença para o grupo Sham, #Diferença para o grupo HIS (A). Imagem representativa dos resultados da citometria nos grupos Sham (I), HIS (II), HIG5-Pré (III) e HIG10-Pré (IV) (B).

No entanto, não há diferença no número de células CD11b+ entre os grupos Sham ($11.56 \pm 1.48\%$), HIS ($14,80 \pm 2.12\%$), HIG5-Pré ($14.68 \pm 2.58\%$) e HIG10-Pré ($11.98 \pm 2.58\%$) (Figura 6A). A proporção de células que expressam S100b também não foi alterada em nenhum dos grupos, Sham ($37.29 \pm 5.31\%$), HIS ($30.62 \pm 1.50\%$), HIG5-Pré ($30.77 \pm 4.12\%$) e HIG10-Pré ($34.03 \pm 1.61\%$) (Figura 6B). As células astrocíticas (GFAP+) seguem o mesmo padrão, não apresentando diferenças significativas entre os grupos Sham ($29.40 \pm 5.01\%$), HIS ($24.30 \pm 2.04\%$), HIG5-Pré ($25.19 \pm 4.88\%$) e HIG10-Pré ($29.52 \pm 3.77\%$) (Figura 6C). Não havendo, portanto, alteração no número de astrócitos pela lesão nem pelo tratamento.

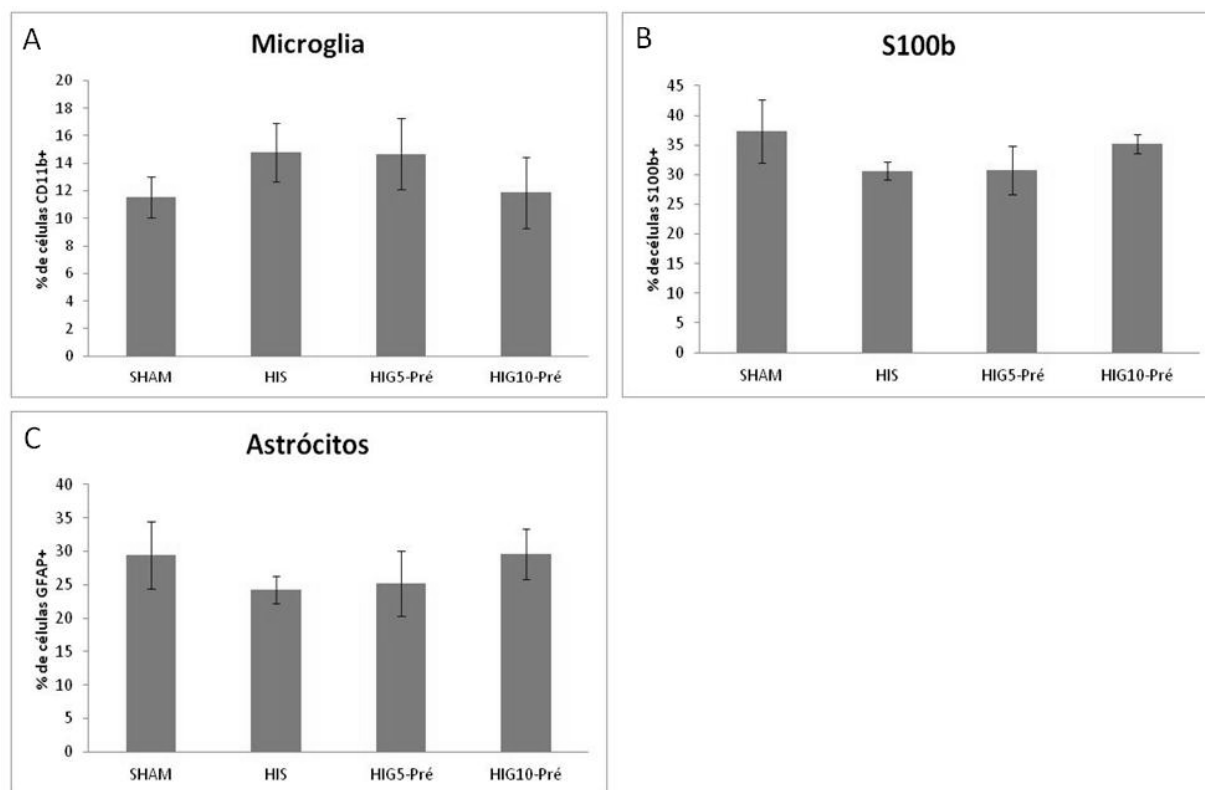


Figura 6. Citometria no hipocampo ipsilateral 24 horas após a lesão. Número de células microgliais- Dados de citometria expressos em média de % de células CD11b+ ± erro padrão. (n=7-8 por grupo) (A). Número de células expressando S100b – Dados expressos em média de % de células S100b+ ± erro padrão (n=6-7 por grupo) (B). Número de Astrócitos – Dados expressos em média de % de células GFAP+ ± erro padrão. (n=6-7 por grupo) (C).

4.3 Galantamina injetada pré-hipóxia previne a astrogliose reativa no hipocampo causada pela HI.

A ELISA de S100b realizada 24h após a HI no hipocampo ipsilateral à lesão não demonstrou diferenças entre os grupos Sham (0.018 ± 0.003 ng S100b/mg de proteína), HIS (0.23 ± 0.002 ng S100b/mg de proteína), HIG5-Pré (0.027 ± 0.005 ng S100b/mg de proteína) e HIG10-Pré (0.022 ± 0.004 ng S100b/mg) (Figura 7B). No entanto, a ELISA de GFAP na mesma estrutura, demonstrou o aumento da expressão de GFAP no grupo HIS (54.8 ± 10.71 ng GFAP/mg de proteína) e HIG5-Pré (43.7 ± 8.64 ng GFAP/mg de proteína) em relação ao grupo Sham (16.87 ± 2.65 ng GFAP/mg de proteína) e a reversão desse efeito no grupo HIG10-Pré (29.3 ± 5.81 ng GFAP/mg de proteína), sendo significativamente diferente do HIS e não apresentando diferenças estatísticas para o grupo Sham ($F(3,25)=3.09$, $p<0.05$) (Figura 7A).

Para determinar o grau de hipertrofia dos astrócitos foi feita a relação entre a expressão de GFAP (obtida por meio da ELISA) e o número de astrócitos (número de células GFAP+ obtido pela citometria de fluxo). Dessa forma foi observado um aumento significativo do grupo HIS ($371.81 \pm 77.77\%$) e HIG5-Pré ($285.39 \pm 53.16\%$) em relação ao Sham ($100 \pm 13.14\%$) que foi revertido pelo tratamento do grupo HIG10-Pré ($156.71 \pm 27.47\%$) ($F(3,24)=5.40$, $p<0.05$), demonstrando que o tratamento previne a astrogliose reativa causada pela HI (Figura 7C).

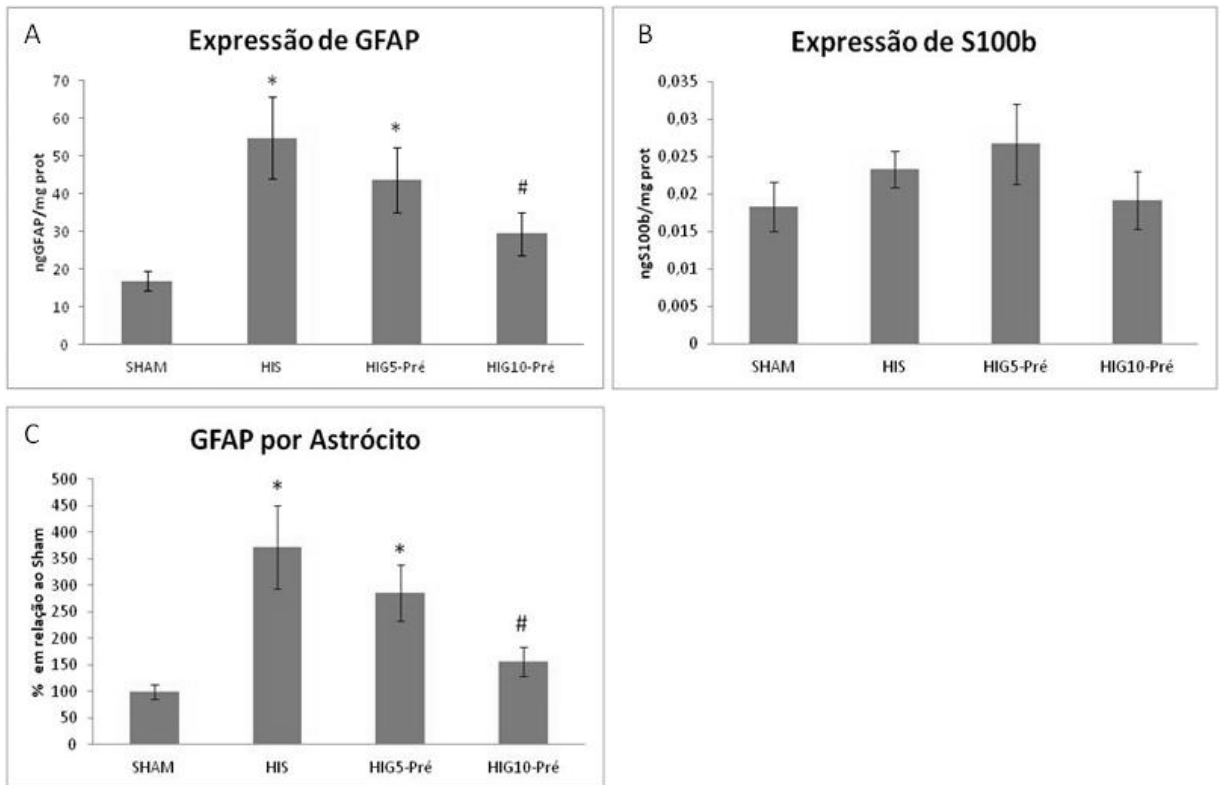


Figura 7. Expressão de GFAP e S100b no hipocampo ipsilateral-Dados expressos em média ng GFAP/mg prot \pm erro padrão (A). Expressão de S100b- Dados expressos em média ng S100b/mg prot \pm erro padrão (B). GFAP por Astrócito- Expressão da proteína GFAP/número células GFAP+. Dados expressos em % do Sham \pm erro padrão (C). n=6-8 por grupo. ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p < 0,05$. *Diferença para o grupo Sham, #Diferença para o grupo HIS.

4.4 Galantamina injetada pré-hipóxia previne a astrogliose reativa no córtex causada pela HI.

ELISA de S100b também foi feita no córtex parietal ipsilateral à lesão e, assim como no hipocampo, não demonstrou alterações significativas entre os grupos Sham (0.102 ± 0.017 ng S100b/mg de proteína), HIS (0.087 ± 0.010 ng S100b/mg de proteína), HIG5-Pré (0.094 ± 0.018 ng S100b/mg de proteína) e HIG10-Pré (0.071 ± 0.007 ng S100b/mg de proteína) (Figura 7A). A ELISA de GFAP, porém, apresentou um aumento da expressão dessa proteína no grupo HIS (96.1 ± 11.1 ng GFAP/mg de proteína) em relação ao Sham (37.6 ± 9.1 ng GFAP/mg de proteína) e esse aumento foi revertido pelo tratamento no grupo HIG10-Pré (54.2 ± 6.1 ng GFAP/mg de proteína), mas não no grupo HIG5-Pré (107.0 ± 14.8 ng GFAP/mg de proteína) ($F(3,25)=9.78$, $p<0.05$). Esse resultado demonstra a presença de astrogliose reativa também no córtex que é mais uma vez revertida pelo pré-tratamento com galantamina na dose de 10 mg/kg (Figura 7B).

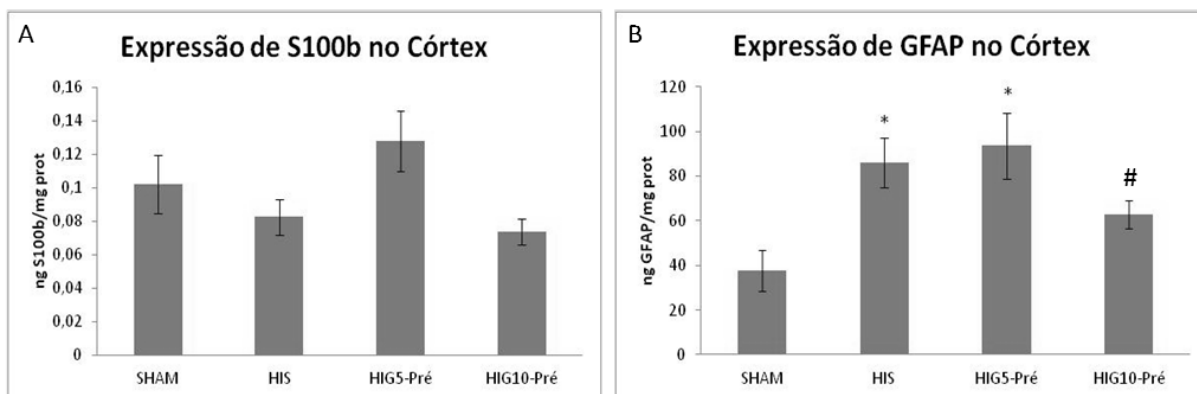


Figura 8. Expressão de S100b e GFAP no córtex ipsilateral 24 após a lesão. Expressão de S100b- Dados de ELISA expressos em média ng S100b/mg prot \pm erro padrão (A). Dados de ELISA expressos em média ng GFAP/mg prot \pm erro padrão (B). n=7-8 por grupo. ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p<0,05$. *Diferença para o grupo Sham, #Diferença para o grupo HIS.

4.5 Os níveis de TNF- α não foram alterados 24 horas após a lesão.

ELISA dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α no hipocampo, córtex e baço não apresentaram alterações significativas entre os grupos. No hipocampo as médias foram: Sham 3.83 ± 0.91 ng TNF- α /mg de proteína; HIS 4.19 ± 0.48 ng TNF- α /mg de proteína, HIG5-Pré 4.54 ± 0.83 ng TNF- α /mg de proteína e HIG10-Pré 6.96 ± 2.18 ng TNF- α /mg de proteína (Figura 9A). No córtex o grupo Sham apresentou a média de 1.01 ± 0.10 ng TNF- α /mg de proteína, HIS 1.30 ± 0.19 ng TNF- α /mg de proteína, HIG5-Pré 1.05 ± 0.20 ng TNF- α /mg de proteína e HIG10-Pré 1.47 ± 0.14 ng TNF- α /mg de proteína (Figura 9B). No baço, as médias de ng TNF- α /mg de proteína no grupo Sham foi de 1.22 ± 0.22 , 1.10 ± 0.27 no grupo HIS, 1.63 ± 0.45 no grupo HIG5-Pré e 0.98 ± 0.06 no grupo HIG10-Pré (Figura 9C). Demonstrando que os níveis dessa citocina não foram alterados pela HI nem pelo tratamento neste tempo.

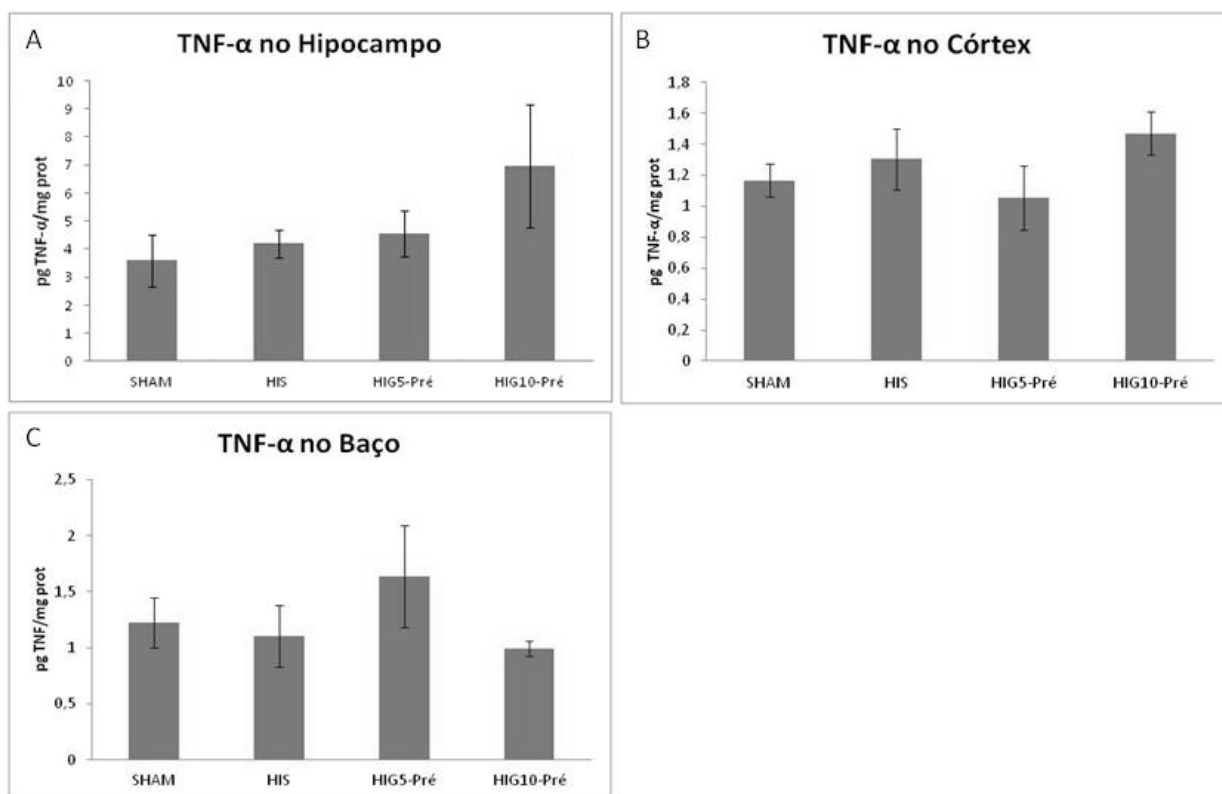


Figura 9. Expressão de TNF- α 24 após a lesão. No hipocampo ipsilateral (n=6-9 por grupo)(A), córtex ipsilateral (n=6-7 por grupo) (B) e baço (n=5-7 por grupo)(C). Dados de ELISA expressos em média ng TNF- α /mg prot \pm erro padrão.

4.6 O número de células T colinérgicas no baço não foi alterado 24 horas após a lesão.

Citometria do baço não demonstrou efeito da lesão no número de células T (CD3+), visto que não há diferença significativa entre os grupos Sham ($2.42 \pm 0.27\%$), HIS ($2.77 \pm 0.30\%$), HIG5-Pré ($3.30 \pm 0.22\%$) e HIG10-Pré ($2.9 \pm 0.32\%$) (Figura 10A). O número de células T colinérgicas (CD3+ e ChAT+) não apresentou alteração em nenhum dos grupos, Sham ($0.50 \pm 0.16\%$), HIS ($1.24 \pm 0.41\%$), HIG5-Pré ($1.08 \pm 0.19\%$) e HIG10-Pré ($0.87 \pm 0.22\%$) (Figura 10B). A HI, portanto, não altera o número de células T colinérgicas no baço 24 horas após a lesão.

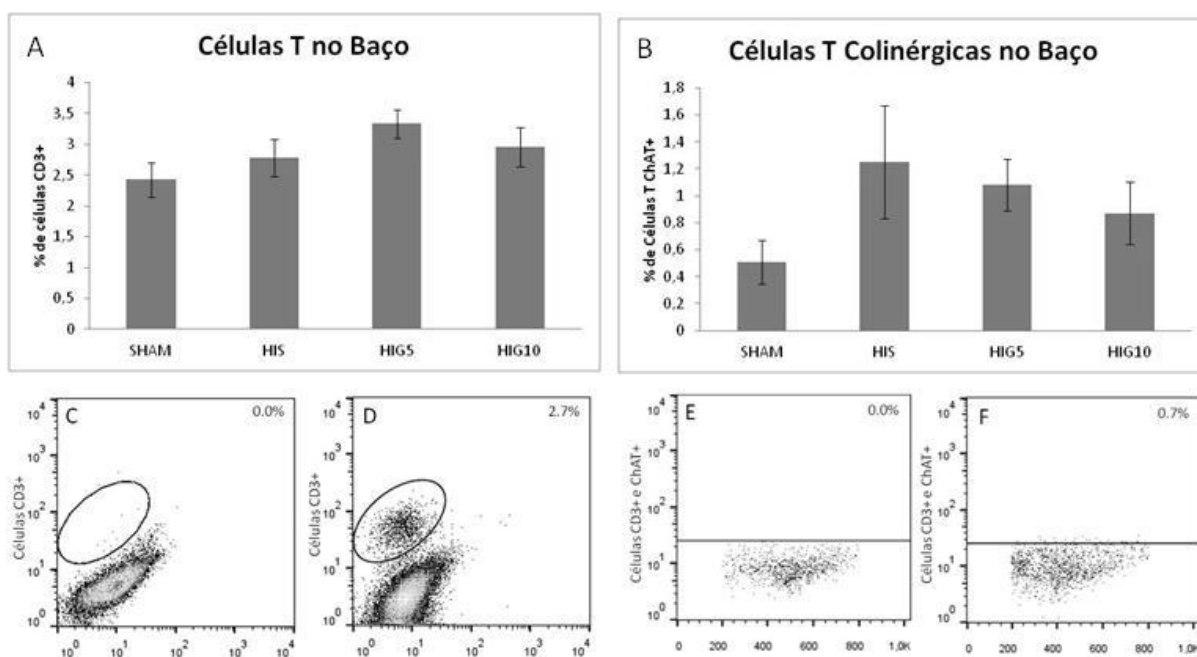


Figura 10. Citometria do baço 24 horas após a lesão. Número de células T- Dados da citometria expressos em média de células CD3+ \pm erro padrão (A). Número de células T colinérgicas- Dados expressos em média de células CD3+ e ChAT+ \pm erro padrão (B). n=5-6 por grupo. ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p < 0,05$. Imagens ilustrativas onde as células dentro do círculo foram consideradas CD3+ em um controle negativo (C), de uma amostra positiva para CD3 (D). Imagens ilustrativas onde a linha representa a divisão entre células ChAT+ (acima) e ChAT- (abaixo) de um controle negativo para células T ChAT+ (E) e uma amostra positiva para células T ChAT+ (F).

4.7 O pré-tratamento com galantamina aumenta a atividade da enzima antioxidante CAT no hipocampo 24 horas após a lesão.

Parâmetros de estresse oxidativo foram investigados no hipocampo ipsilateral 24 horas após a lesão, a atividade da SOD não demonstrou diferença entre os grupos Sham (22.2 ± 1.8 U/mg de proteína), HIS (23.4 ± 1.8 U/mg de proteína), HIG5-Pré (23.3 ± 1.3 U/mg de proteína) e HIG10-Pré (26.9 ± 2.0 U/mg de proteína) (Figura 11A). A atividade da CAT, por outro lado, foi aumentada no grupo HIG10-Pré (16.1 ± 0.8 U/mg de proteína) em relação aos demais grupos Sham (12.7 ± 0.6 U/mg de proteína), HIS (12.5 ± 0.9 U/mg de proteína) e HIG5-Pré (13.3 ± 0.9 U/mg de proteína) ($F(3,27)=3.62$, $p<0.05$) (Figura 11B). Demonstrando uma possível ação antioxidante do pré-tratamento com galantamina na dose de 10 mg/kg. Os níveis de DCF não tiveram diferenças significativas entre os grupos Sham (626.5 ± 103.9 nmol DCF/mg de proteína), HIS (473.7 ± 86.8 nmol DCF/mg de proteína), HIG5-Pré (nmol DCF/mg de proteína) e HIG10-Pré (515.6 ± 41.1 nmol DCF/mg de proteína) (Figura 11C).

4.8 A AChE não permanece inibida no hipocampo 24 horas após a lesão.

A atividade da enzima AChE também foi medida no hipocampo ipsilateral 24 horas após a lesão e não foi observado nenhuma diferença significativa na sua atividade entre os grupos Sham (1.04 ± 0.04 $\mu\text{molACSCCh/h.mg}$ de proteína), HIS (0.99 ± 0.07 $\mu\text{molACSCCh/h.mg}$ de proteína), HIG5-Pré (0.80 ± 0.08 $\mu\text{molACSCCh/h.mg}$ de proteína) e HIG10-Pré (0.99 ± 0.06 $\mu\text{molACSCCh/h.mg}$ de proteína) (Figura 11D).

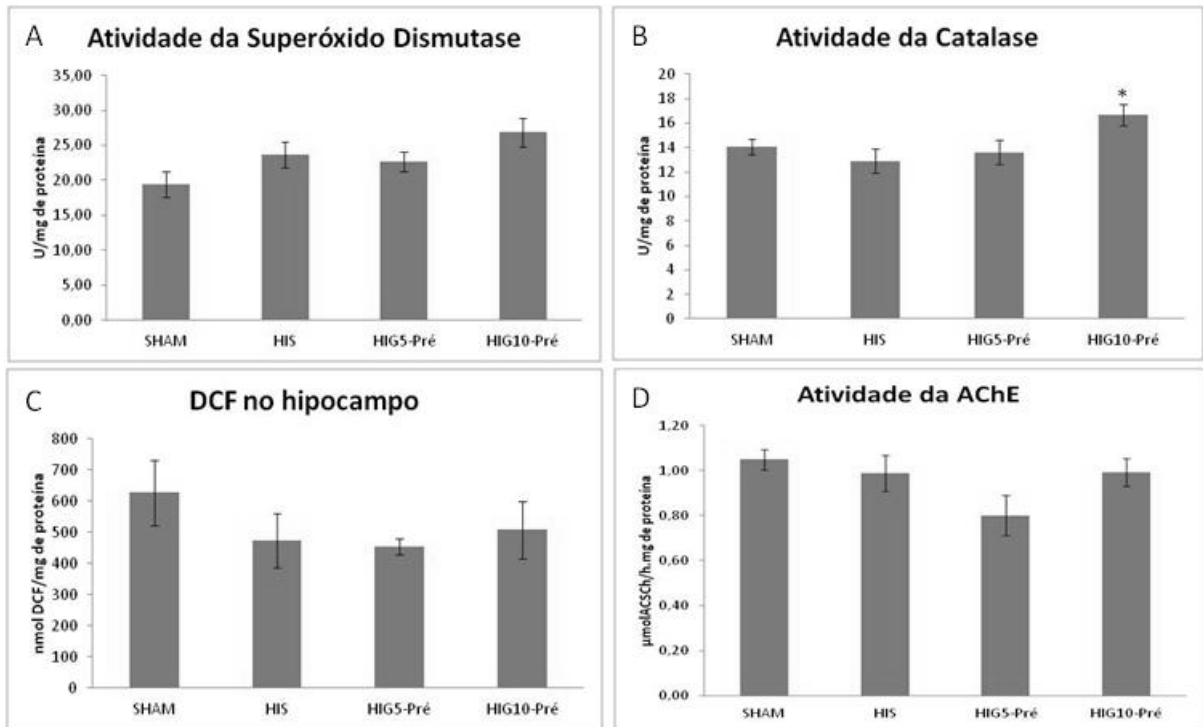


Figura 11. Parâmetros de estresse oxidativo e atividade da AChE no hipocampo ipsilateral 24 após a lesão. Atividade da SOD- Dados expressos em média U/mg de proteína \pm erro padrão (A). Atividade da CAT- Dados expressos em média U/mg de proteína \pm erro padrão (B). Formação de DCF- Dados expressos em média U/mg de proteína \pm erro padrão (C). Atividade da AChE- Dados expressos em $\mu\text{molACSh/mg de proteína}$. n=7-8 por grupo (D). ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p < 0,05$. *Diferença para o grupo Sham.

5. DISCUSSÃO

Esse trabalho investigou os efeitos da administração pré e pós-hipóxia de galantamina no modelo experimental de HI neonatal. Observamos efeitos prejudiciais da lesão no dano tecidual principalmente no hipocampo ipsilateral à oclusão carotídea e os efeitos protetores da administração pré, mas não pós-hipóxia. A partir disso, buscou-se identificar os efeitos do pré-tratamento com galantamina investigando sobrevivência celular, gliose reativa, inflamação, via colinérgica anti-inflamatória no baço, parâmetros de estresse oxidativo e atividade da enzima AChE 24 horas após a lesão, momento em que a morte celular e parâmetros inflamatórios atingem seu pico nesse modelo (Liu & Zhang, 2014). Esse trabalho é o primeiro a demonstrar a ação de inibidores de AChE no aumento da sobrevivência neuronal em um período agudo, na redução da reação astrogliar e no aumento das defesas anti-oxidantes após a HI. Esses resultados fazem com que a galantamina, fármaco já utilizado em pacientes com mal de Alzheimer, seja um possível tratamento também para a HI em humanos.

A histologia realizada no DPN45, quando a lesão já está consolidada (Volpe, 2009) comprovou que a HI causa dano unilateral, principalmente no hipocampo ipsilateral à carótida ocluída, o que já é bem descrito na literatura (Arteni *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2007; Sanches *et al.*, 2015). O volume do córtex revelou que apenas os grupos com tratamento pós-hipóxia apresentavam diferença significativa para o Sham. Esse resultado, embora sugira uma lesão maior nessa estrutura, não permite afirmar que o pós-tratamento de fato aumentou a lesão, visto que não há diferença para o grupo HIS. É importante, no entanto, que mais estudos sejam realizados para confirmar se há de fato o aumento da lesão no tratamento pós-hipóxia.

Diferente do encontrado no córtex, a análise do volume hipocampal o único tratamento que apresentou melhora significativa em relação ao grupo lesado foi com a dose pré-hipóxia

de 10 mg/kg (HIG10-Pré) (Figura 4). Estudos com inibidores de AChE demonstraram que huperzina A (Wang *et al.*, 2002) e o extrato de alcalóides de *Huperzia quadrifariata* (Odorcyk & Netto, 2013) são capazes de reduzir os danos teciduais mesmo quando administrados pós-hipóxia, essa diferença nos resultados deve ocorrer devido a diferentes propriedades farmacológicas dessas substâncias em relação à galantamina (Zangara, 2003). É importante ressaltar que, embora a huperzina A e o extrato de *Huperzia quadrifariata* tenham reduzido a lesão mesmo sendo administrados pós-hipóxia, essas substâncias ainda não são amplamente usadas na clínica médica, pois ainda estão em fase inicial de testes clínicos, caso da huperzina A (Mangialasche *et al.*, 2010), ou ainda limitados a estudos com animais, caso do extrato de *Huperzia quadrifariata* (Konrath *et al.*, 2012; Odorcyk & Netto, 2013).

O fármaco usado nesse trabalho, no entanto, que já é um medicamento bem estabelecido na clínica médica, o que o confere grande poder translacional para aplicação em humanos. Furukawa e colaboradores (2014b) também compararam os efeitos do tratamento pré e pós-hipóxia de galantamina nas doses de 1, 2.5 e 5 mg/kg no modelo de HI e, concordando com o encontrado aqui, observou que só o pré-tratamento foi neuroprotetor (Furukawa *et al.*, 2014b). No entanto, no presente estudo o tratamento pré-hipóxia de 5 mg/kg não demonstrou melhora significativa, visto que só o grupo HIG10-Pré e não o HIG5-Pré apresentou diferença no volume hipocampal. Para maior compreensão dos mecanismos que determinaram esse efeito histológico foi necessário compreender o que estava ocorrendo nos períodos mais agudos da lesão, por isso fatores como sobrevivência celular, expressão de diversas moléculas e parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados no hipocampo ipsilateral 24 horas após a lesão.

A sobrevivência de células neuronais foi significativamente reduzida pela HI e essa redução foi revertida no grupo HIG10-Pré, demonstrando um efeito protetor do pré-

tratamento sobre a preservação dos neurônios hipocâmpais (Figura 5). A preservação de neurônios elicitada pelo tratamento com inibidores de AChE em lesões no SNC já foi demonstrada utilizando a contagem dessas células na região CA1 do hipocampo 5 semanas após a lesão no modelo HI neonatal tratado com huperzina A (Wang *et al.*, 2002) e 4 dias após o insulto no modelo de isquemia global em gerbis com galantamina na dose de 10mg/kg (Lorrio *et al.*, 2009). Esse estudo, no entanto, é o primeiro a demonstrar que o tratamento com inibidor de AChE já aumenta a sobrevivência neuronal 24 horas após a lesão no modelo de HI.

Ao contrário das células neuronais, a proporção de células microgliciais não foi modificada pela HI (Figura 6A). No entanto, estudos demonstram que em ratos adultos (Anderova *et al.*, 2011) e neonatos (Furukawa *et al.*, 2014a) o insulto promove alterações no número dessas células 24 horas após a lesão. Os trabalhos citados, porém, utilizam técnicas imunohistoquímicas de áreas específicas do hipocampo, enquanto que nesse estudo foi utilizada a citometria de fluxo para avaliar o número de células microgliciais na estrutura inteira, o que pode explicar as diferenças encontradas. É importante salientar que a reação microglial é duradoura e o número de células permanece elevado até pelo menos 7 dias após a lesão (Anderova *et al.*, 2011; Furukawa *et al.*, 2014b), sendo, portanto, um processo crônico, que não apresenta seu ápice no tempo analisado.

A proporção de células que expressa a proteína S100b também não sofreu alterações entre os grupos (Figura 6B). Há poucos estudos na literatura que quantificam o número de células que expressam S100b após o modelo experimental de HI e nenhum que o faça no tempo de 24h. O único estudo encontrado demonstra um aumento de células S100b+ 22 dias após a lesão (Jarlestedt *et al.*, 2010). Os níveis da proteína S100b também foram medidos no hipocampo e córtex ipsilaterais e também não encontramos diferenças significativas entre os

grupos (Figura 7B). Outro trabalho mostra um aumento da expressão dessa proteína no líquido cefalorraquidiano 72 horas após a lesão (Rodríguez-fanjul *et al.*, 2015), no entanto o tempo de análise e a diferença da estrutura usada dificulta a comparação com os presentes resultados.

A lesão não modificou a proporção de astrócitos (Figura 6C), o que já era esperado, pois essas células tendem a ser resistentes a insultos (Liu & McCullough, 2013) mantendo seu número inalterado nesse tempo no modelo de hipóxia isquemia em ratos adultos (Anderova *et al.*, 2011), corroborando com os achados deste trabalho. Embora a proporção de astrócitos (células GFAP+) revele informações relevantes sobre o processo de gliose reativa, a quantificação dessas proteínas fornece um panorama mais completo da reação dessas células à lesão. Ao contrário do número de astrócitos, os níveis da proteína GFAP tanto no hipocampo quanto no córtex ipsilaterais foram alterados pela lesão e revertidos pelo tratamento (Figura 7A). Concluímos, portanto, que a lesão provoca hipertrofia nessas células e não hiperplasia. Esse efeito no tamanho e não no número de astrócitos no hipocampo pode ser melhor observado na relação feita entre os dois resultados (Figura 7C), onde fica ainda mais claro o efeito do tratamento na redução da gliose reativa induzida pelo insulto. Os estudos com HI e inibidores de AChE sempre tiveram como foco os neurônios (Wang *et al.*, 2002) ou células microgliais (Furukawa *et al.*, 2014b), mas nenhum estudo investigou as alterações desse tratamento sobre as células astrocitárias, fazendo com que esse seja o primeiro estudo demonstrando o efeito desses inibidores na reação astrocitária frente à lesão.

A morte neuronal está frequentemente associada aos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (Liu & Zhang, 2014; Wang *et al.*, 2013), no entanto seus níveis não se mostraram alterados no hipocampo, no córtex e no baço (Figura 9). Esses resultados discordam de outros trabalhos que demonstram que 24 horas após HI é o pico da inflamação e

dos níveis de TNF- α no encéfalo (Liu & Zhang, 2014; Wang *et al.*, 2013). No entanto, um estudo com HI e tratamento com um agonista colinérgico também não encontrou diferenças nos níveis dessa citocina em nenhum dos grupos nesse tempo (Furukawa *et al.*, 2014a). Embora não tenhamos detectado diferenças nos níveis de TNF- α , outras citocinas provavelmente estão modulando a inflamação, como a interleucina 1 β que está aumentada após a HI e sua expressão é reduzida pelo pré-tratamento com galantamina (Furukawa *et al.*, 2014b), sugerindo que o tratamento pré-hipóxia pode ter um efeito anti-inflamatório que não fomos capazes de detectar com as técnicas usadas.

A via colinérgica anti-inflamatória já está bem descrita na literatura, agindo sobre as células T que produzem ACh no baço, tendo uma ação modulatória da inflamação após insultos (Andersson & Tracey, 2012; Metz & Tracey, 2005; Tracey, 2009). Nesse estudo não observamos diferenças significativas na proporção de células T nem nas células T que sintetizam ACh, embora haja uma tendência de aumento principalmente na proporção de células T colinérgicas na comparação entre os grupos Sham e HIS (Figura 10). Apesar de estudos demonstrarem a importância do baço na HI (Fathali *et al.*, 2013; Jellema *et al.*, 2013) esse é o primeiro trabalho que tentou demonstrar a ação da via colinérgica anti-inflamatória na HI, porém mais estudos são necessários para saber se esse fenômeno ocorre em algum outro momento que não o analisado.

As avaliações de parâmetros oxidativos revelaram não haver alterações na atividade da SOD no hipocampo ipsilateral 24 horas após a lesão (Figura 11A). Essa enzima é responsável pela eliminação do ânion superóxido através da dismutação dessa ERO em peróxido de hidrogênio e sua atividade não se mostrou alterada 24h (Alkan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011) nem 7 dias após a HI (Marcelino *et al.*, 2015), concordando com os resultados aqui encontrados. No entanto, outros estudos demonstraram sua atividade aumentada 2h após a

lesão (Weis *et al.*, 2011) e na idade adulta (Pereira *et al.*, 2009), o que demonstra o complexo padrão da atividade dessa enzima. A CAT, por outro lado, apesar de não ter sido alterada pela lesão, teve sua atividade aumentada no grupo HIG10-Pré (Figura 11B). Essa enzima converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo um importante componente das defesas anti-oxidantes (Weis *et al.*, 2011; Rojas *et al.* 2015). Outros estudos também demonstraram não haver alteração da sua atividade 2h após a HI (Weis *et al.*, 2011) e na idade adulta (Rojas *et al.*, 2015). Os níveis de DCF (indicadores da presença de EROs) no hipocampo ipsilateral não estavam alterados em nenhum dos grupos 24h após a lesão. Outros trabalhos demonstram que esses níveis não se mostram alterados após a HI em 2h (Weis *et al.*, 2011) nem na idade adulta (Pereira *et al.*, 2009), embora já haja registros de redução desses níveis nos animais lesados 7 dias após o insulto (Marcelino *et al.*, 2015). Apesar dos resultados do presente trabalho não terem demonstrado mudança nos níveis de EROs, não devemos concluir que o dano oxidativo não está ocorrendo. Hipotetizamos que o aumento da atividade da enzima CAT está contribuindo com as defesas anti-oxidantes e é um dos mecanismos de atuação da galantamina, que permite o aumento de sobrevivência neuronal e reduz o dano histológico na idade adulta, visto que as propriedades anti-oxidantes dos inibidores de AChE já foram demonstradas (Kumar & Kumar, 2009; Kutsuna *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que a inibição da AChE não se manteve até o período de 24h após a lesão (Figura 11D), o que sugere que os mecanismos que geraram a neuroproteção já haviam sido ativados anteriormente e os fenômenos observados são dos eventos secundários à inibição da enzima, não sendo resultados dependentes da ação direta do fármaco. Esse resultado era esperado, visto que a galantamina possui meia-vida de apenas poucas horas (Farlow, 2001). Tratamentos farmacológicos com inibidores reversíveis de AChE utilizados clinicamente são muitas vezes vistos como simples facilitadores cognitivos ou com ação

limitada à transmissão sináptica. No entanto, cada vez mais trabalhos mostram que a ação desses fármacos abrange muitos outros mecanismos (Francis *et al.*, 2005; Soreq & Seidman, 2001). Esse trabalho mostra que os mecanismos de proteção da galantamina são, ao menos em parte, por sua ação nas células gliais e no aumento das defesas anti-oxidantes que se estabelecem durante a fase secundária da lesão (Davidson *et al.*, 2015). O fato de que somente o tratamento pré-hipóxia foi efetivo evidencia a importância da janela terapêutica, e sugere que as ações da galantamina impediram a progressão dos mecanismos deletérios que ocorrem durante ou imediatamente após o insulto.

A gliose reativa é um fator determinante na gravidade da lesão e sabe-se que astrócitos e microglias possuem receptores colinérgicos. A ativação desses receptores está frequentemente associada a parâmetros de neuroproteção anti-inflamatórios e de redução da morte celular (Carnevale *et al.*, 2007; Furukawa *et al.*, 2014a; Liu *et al.*, 2015). Hipotetizamos que a administração de galantamina levou a um aumento dos níveis de ACh pela inibição da AChE, aumentando assim a ativação dos receptores presentes principalmente em astrócitos. Através disso, reduziram sua à HI - como demonstrado em nossos resultados (Figura 7) - prevenindo os efeitos deletérios desencadeados pela lesão, mediado por essas células. Outro possível mecanismo de ação que propomos é pelo aumento da atividade da CAT que já foi descrito como um mecanismo de ação de inibidores de AChE (Kumar & Kumar, 2009; Xiao *et al.*, 2000). O aumento da sua atividade reduz os danos causados pelo estresse oxidativo, o que também iria aumentar a sobrevivência celular e reduzir a lesão tecidual.

O pré-tratamento com galantamina foi neuroprotetor na dose de 10 mg/kg, sendo capaz de reverter os danos teciduais na idade adulta e aumentar a sobrevivência de neurônios 24 horas após a lesão, além de reduzir a reação astrogliar e aumentar a atividade da enzima anti-oxidante CAT. Esse trabalho aumenta a compreensão dos mecanismos de ação, tanto do

tratamento quanto da participação do sistema colinérgico nos mecanismos de progressão da lesão, demonstrando uma nova e interessante abordagem terapêutica com alto potencial translacional para HI em humanos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que o tratamento com galantamina:

- 1) É efetivo na dose de 10 mg/kg aplicados pré-hipóxia, visto que esse protocolo de administração foi o único capaz de reverter a lesão tecidual no hipocampo ipsilesional causada pela HI.
- 2) É capaz de prevenir a redução de neurônios no hipocampo ipsilateral provocada pela HI 24 horas após a lesão.
- 3) Agiu reduzindo a reação astrogliar no hipocampo e córtex ipsilaterais induzida pela HI 24 horas após a lesão.
- 4) Não agiu sobre o TNF- α que também não foi alterado pela HI nem no hipocampo, nem no córtex e nem no baço 24 horas após a lesão.
- 5) Não foi detectada ação sobre a via colinérgica anti-inflamatória, não alterando o número de células T colinérgicas no baço 24 horas após a lesão.
- 6) Aumentou a atividade da enzima anti-oxidante CAT no hipocampo ipsilateral 24 horas após a lesão.
- 7) Possui uma janela terapêutica estreita, pois não manteve a inibição da AChE 24 horas após a lesão.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Alkan, T., Goren, B., Vatansever, E., Sarandol, E., 2008. Effects of hypoxic preconditioning in antioxidant enzyme activities in hypoxic-ischemic brain damage in immature rats. *Turk Neurosurg* 18, 165–171.
- Anderova, M., Vorisek, I., Pivonkova, H., Benesova, J., Vargova, L., Cicanic, M., Chvatal, A., Sykova, E., 2011. Cell death/proliferation and alterations in glial morphology contribute to changes in diffusivity in the rat hippocampus after hypoxia-ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* doi:10.1038/jcbfm.2010.168
- Andersson, U., Tracey, K.J., 2012. Reflex Principles of Immunological Homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075015
- Arteni, N.S., Pereira, L.O., Rodrigues, A.L., Lavinsky, D., Achaval, M.E., Netto, C.A., 2010. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav. Brain Res.* 210, 92–98. doi:10.1016/j.bbr.2010.02.015
- Arteni, N.S., Salgueiro, J., Torres, I., Achaval, M., Netto, C.A., 2003. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res.* 973, 171–178. doi:10.1016/S0006-8993(03)02436-3
- Barks, J.D., Silverstein, F.S., 1992. Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Pathol.* 2, 235–243.
- Berger, R., Garnier, Y., 1999. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30, 107–134. doi:10.1016/S0165-0173(99)00009-0
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Burda, J.E., Sofroniew, M. V, 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229–48. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.034
- Carnevale, D., De Simone, R., Minghetti, L., 2007. Microglia-neuron interaction in inflammatory and degenerative diseases: role of cholinergic and noradrenergic systems. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 6, 388–397. doi:10.2174/187152707783399193
- Dafre, A.L., Arteni, N.S., Siqueira, I.R., Netto, C.A., 2003. Perturbations in the thiol homeostasis following neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* 345, 65–68. doi:10.1016/S0304-3940(03)00510-X
- Davidson, J.O., Wassink, G., van den Heuvel, L.G., Bennet, L., Gunn, A.J., 2015. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy - Where to from here? *Front. Neurol.* doi:10.3389/fneur.2015.00198
- de Andrade, J.P., Giordani, R.B., Torras-Claveria, L., Pigni, N.B., Berkov, S., Font-Bardia,

- M., Calvet, T., Konrath, E., Bueno, K., Sachett, L.G., Dutilh, J.H., de Souza Borges, W., Viladomat, F., Henriques, A.T., Nair, J.J., Zuanazzi, J.A.S., Bastida, J., 2015. The Brazilian Amaryllidaceae as a source of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. *Phytochem. Rev.* 147–160. doi:10.1007/s11101-015-9411-7
- Dugan, J.M., Berrios, D.C., Liu, X., Kim, D.K., Kaizer, H., Fagan, L.M., 1999. Automation and integration of components for generalized semantic markup of electronic medical texts. *Proc. AMIA Symp.* 736–740.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9
- Farlow, M.R., 2001. Pharmacokinetic profiles of current therapies for Alzheimer’s disease: Implications for switching to galantamine, in: *Clinical Therapeutics*. doi:10.1016/S0149-2918(01)80164-8
- Fathali, N., Ostrowski, R.P., Hasegawa, Y., Lekic, T., Tang, J., Zhang, J.H., 2013. Splenic Immune Cells in Experimental Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Transl. Stroke Res.* 4, 208–219. doi:10.1007/s12975-012-0239-9
- Francis, P.T., Nordberg, A., Arnold, S.E., 2005. A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: Do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer’s disease? *Trends Pharmacol. Sci.* doi:10.1016/j.tips.2004.12.010
- Furukawa, S., Sameshima, H., Yang, L., Harishkumar, M., Ikenoue, T., 2014a. Regional differences of microglial accumulation within 72 hours of hypoxia-ischemia and the effect of acetylcholine receptor agonist on brain damage and microglial activation in newborn rats. *Brain Res.* 1562, 52–58. doi:10.1016/j.brainres.2014.03.028
- Furukawa, S., Sameshima, H., Yang, L., Ikenoue, T., 2013. Activation of acetylcholine receptors and microglia in hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Dev.* 35, 607–613. doi:10.1016/j.braindev.2012.10.006
- Furukawa, S., Sameshima, H., Yang, L., Ikenoue, T., 2011. Acetylcholine receptor agonist reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. *Reprod. Sci.* 18, 172–179. doi:10.1177/1933719110385129
- Furukawa, S., Yang, L., Sameshima, H., 2014b. Galantamine, an acetylcholinesterase inhibitor, reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 37, 52–57. doi:10.1016/j.ijdevneu.2014.06.011
- Greenblatt, H.M., Kryger, G., Lewis, T., Silman, I., Sussman, J.L., 1999. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett.* 463, 321–326. doi:10.1016/S0014-5793(99)01637-3
- Hassell, K.J., Ezzati, M., Alonso-Alconada, D., Hausenloy, D.J., Robertson, N.J., 2015. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 100, F541–F552. doi:10.1136/archdischild-2014-306284
- Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Dutra, M.F., Petenuzzo, L., de Lima, B.O., Fernandes, C.G., da Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2013. Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis

- and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride. *Neurotoxicology* 34, 175–188. doi:10.1016/j.neuro.2012.10.015
- Hossmann, K.-A., 2008. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 55, 257–70. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.12.004
- Huang, Z., Liu, J., Cheung, P.Y., Chen, C., 2009. Long-term cognitive impairment and myelination deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res.* 1301, 100–109. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.006
- Jansen, E.M., Low, W.C., 1996. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav. Brain Res.* 78, 189–194. doi:10.1016/0166-4328(95)00248-0
- Jarlestedt, K., Rousset, C.I., Faiz, M., Wilhelmsson, U., Stahlberg, A., Sourkova, H., Pekna, M., Mallard, C., Hagberg, H., Pekny, M., 2010. Attenuation of reactive gliosis does not affect infarct volume in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *PLoS One* 5, e10397. doi:10.1371/journal.pone.0010397
- Jellema, R.K., Lima Passos, V., Zwanenburg, A., Ophelders, D.R.M.G., De Munter, S., Vanderlocht, J., Germeraad, W.T. V, Kuypers, E., Collins, J.J.P., Cleutjens, J.P.M., Jennekens, W., Gavilanes, A.W.D., Seehase, M., Vles, H.J., Steinbusch, H., Andriessen, P., Wolfs, T.G.A.M., Kramer, B.W., 2013. Cerebral inflammation and mobilization of the peripheral immune system following global hypoxia-ischemia in preterm sheep. *J. Neuroinflammation* 10, 13. doi:10.1186/1742-2094-10-13
- Jin, Y., Silverman, A.J., Vannucci, S.J., 2009. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Stroke.* 40, 3107–3112. doi:10.1161/STROKEAHA.109.549691
- Johnston, M. V., 2001. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 7, 229–234. doi:10.1002/mrdd.1032
- Konrath, E.L., Neves, B.M., Passos, C.D.S., Lunardi, P.S., Ortega, M.G., Cabrera, J.L., Gonçalves, C.A., Henriques, A.T., 2012. Huperzia quadrifariata and Huperzia reflexa alkaloids inhibit acetylcholinesterase activity in vivo in mice brain. *Phytomedicine* 19, 1321–1324. doi:10.1016/j.phymed.2012.08.009
- Kumar, P., Kumar, A., 2009. Protective effect of rivastigmine against 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease like symptoms: Possible behavioural, biochemical and cellular alterations. *Eur. J. Pharmacol.* 615, 91–101. doi:10.1016/j.ejphar.2009.04.058
- Kutsuna, S., Tsuruta, R., Fujita, M., Todani, M., Yagi, T., Ogino, Y., Igarashi, M., Takahashi, K., Izumi, T., Kasaoka, S., Yuasa, M., Maekawa, T., 2010. Cholinergic agonist physostigmine suppresses excessive superoxide anion radical generation in blood, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Res.* 1313, 242–249. doi:10.1016/j.brainres.2009.11.077
- Lebel, C.P., Ali, S.F., McKee, M., Bondy, S.C., 1990. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: The potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104, 17–24. doi:10.1016/0041-008X(90)90278-3

- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M.V. de, Gottfried, C., Gonçalves, C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.021
- Liu, F., McCullough, L.D., 2013. Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 1121–30. doi:10.1038/aps.2013.89
- Liu, W., Zhang, Y., 2014. in *Neuronal Apoptosis in Neonatal Rat With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy* 905–909.
- Liu, Y., Zeng, X., Hui, Y., Zhu, C., Wu, J., Taylor, D.H., Ji, J., Fan, W., Huang, Z., Hu, J., 2015. Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors protects astrocytes against oxidative stress-induced apoptosis: implications for Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 91, 87–96. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.11.028
- Lorrio, S., Negredo, P., Roda, J.M., García, A.G., López, M.G., 2009. Effects of memantine and galantamine given separately or in association, on memory and hippocampal neuronal loss after transient global cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res.* 1254, 128–137. doi:10.1016/j.brainres.2008.11.095
- Low, J.A., Pickersgill, H., Killen, H., Derrick, E.J., 2001. The prediction and prevention of intrapartum fetal asphyxia in term pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184, 724–730. doi:10.1067/mob.2001.111720
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., Kivipelto, M., 2010. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.* 9, 702–16. doi:10.1016/S1474-4422(10)70119-8
- Marcelino, T.B., De Lemos Rodrigues, P.I., Miguel, P.M., Netto, C.A., Pereira Silva, L.O., Mattos, C., 2015. Effect of maternal exercise on biochemical parameters in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 1622, 91–101. doi:10.1016/j.brainres.2015.06.024
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x
- McLean, C., Ferriero, D., 2004. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin. Perinatol.* doi:10.1053/j.semperi.2004.10.005
- Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duyzen, E.G., Lockridge, O., 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110, 627–639. doi:10.1016/S0306-4522(01)00613-3
- Metz, C.N., Tracey, K.J., 2005. It takes nerve to dampen inflammation. *Nat. Immunol.* 6, 756–757. doi:10.1038/ni0805-756
- Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M., 1999. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res. Bull.* doi:10.1016/S0361-9230(98)00170-1
- Odorcyk, F.K., Netto, C.A., 2013. Efeitos do extrato de *Huperzia quadrifariata* no modelo de

Hipóxia-Isquemia neonatal em ratos. Lume UFRGS.

- Okada, H., Ouchi, Y., Ogawa, M., Futatsubashi, M., Saito, Y., Yoshikawa, E., Terada, T., Oboshi, Y., Tsukada, H., Ueki, T., Watanabe, M., Yamashita, T., Magata, Y., 2013. Alterations in $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors in cognitive decline in Alzheimer's aetiopathology. *Brain* 136, 3004–3017. doi:10.1093/brain/awt195
- Pereira, L.O., Arteni, N.S., Petersen, R.C., da Rocha, A.P., Achaval, M., Netto, C.A., 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. doi:10.1016/j.nlm.2006.07.003
- Pereira, L.O., Nabinger, P.M., Strapasson, A.C.P., Nardin, P., Gonçalves, C.A.S., Siqueira, I.R., Netto, C.A., 2009. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia-ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. *Brain Res.* 1247, 188–195. doi:10.1016/j.brainres.2008.10.017
- Pimentel, V.C., Gomes, J.L., Zanini, D., Abdalla, F.H., Da Costa, P., Gonçalves, J.F., Duarte, M.M.M.F., Moretto, M.B., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2013. Evaluation of acetylcholinesterase and adenosine deaminase activities in brain and erythrocytes and proinflammatory cytokine levels in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia model. *Mol. Cell. Biochem.* 378, 247–255. doi:10.1007/s11010-013-1615-9
- Portera-Cailliau, C., Price, D.L., Martin, L.J., 1997. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J. Comp. Neurol.* 378, 70–87. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19970203)378:1<10::AID-CNE4>3.0.CO;2-N
- Rice, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9, 131–141. doi:10.1002/ana.410090206
- Rodríguez-fanjul, J., Fernández-feijóo, C.D., Camprubí, M.C., 2015. A New Technique for Collection of Cerebrospinal Fluid in Rat Pups 37–41. doi:10.4137/JEN.S26182.RECEIVED
- Rojas, J.J., Deniz, B.F., Schuch, C.P., Carletti, J. V., Deckmann, I., Diaz, R., Matté, C., dos Santos, T.M., Wyse, A.T., Netto, C.A., Pereira, L.O., 2015. Environmental stimulation improves performance in the ox-maze task and recovers Na⁺,K⁺-ATPase activity in the hippocampus of hypoxic-ischemic rats. *Neuroscience* 291, 118–127. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.017
- Rossiter, J.P., Anderson, L.L., Yang, F., Cole, G.M., 2002. Caspase-3 activation and caspase-like proteolytic activity in human perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Acta Neuropathol.* 103, 66–73. doi:10.1007/s004010100432
- Saito, A., Maier, C.M., Purnima Narasimhan, Nishi, T., Song, Y.S., Yu, F., Liu, J., Lee, Y., Nito, C., Kamada, H., Dodd, R.L., Hsieh, L.B., Hassid, B., Kim, E.E., González, M., Chan, P.H., 2005. Oxidative Stress and Neuronal Death / Survival Signaling in Cerebral Ischemia. *Mol. Neurobiol.* 31, 105–116.
- Sanches, E.F., Arteni, N., Nicola, F., Aristimunha, D., Netto, C.A., 2015. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-

- ischemia in P3 and P7 rats. *Neuroscience* 290, 581–593. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.12.074
- Schwarz, S., Froelich, L., Burns, A., 2012. Pharmacological treatment of dementia. *Curr. Opin. Psychiatry*. doi:10.1097/YCO.0b013e328358e4f2
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* doi:10.1038/35067589
- Tracey, K.J., 2009. Reflex control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 418–428. doi:10.1038/nri2566
- Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andreatza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Goncalves, C.A., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* 162, 282–286. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.01.001
- Vannucci, R.C., Perlman, J.M., 1997. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 100, 1004–14. doi:10.1542/peds.100.6.1004
- Vizuete, A.F., De Souza, D.F., Guerra, M.C., Batassini, C., Dutra, M.F., Bernardi, C., Costa, A.P., Gonçalves, C.A., 2013. Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats. *Life Sci.* 92, 923–928. doi:10.1016/j.lfs.2013.03.004
- Volpe, J.J., 2009. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol.* doi:10.1016/S1474-4422(08)70294-1
- Wang, J., Zhang, H.Y., Tang, X.C., 2010. Huperzine A improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion. *J. Neurosci. Res.* 88, 807–815. doi:10.1002/jnr.22237
- Wang, L.S., Zhou, J., Shao, X.M., Tang, X.C., 2002. Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury in neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 949, 162–170. doi:10.1016/S0006-8993(02)02977-3
- Wang, Y., Cao, M., Liu, A., Di, W., Zhao, F., Tian, Y., Jia, J., 2013. Changes of inflammatory cytokines and neurotrophins emphasized their roles in hypoxic-ischemic brain damage. *Int. J. Neurosci.* 123, 191–5. doi:10.3109/00207454.2012.744755
- Weis, S.N., Pettenuzzo, L.F., Krolow, R., Valentim, L.M., Mota, C.S., Dalmaz, C., Wyse, A.T.S., Netto, C.A., 2012. Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* 12, 271–279. doi:10.1016/j.mito.2011.10.002
- Weis, S.N., Schunck, R.V.A., Pettenuzzo, L.F., Krolow, R., Matté, C., Manfredini, V., do Carmo R Peralba, M., Vargas, C.R., Dalmaz, C., Wyse, A.T.S., Netto, C.A., 2011. Early biochemical effects after unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 115–20. doi:10.1016/j.ijdevneu.2010.12.005
- Xiao, X.Q., Wang, R., Tang, X.C., 2000. Huperzine A and tacrine attenuate β -amyloid peptide-induced oxidative injury. *J. Neurosci. Res.* 61, 564–569. doi:10.1002/1097-4547(20000901)61:5<564::AID-JNR11>3.0.CO;2-X
- Zangara, A., 2003. The psychopharmacology of huperzine A: An alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's

disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* doi:10.1016/S0091-3057(03)00111-4

Zhang, X., Song, L., Cheng, X., Yang, Y., Luan, B., Jia, L., Xu, F., Zhang, Z., 2011. Carnosine pretreatment protects against hypoxia-ischemia brain damage in the neonatal rat model. *Eur. J. Pharmacol.* 667, 202–207. doi:10.1016/j.ejphar.2011.06.003