

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

***EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS EM RATOS  
SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL.***

Jaqueline Vieira Carletti

Porto Alegre

2012

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

***EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS EM RATOS  
SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Neurociências.

Jaqueline Vieira Carletti

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

Porto Alegre

2012

Dedico este trabalho a minha vó Lidia Carletti "*in memoriam*".

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Lenir pela oportunidade, amizade, incentivo à pesquisa e grande ajuda na bancada!

Aos professores colaboradores deste trabalho: Angela Wyse, Carlos Alexandre Netto e Jorge Quillfeldt. Obrigada!

Aos queridos Mestres do PPG Neurociências por passar o conhecimento de uma forma poética e majestosa. Admiro-os muito!

Aos amigos e colegas do laboratório do professor “Alex”: Simone, Nice, Eduardo (Obrigada por ensinar a HI!!), Janine e Régis.

Aos meus colegas e amigos de laboratório que compartilharam comigo momentos de muitas risadas e muita concentração: Ramiro, Joseane, Bruna, Patrícia, Clarissa, Luisa e Sílvia.

Aos alunos do Professor Jorge por nos receberem muito bem lá no “*Water Maze*” e a Dona Zelma que fazia nossos dias mais felizes ainda!

Aos funcionários do ratário, em especial a Dona Geni pelo fornecimento dos animais.

À minha família mãe, pai, mano, Osmar, que sempre me incentivaram a ir em frente!

As minhas amigonas do peito: Juliana Biacchi, Patrícia Cunha e Ana Cristina por estarem sempre torcendo por mim e mesmo de longe mandarem boas vibrações.

Ao meu amorzão querido e amigo Gean por ter me aguentado, me amado e por ter me incentivado muito a pesquisar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Enfim, Obrigada a todos que colaboraram de alguma forma para que este trabalho fosse desenvolvido.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Hipóxia-Isquemia Encefálica Neonatal.....	2
1.2. Modelos Animais.....	5
1.3. Ácido Fólico.....	8
2. Objetivos.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. Desenho Experimental.....	12
4. Experimento 1. <b><i>“Folic acid prevents behavioral impairment and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia”</i></b> .....	14
5. Experimento 2.....	37
5.1 Materiais e Métodos.....	37
5.1.1 Animais.....	37
5.1.2 Indução de Hipóxia-Isquemia.....	37
5.1.3 Tratamento com Ácido Fólico.....	38
5.2 Análise Comportamental.....	39

5.2.1 Labirinto Aquático de <i>Morris</i> .....	39
5.2.1.1 Avaliação da Memória de Referência.....	39
5.2.1.2 Avaliação da Memória de Trabalho.....	40
5.3 Estudos Morfológicos.....	40
5.3.1 Volume Hipocampal.....	41
5.3.2 Volume do Corno de Ammon.....	42
5.3.3 Área do Estriado.....	42
5.4 Análise Estatística.....	43
6. Resultados.....	44
6.1 Labirinto Aquático de <i>Morris</i> .....	44
6.1.1 Memória de Referência.....	44
6.1.2 Memória de Trabalho.....	49
6.2 Análise Morfológica.....	50
6.2.1 Volume Hipocampal.....	50
6.2.2 Volume do Corno de Ammon.....	51
6.2.3 Área do Estriado.....	52
6.3 Discussão.....	54
7. Discussão Geral.....	57
8. Conclusões.....	63
9. Perspectivas.....	64
10. Referências Bibliográficas.....	65

## 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 – Trifosfato de Adenosina

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DPN – Dias Pós-natal

ER – Retículo Endoplasmático

FDA – *Food and Drugs Administration*

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial

HI – Hipóxia-Isquemia

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

mGlu – Receptor Metabotrópico de Glutamato

NMDA – N-Metil D-Aspartato

nNOS – Oxido Nítrico Sintase Neuronal

OMS – Organização Mundial da Saúde

SNC – Sistema Nervoso Central

VDCC – Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Patogênese da hipóxia-isquemia neonatal.....	4
<b>Figura 2.</b> Modelo de Levine-Rice (1981). Indução de Hipóxia Isquemia Neonatal.....	5
<b>Figura 3.</b> Curva de velocidade, comparando índices relativos, duração e tempo do processo de desenvolvimento específicos no SNC de ratos e humanos....	7
<b>Figura 4.</b> Desenho experimental 1.....	13
<b>Figura 5.</b> Desenho experimental 2.....	13
<b>Experimento 1</b>	
<b>Figura 1</b> Time line of experimental procedures.....	33
<b>Figura 2</b> Inhibitory avoidance.....	34
<b>Figura 3</b> Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase activity.....	35
<b>Experimento 2</b>	
<b>Figura 1.</b> Curva de Aprendizado no Labirinto Aquático de <i>Morris</i> durante o treino no protocolo para memória de referência.....	46
<b>Figura 2.</b> Tempo gasto no quadrante alvo no dia de teste.....	47
<b>Figura 3.</b> Tempo gasto no quadrante oposto.....	47
<b>Figura 4.</b> Latência para encontrar o alvo.....	48
<b>Figura 5.</b> Número de cruzamentos no alvo.....	48
<b>Figura 6.</b> Curva de Aprendizado no Labirinto Aquático de <i>Morris</i> no protocolo para memória de trabalho.....	49
<b>Figura 7.</b> Volume hipocampal.....	51
<b>Figura 8.</b> Volume do Corno de Ammon.....	52
<b>Figura 9.</b> Área do estriado.....	53

## LISTA DE TABELAS

### Experimento 1

<b>Tabela 1.</b> Open Field.....	36
----------------------------------	----

## RESUMO

Estudos com animais submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia (HI) neonatal reproduzem achados observados em humanos, tais como transtornos de aprendizado, comprometimento tecidual nervoso e alterações bioquímicas. O ácido fólico (AF), uma vitamina que pode ser obtida diretamente da dieta, tem sido relacionado à prevenção de eventos isquêmicos, e a proteção antioxidante. O objetivo deste estudo foi investigar o papel do tratamento com ácido fólico sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e morfológicos de animais submetidos à HI. Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos com sete dias pós-natal (DPN) divididos em quatro grupos: 1) grupo controle tratado com salina 0,9% (CTS); 2) grupo controle tratado com ácido fólico (CTAF); 3) grupo HI tratado com salina 0,9% (HIS); 4) grupo HI tratado com ácido fólico (HIAF). Uma dose intraperitoneal de ácido fólico (0,011  $\mu\text{mol/g}$  de peso corporal) foi administrada imediatamente antes do procedimento de HI e, após, diariamente até o 30 ou 40 DPN. No experimento 1 investigamos os efeitos do tratamento com AF sobre o comportamento motor, memória aversiva e atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Os resultados demonstraram um efeito ansiogênico nos animais HI visto no campo aberto, prejuízo na memória aversiva no teste de esQUIVA inibitória e ainda diminuição na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. No entanto, os animais HI tratados com ácido fólico não apresentaram estes efeitos, indicando uma reversão desses achados. O experimento 2 teve como objetivo investigar se o tratamento com AF influenciaria em outro tipo de memória, como a de referência e se seria efetivo na reversão da atrofia hipocampal causada pela HI. Nossos resultados

indicaram que houve prejuízo no aprendizado na tarefa do labirinto aquático de *Morris* nos animais HI tanto na memória de referência quanto na memória de trabalho. Também, houve diminuição do volume hipocampal e área estriatal nesses animais. Todavia, observamos significativa melhora no quadro de atrofia hipocampal nos animais tratados com AF. Portanto, esses dados demonstram que o tratamento com ácido fólico desempenha um papel relevante na reversão do efeito ansiogênico, do déficit na memória aversiva, na prevenção da inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{ATPase}$  e recuperação do volume hipocampal ocasionados pela HI neonatal.

**Palavras-chave:** Hipóxia-isquemia, Ácido Fólico, Memória,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{ATPase}$

## ABSTRACT

Perinatal hypoxic-ischemic (HI) is a significant cause of mortality and morbidity in infants and young children. Folic acid is a water soluble vitamin that can be obtained through diet and has been related to the antioxidant effect, protecting ischemic events and Alzheimer's disease. The aim of this study was to investigate the role of the folic acid treatment over the behavioral, biochemical and morphologic alterations in animals submitted to neonatal HI model. Four groups of seven days-old Wistar rats, of both sexes, were used in the experiments: 1) control group treated with saline 0.9% (CT-S); 2) control group treated with folic acid (CT-FA); 3) HI group treated with saline 0.9% (HI-S); 4) HI group treated with folic acid (HI-FA). Folic acid was intraperitoneal administrated ( $0.011\mu\text{mol/g}$  of body weight) once before HI procedure and injections were repeated daily until the 30<sup>th</sup> or 40<sup>th</sup> postnatal day. Results were obtained from two experiments. In the first, it was investigated the effects of the FA treatment on motor performance, aversive memory and enzymatic  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. Rats submitted to HI demonstrated an ansiogenic effect in the open field task, impairment in the aversive memory during avoidance test and reduction in the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. Nevertheless, when treated with folic acid, all symptoms were reverted, as observed in the animal group HI treated with folic acid. The second experiment investigated the influence of the folic acid treatment in the spatial memory, working memory and recovery of hippocampus atrophy caused by HI. Results showed impairment in the learning task during Morris' *water maze and* reduction in hippocampus volume and area striatal due to HI. Folic acid treatment until the 40<sup>th</sup> postnatal day was able to

reverse significantly the hippocampus atrophy. Therefore, these results demonstrate that folic acid play an important role in the recovery of the angiogenic effect, aversive memory impairment, hippocampus atrophy and  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition caused by neonatal HI.

**Keywords:** Hypoxia-Ischemia, Folic Acid, Memory,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

## 1. Introdução

O nascimento de uma criança é um fenômeno associado com a interrupção da circulação feto-placentária. No período perinatal o neonato ainda possui seus sistemas em desenvolvimento, principalmente o encéfalo, que pode ser afetado por qualquer desequilíbrio estressor, como a asfixia, e ter sua estrutura e funcionamento comprometidos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 1995 que de 130 milhões de nascimentos mundiais por ano, quatro milhões apresentavam asfixia perinatal, e destes um milhão evoluíram com seqüelas graves. Em relação às doenças que necessitam de assistência especializada, destaca-se a hipóxia-isquemia (HI) encefálica neonatal que traz inúmeras consequências para o neonato, ocasionando, nos casos mais graves a encefalopatia hipóxico-isquêmica e paralisia cerebral. Inúmeras causas podem ser atribuídas à HI, tais como: prematuridade do neonato, dificuldades da expulsão e sofrimento do feto, desnutrição, interrupção do fluxo sanguíneo umbilical, insuficiente troca de gases pela placenta (PROCIANOY & SILVEIRA, 2001).

Na última década, a OMS verificou que aproximadamente 23% dos óbitos neonatais no Brasil, ocorreram por complicações geradas pela hipóxia-isquemia neonatal. Isto demonstra a importância de pesquisas que possam abranger tanto a compreensão da fisiopatologia da HI, quanto o desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras que possam proteger possíveis lesões encefálicas.

## 1.1 Hipóxia-Isquemia Encefálica Neonatal

A hipóxia-isquemia neonatal é um evento lesivo ao sistema nervoso que altera a integridade estrutural e funcional do seu desenvolvimento (ESQUILIANO *et al.*, 2004), que ocorre devido a complicações no período perinatal, representando causas frequentes de sequelas neurológicas como: paralisia cerebral, retardo mental, epilepsia, alterações sensoriais e transtornos de aprendizado (VOLPE, 2000; PAULA *et al.*, 2009). Um estudo prospectivo realizado por Cruz e Seccon (2010), em um hospital de São Paulo, observou uma prevalência de asfixia perinatal em recém-nascidos de 3,2 para cada 1000 nascidos vivos. Esse mesmo estudo indicou que desses infantes, 1,7 desenvolveram encefalopatia hipóxico-isquêmica.

A Encefalopatia causada pela HI está intimamente relacionada à asfixia perinatal, e qualquer processo mórbido que envolva a presença de hipoxemia, isquemia e acidose no feto, seja no período anterior ao parto ou durante o mesmo, pode desencadear uma cascata de alterações que culminarão em lesão do sistema nervoso central (GUINSBURG, 2002).

De acordo com a *American Academy of Pediatrics* (1996), o diagnóstico da asfixia neonatal em humanos é determinado por alguns critérios, são eles: acidemia em sangue de cordão umbilical considerando um pH <7,0, escore de Apgar de 0-3 por mais de cinco minutos, manifestações neurológicas neonatais, e disfunção orgânica sistêmica. Diferentes causas estão relacionadas à lesão isquêmica, sendo a principal a redução do aporte sanguíneo para o encéfalo (PERLMAN, 2006) que levará a eventos tóxicos

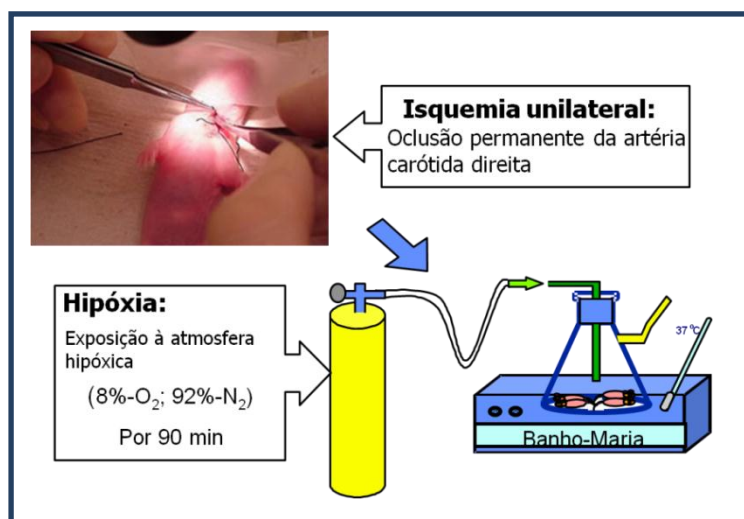


desencadeados por diversos mecanismos, tais como, falência energética, liberação de aminoácidos excitatórios como glutamato, e acúmulo de radicais livres (MCLEAN & FERRIERO, 2004). No nível celular, o aporte insuficiente de oxigênio causa uma diminuição de ATP devido à glicólise anaeróbia, e essa indisponibilidade no fornecimento de ATP não permite o correto funcionamento da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{ATPase}$ , enzima que é crítica para manutenção da excitabilidade normal da membrana celular, comprometendo assim o fluxo normal da informação nervosa. O estresse oxidativo causado pela diminuição do aporte de fluxo sanguíneo e conseqüente falha energética leva à formação de radicais livres que, em excesso, apresentam efeitos prejudiciais como: peroxidação lipídica, agressão às proteínas e enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS *et al.*, 2006). O encéfalo imaturo do recém-nascido é mais vulnerável ao dano oxidativo devido a altas concentrações de ácidos graxos insaturados, de ferro livre e deficiências das enzimas antioxidantes, sugerindo que os neurônios nessa fase são mais suscetíveis à morte, pelo fato de estarem em constante desenvolvimento e necessitarem de um bom aporte cerebrovascular para isso (YAGER *et al.*, 2004; MCLEAN & FERRIERO, 2004; LAFEMINA *et al.*, 2006). A excitotoxicidade glutamatérgica ocorre também devido à falha energética nos astrócitos, que, prejudicados, não podem fazer a remoção desse aminoácido da fenda sináptica, levando a maior ativação dos receptores pós-sinápticos, como o receptor N-Metil D-Aspartato (NMDA) que por ser ionotrópico permite um influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Na}^+$  para célula. Esse evento dispara uma cascata de sinalização através da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), a qual aumentará ainda mais os níveis de espécies reativas de oxigênio e danos mitocondriais, que levarão à morte neuronal e glial por



## 1.2 Modelos Animais

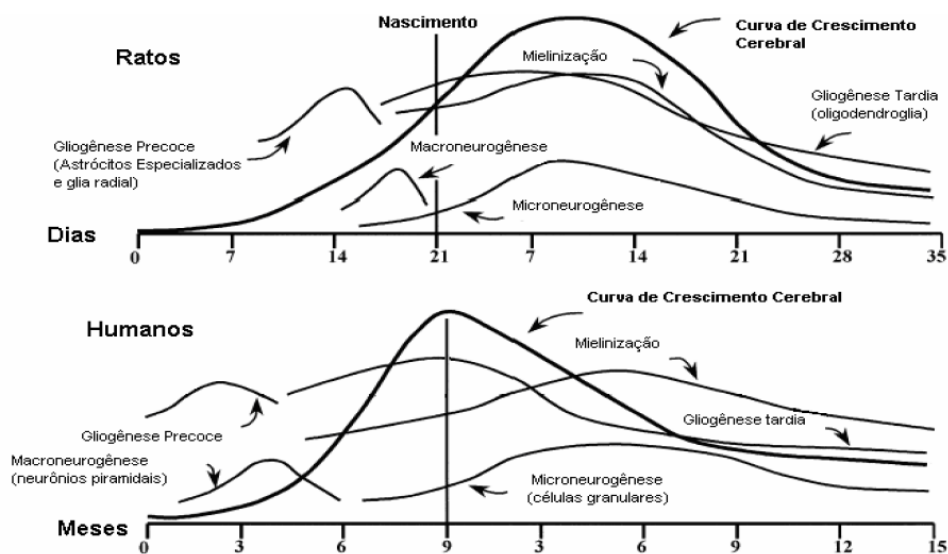
Para que todos os efeitos da HI, os mecanismos causadores, e suas conseqüências, possam ser entendidos é necessário um modelo animal que reproduza a neuropatologia encontrada em neonatos humanos após um insulto hipóxico-isquêmico (YAGER, 2004). O método de Levine (1960) modificado por Rice e colaboradores (1981) (Fig. 2), tem sido amplamente utilizado e reproduz uma lesão unilateral cerebral com danos no estriado, córtex e hipocampo, principalmente, do lado ipsilateral da oclusão da artéria carótida dos ratos, após serem expostos a um ambiente hipóxico (PEREIRA *et al.*, 2007). Animais submetidos a este modelo de lesão sofrem alterações cognitivas, morfológicas e bioquímicas (ARTENI, *et al.*, 2003, IKEDA *et al.*, 2008), comparadas àquelas observadas em humanos recém-nascidos após HI.



**Figura 2.** Modelo de Levine-Rice (1981). Indução de Hipóxia-Isquemia Neonatal.

O encéfalo de ratos com sete dias de vida tem sido histologicamente comparado ao de fetos humanos com 32-34 semanas de vida gestacional, os quais possuem similaridade quanto à proliferação celular, organização cortical, número de sinapses, síntese de neurotransmissores e na eletrofisiologia (LIU *et al.*, 1999; SANDERS *et al.*, 2005; VANNUCCI & VANNUCCI, 2005) (Fig. 3). Estudos da literatura têm identificado déficits cognitivos em roedores submetidos ao modelo de HI. Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram a presença de 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). Também no teste de esQUIVA inibitória (ARTENI *et al.*, 2003) e no teste de reconhecimento de objetos (PEREIRA *et al.*, 2008) foi identificado o déficit cognitivo pós HI.

Neste modelo, as vantagens vão além das mudanças histopatológicas consistentes e previsíveis: o animal é de fácil manuseio, os estudos são facilmente desempenhados, o custo financeiro é modesto e sua reprodutibilidade é alta, além disso, mesmo com a oclusão da artéria carótida a recuperação do fluxo é possível, produzindo lesão do hipocampo, estriado e córtex ipsilaterais à oclusão arterial (VANUCCI & VANUCCI, 2005). Uma variedade de outros protocolos para indução da hipóxia perinatal também têm sido propostos, porém menos estudados (WEITZDOERFER *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Curva de velocidade, comparando índices relativos, duração e tempo do processo de desenvolvimento específicos no SNC de ratos e humanos. As curvas do rápido crescimento cerebral são sobrepostas em relação aos eventos relativos ao desenvolvimento do SNC. No humano, há aquisição de aproximadamente 72% do peso cerebral adulto ao nascimento. (Adaptado de MORGANE *et al.*, 2002)

Na tentativa de amenizar o dano encefálico causado pela HI, algumas estratégias farmacológicas de neuroproteção têm sido utilizadas. Destacam-se moléculas como o resveratrol, a melatonina e as vitaminas, que são muito eficazes no combate ao estresse oxidativo. Della-Morte e colaboradores (2009) demonstraram que a utilização de resveratrol, como tratamento da isquemia cerebral, induz maior produção de ATP na mitocôndria através da via da Sirtuína-1; e Carloni e colaboradores (2007) observaram que animais que sofreram HI, tratados com melatonina, obtiveram melhora significativa na atrofia do hipocampo e córtex quando comparados com animais controle, além de apresentarem melhor memória espacial no labirinto aquático de Morris.

### 1.3 Ácido Fólico

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, pertencente à família do ácido pteroilglutâmico, naturalmente presente em alimentos como brócolis, espinafre, fígado, rim, levedo de cerveja e algumas frutas (BRODY, 1991; FRANCO, 1992). Apesar de sua grande presença na alimentação os folatos são facilmente destruídos no cozimento, chegando até 90% da perda desse nutriente (VANNUCCHI & JORDÃO, 1998). O ácido fólico sintético possui biodisponibilidade de 85 a 100% enquanto que a forma natural tem biodisponibilidade em torno de 50% (TRUMBO *et al.*, 2003). O folato participa como cofator do metabolismo de um carbono e está envolvido na biossíntese de nucleotídeos, reações de metilação e produção de mielina (CZEIZEL, 1996; SCOTT *et al.*, 2000). Os folatos fornecidos pela dieta, na forma de poliglutamatos, são absorvidos no intestino, principalmente no primeiro terço do intestino delgado. Para que essa absorção ocorra, os folatos precisam ser hidrolisados a monoglutamatos pela enzima  $\gamma$ -glutamil hidrolase (BRODY, 1994; SAID & MOHAMMADKHANI, 1993) uma vez absorvidos, são transportados até o fígado onde são armazenados e recebem novamente resíduos de glutamato para contenção celular, através da enzima poliglutamato sintase (BRODY, 1994). O mesmo ocorre no SNC, os folatos que estão na forma monoglutâmica, recebem aproximadamente oito resíduos de glutamato para que haja contenção celular e possam participar das diversas reações metabólicas tanto nos neurônios como nas células gliais (SIROTNAK & TOLNER, 1999).

Em 1992 Czeizel & Dudás em um estudo randomizado demonstraram que a ingestão de ácido fólico reduziu drasticamente a incidência de defeitos no tubo neural de recém-nascidos. Após este estudo, o *Centers for Disease Control and prevention* dos EUA estabeleceu que mulheres que desejassem engravidar fizessem uso da suplementação com ácido fólico na dose de 400µg/dia e a seguissem até o final do primeiro trimestre de gravidez. Esses resultados motivaram pesquisas sobre a suplementação com ácido fólico em mulheres grávidas, até que em 1996 o *Food and Drugs Association* (FDA) indicou a fortificação de alguns alimentos, como farinhas e cereais, com o ácido fólico. No Brasil, a RDC Nº 344 de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determinou a fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico, a fim de que a população, principalmente as grávidas, obtivessem esse nutriente de outras fontes da dieta.

Nos últimos anos a suplementação com ácido fólico tem se tornado foco de estudos não somente pela prevenção de defeitos no tubo neural e anemia megaloblástica, mas também à prevenção de eventos isquêmicos (ASSANELLI *et al.*, 2004), doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (MATTSON & SHEA, 2003) e déficits cognitivos e oxidativos causados pela hiperhomocisteinemia (MATTÉ *et al.*, 2007; KOLLING *et al.*, 2011). Esses estudos atribuem seus achados a um importante potencial antioxidante do ácido fólico. Dietas carentes desse nutriente levam à elevação da concentração da homocisteína plasmática, a qual, em excesso, tem ação aterogênica e trombogênica, causando anormalidades plaquetárias, estímulo de coagulação ou inibição de fibrinólise, oxidação da Lipoproteína de Baixa

Densidade (LDL) e disfunção endotelial (MACCARI *et al.*, 2007). Weng e colaboradores (2008) relacionam o baixo consumo de ácido fólico com a elevada incidência de eventos isquêmicos na população taiwanesa.

É bem reconhecido que a disponibilidade adequada de nutrientes essenciais envolvidos no metabolismo de um carbono não só é essencial para o desenvolvimento e função normal do encéfalo, bem como para o processo de neuroplasticidade (BAGNYUKOVA *et al.*, 2008). Van e colaboradores (2005) em um estudo prospectivo relacionaram o aumento da concentração plasmática de folato e o aumento do seu consumo na dieta com a redução dos riscos para acidente vascular encefálico hemorrágico. Kremer & Grosso (2005) estudaram a relação do ácido fólico com eventos hipóxico-isquêmicos no período perinatal e observaram que a mutação no gene que codifica a enzima 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (que resulta em homocisteinemia), em mulheres que apresentaram deficiência nutricional de folato pode representar um fator de risco para encefalopatia hipóxica-isquêmica no recém-nascido.

Inexistem, até o presente momento, estudos sobre os efeitos do tratamento com ácido fólico no modelo de HI. Considerando que elevados níveis de estresse oxidativo estão envolvidos na formação da lesão hipóxico-isquêmica e que o ácido fólico parecer apresentar propriedades antioxidantes, testar os efeitos da suplementação com este nutriente, pós HI, poderá fornecer dados que contribuam para a elucidação dos mecanismos formadores da lesão, bem como possa trazer uma nova estratégia de neuroproteção.



## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito do tratamento com ácido fólico em parâmetros comportamentais, bioquímicos e morfológicos de ratos submetidos à hipóxia-isquemia encefálica neonatal.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1) Testar o efeito da administração de ácido fólico em ratos neonatos submetidos ao modelo experimental de HI neonatal de Rice *et al.*, (1981) e avaliar a memória aversiva no teste de esquiva inibitória, atividade locomotora no campo aberto e atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (experimento 1);

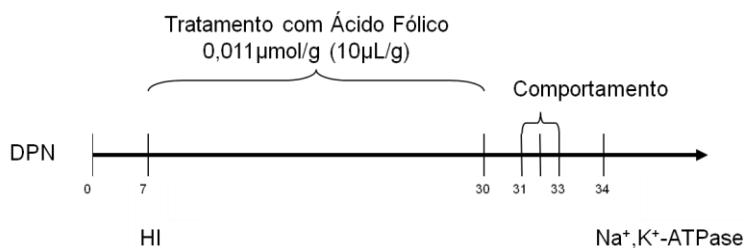
2) Testar o efeito da administração de ácido fólico em ratos neonatos submetidos ao modelo experimental de HI neonatal de Rice *et al.*, (1981) e avaliar a memória de referência e de trabalho no labirinto aquático de *Morris*, o volume hipocampal através do Método de Cavalieri, além de mensurar a área de lesão no estriado (experimento 2).

### 3. Delineamento experimental

Para realização dos objetivos deste trabalho os experimentos foram divididos em duas etapas, experimento 1 e experimento 2. Para ambas as etapas deste trabalho os animais foram divididos em quatro grupos:

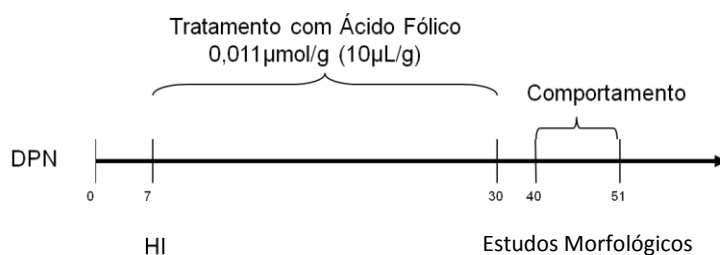
- ✓ Controle salina (CTS);
- ✓ Controle ácido fólico (CTAF);
- ✓ HI salina (HIS);
- ✓ HI ácido fólico (HIAF).

O experimento 1 foi realizado com 45 ratos Wistar machos e fêmeas, divididos nos quatro grupos experimentais descritos acima, os quais sofreram o procedimento de HI no sétimo dia pós-natal. O tratamento com ácido fólico transcorreu imediatamente antes da HI, e após, uma vez ao dia até o 30 DPN. Vinte e quatro horas após a última injeção de ácido fólico foram realizados os testes comportamentais (campo aberto e esquiva inibitória). Um dia após o teste na esquiva inibitória, os animais foram sacrificados, seus encéfalos dissecados e as estruturas, hipocampo, estriado e córtex pré-frontal, retiradas para análise da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Para análise da enzima se utilizou um n de seis animais por grupo.



**Figura 4.** Desenho experimental 1

O experimento 2 foi realizado com 59 ratos Wistar machos e fêmeas que passaram pelo procedimento de HI no sétimo DPN. O tratamento com ácido fólico transcorreu imediatamente antes da HI, e após, uma vez ao dia até o 30 DPN para os animais que tiveram o volume de lesão avaliado e até o 40 DPN para os animais que fizeram o teste no labirinto aquático. Quarenta e três animais foram avaliados quanto a memória espacial e de trabalho avaliadas através do labirinto aquático de *Morris* e 16 animais com 31 DPN foram sacrificados, seus encéfalos foram perfundidos, fixados e dissecados para posterior análise do volume do hipocampo e área estriatal.



**Figura 5.** Desenho experimental 2

#### 4. Experimento 1

***“Folic acid prevents behavioral impairment and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>- ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia”*** Artigo submetido à Neurochemical Research.

(Jaqueline Vieira Carletti, Bruna Ferrary, Patrícia Maidana Miguel, Joseane Jiménez Rojas, Janaína Kolling, Emilene Barros Scherer, Angela Teresinha de Souza Wyse, Carlos Alexandre Netto, Lenir Orlandi Pereira)

## **Folic acid prevents behavioral impairment and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>- ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia**

Jaqueline Vieira Carletti<sup>1,3</sup>, Bruna Ferrary<sup>1</sup>, Patrícia Maidana Miguel<sup>2</sup>, Joseane Jiménez Rojas<sup>1,3</sup>, Janaína Kolling<sup>2</sup>, Emilene Barros Scherer<sup>2</sup>, Angela Teresinha de Souza Wyse<sup>2</sup>, Carlos Alexandre Netto<sup>2,3</sup>, Lenir Orlandi Pereira<sup>1,3\*</sup>

1 Departamento de Ciência Morfológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Rua Sarmiento Leite, 500, 90050- 170, Porto Alegre, RS, Brazil;

2 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro

Barcelos, 2600, Prédio Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil;

3 Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas-Neurociências, Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 107, 90050- 170, Porto

Alegre, RS, Brazil.

\* Corresponding author: Fax: +55 51 3308 3146

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

### **Abstract**

Folic acid plays an important role in neuroplasticity and exerts neuroprotectant actions in experimental brain ischemia. The aim of this study was to investigate the effects of folic acid on locomotor activity, aversive memory and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the frontal cortex and striatum in animals subjected to neonatal hypoxia-ischemia (HI). Wistar rats of both sexes at postnatal day 7 underwent HI procedure and were treated with intraperitoneal injections of folic

acid (0.011  $\mu\text{mol/g}$  body weight) once a day, until the 30th postnatal day. Starting on the day after, behavioral assessment was run in the open field and in the inhibitory avoidance task. Animals were sacrificed by decapitation 24 hours after testing and striatum and frontal cortex were dissected out for  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity analysis. Results show anxiogenic effect in the open field and an impairment of aversive memory in the inhibitory avoidance test in HI rats; folic acid treatment prevented both behavioral effects. A decreased  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in striatum, both ipsilateral and contralateral to ischemia, was identified after HI; a total recovery was observed in animals treated with folic acid. A partial recovery of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity was yet seen in frontal cortex of HI animals receiving folic acid supplementation. Presented results support that folic acid treatment prevents memory deficit and anxiety-like behavior, as well as prevents  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase inhibition in the striatum and frontal cortex caused by neonatal hypoxia-ischemia.

**Keywords:** Hypoxia-Ischemia, Folic Acid, Inhibitory Avoidance,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

## **Introduction**

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is a harmful event affecting structural and functional integrity of the nervous system [1]. It occurs due to complications in the perinatal period and is associated to neurological disorders such as cerebral palsy, mental retardation, epilepsy, sensorymotor impairments and learning disorders [2,3].

The pathogenesis of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal brain is complex; energy failure followed by glutamatergic excitotoxicity, inflammation and oxidative stress are the main metabolic events associated to this injury [1]. It is known that the immature brain of the newborn is particularly vulnerable to oxidative damage due to its limited antioxidant capacity [4]. Following that, it has been shown that a decrease in the delivery of blood flow leads to the formation of free radicals that, in large amounts, have detrimental effects such as lipid peroxidation, as well as proteins, enzymes, carbohydrates and DNA insults [5]. At the cellular level, the lack of oxygen supply causes a decrease of adenosine triphosphate (ATP) due to anaerobic glycolysis; such reduction in ATP concentration may impair the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity, which is critical to the maintenance of cell membrane excitability and functions. Wyse et al. [6] showed that ischemic preconditioning prevented the inhibition of hippocampus and cortical  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity after brain ischemia in rats exposed to global forebrain ischemia.

Hypoxia-ischemia usually causes damage to different brain structures such as prefrontal cortex, hippocampus, striatum and thalamus [7]. Previous studies from our laboratory demonstrated hippocampal, striatal and cortical atrophy in rats submitted to neonatal HI event, as compared to control animals, associated to several cognitive disabilities such as spatial long-term memory in Morris water maze [8], object recognition memory [9] and aversive memory in inhibitory avoidance task [10].

Experimental neuroprotective agents, like resveratrol, melatonin and vitamins, have been used to mitigate the damage caused by cerebral HI [4,11], however no treatment has been fully efficient to counteract all consequences of

neonatal HI. Folic acid (FA) is a water-soluble B vitamin, involved in homocysteine remethylation and nucleotide biosynthesis, and is indicated to prevent neural tube defects [12] and to treat megaloblastic anemia [13]. It is well known that adequate availability of essential nutrients involved in the cellular metabolism of one-carbon is essential for development and maintenance of brain function and neuroplasticity [14]. It has been found that folic acid supplementation prevents ischemic events, independently of homocysteine metabolism [15,16], and exerts protective effects in Alzheimer's patients [17]. In addition, it was demonstrated that folic acid also plays an antioxidant role when used in experimental hyperhomocysteinemic rats, an effect associated to prevention of brain  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition [18].

Considering the available evidence that folic acid exerts therapeutic effects in experimental models of neurological disorders, the aim of this study was to investigate whether folic acid treatment would affect behavioral performance, as assessed in inhibitory avoidance and open field tasks, of rats subjected to neonatal HI. Its effect on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in frontal cortex and striatum, structures susceptible to HI damage and associated with sensorimotor [19] and cognitive functions [20], was also studied.

## **Material and methods**

### **Animals**

Seven-days-old male and female Wistar rats were obtained from the Central Animal House of Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências



Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were maintained on a 12/12h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) colony room. Rats had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. Animals were divided into the following experimental groups: control treated with saline 0.9% (CT-S,  $n=11$ ), control treated with folic acid (CT-FA,  $n=13$ ), hypoxia-ischemia treated with saline solution (HI-S,  $n=10$ ), hypoxia-ischemia treated with folic acid (HI-FA,  $n=11$ ). Six animals per group were used for  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity assay. All procedures were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by The National Institute of Health (USA), with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology; the experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal Rio Grande do Sul, Brazil (no. 17401). A time line of the events of this experiment is presented in the Figure 1.

### **Hypoxia-ischemia**

The Levine rat model [21], as modified by Rice et al. [22], to neonatal rats was employed. At the seventh postnatal day (7PD), animals were anesthetized with halothane and the right common carotid artery was identified through a longitudinal neck incision, isolated from the nerve and vein, and permanently occluded with surgical silk thread. Animals were then allowed to recover for 15 min under a heating lamp and returned to their dams. After 2 h, groups of five pups were placed in airtight jars and exposed to a humidified nitrogen-oxygen mixture (92% and 8%, respectively) for 90 min with the chamber partially

immersed in a 37 °C water bath to maintain a constant thermal environment. Controls were sham-operated, i. e., they were submitted to anesthesia and neck incision, but did not receive arterial occlusion or hypoxia.

### **Folic acid chronic treatment**

Folic acid solution (0.011µmol folic acid/g body weight) was injected intraperitoneally, once a day, from the 7th to the 30th day-of-age [18,23]. This dosing regimen was chosen after protective effects of FA administration on damaged brain structures and cognitive function in young rats were described [18,24]. Control animals received saline solution in the same volumes as those applied to folate. Folic acid was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA.).

### **Open Field**

The test was performed in a wooden apparatus measuring 50x50x40 (length x height x depth), with a frontal glass wall, divided into 12 equal quadrants according to Netto et al. [25]. Twenty-four hours after the end of pharmacological treatment, animals were placed facing the left corner of the arena and the free exploration was observed during five minutes. The analyzed variables were latency to leave the corner, number of crossings, number of rearings and number of fecal boli. The arena was thoroughly cleaned with a 20% of ethanol solution between sessions.

## **Inhibitory avoidance**

Twenty-four hours after the open field test, animals were trained on step-down inhibitory avoidance task [26]. Animals were gently placed onto the platform, facing the corner, and latencies to step down placing their four paws on the grid were measured with an automatic device. On stepping down, they received a 0.6 mA, 60 HZ scrambled footshock for 2-3 s, and were returned to their home cages. Animals were tested for retention 24h later. Test session was procedurally similar to the training one, except that the footshock was omitted; step-down latency in test session was used as an index of retention.

## **Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity assay**

As for the biochemical assay, animals were sacrificed by decapitation approximately 24 hours after the behavioral study, on the 34th postnatal day; right and left frontal cortex and striatum were dissected out and instantaneously placed in liquid nitrogen and stored at – 70°C until biochemical assays. Brain structures were homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 0.32 M sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 0.1 mM EDTA, pH 7.4.

The reaction mixture for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity assay contained 5.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl and 40.0 mM Tris–HCl, pH 7.4, in final volume of 200 μL. The reaction was initiated by ATP addition. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain.

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays, as described by Wyse et al. [27]. Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan and colleagues [28]. Specific enzyme activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein. All samples were run in duplicate.

### **Statistical analysis**

Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, with *lesion* and *treatment* as factors, followed by Duncan's test to analyze data from open field task and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Data from Inhibitory avoidance was analyzed using the Kruskal Wallis ANOVA followed by Mann Whitney test when indicated. 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**

### **Open Field**

Locomotor activity was evaluated using the open field. Two-way ANOVA, followed by Duncan's *post hoc* test, showed higher latency to leave the first quadrant in the HI-S group, as compared to other groups ( $p < 0.05$ ; Table 1), indicating an anxiogenic response after the hypoxic-ischemic event. The HI-FA

group had latency similar to those of CT groups, indicating the reversal of post-HI anxiogenic effect by folic acid supplementation. Two-way ANOVA of rearing responses revealed a significant effect considering the lesion factor ( $F(1,41)=4.92$ ;  $p<0.05$ ), with no effect of the treatment factor ( $F(1,41)=1.2$ ;  $p>0.05$ ). The only difference identified by the Duncan's test was a decreased number of rearings in the HI-S, as compared with the CT-FA group (Table 1). Analysis of the number of the crossings and fecal boli demonstrated no significant difference between groups.

### **Inhibitory avoidance**

Kruskal-Wallis analysis followed by *post hoc* Mann Whitney test indicated that HI-S group presented lower latency to step down the platform on the testing session, as compared with control groups ( $p<0.05$ , Figure 2), representing a cognitive deficit related to HI. Folic acid supplementation post HI reversed such cognitive impairment. There was no difference between groups on training session step down latencies.

### **Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Activity**

Two-way ANOVA showed significant differences considering injury ( $F(1,20)=13.4$ ;  $p<0.05$ ) and regarding the treatment variables ( $F(1,20)=35.6$ ;  $p<0.05$ ) on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the right striatum (ipsilateral to arterial occlusion). There was enzyme activity inhibition in the right striatum in the HIS group, as compared to all other groups (Panel A of Figure 3). Taking into

account left striatum (contralateral to arterial occlusion), it was found a significant effect on lesion ( $F(1,20)= 54.7$ ;  $p<0.05$ ) and treatment ( $F(1,20)= 96.4$ ;  $p<0.05$ ). As seen in right striatum, HI-S group presented a lower level of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity than all other groups. This confirms that  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity inhibition consequent to hypoxic-ischemic event was prevented by the folic acid treatment.

As regards to enzyme activity in the frontal cortex, ANOVA demonstrated a significant effect associated to lesion (right:  $F(1,20)= 69.9$ ;  $p<0.05$ ; left:  $F(1,20)= 6.5$ ;  $p<0.05$ ). *Post hoc* Duncan's test indicated that HI-S group also had lower activity of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase on both sides, when compared with the group CT-S. Additionally, hypoxic-ischemic group treated with folic acid did not differ of that CT groups, indicating once again a presence of a protective effect (Panel B of Figure 3).

## Discussion

This study focused on the possible neuroprotective action of folic acid supplementation on the behavioral and biochemical effects caused by neonatal HI. It was shown that HI caused an anxiogenic response in the open field and a cognitive deficit in the inhibitory avoidance task, as well an inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity both in striatum and frontal cortex; folic acid treatment prevented all these effects.

General motor activity and anxiety-like behaviors were assessed in the open-field. Here, data obtained indicated that animals submitted to hypoxic-ischemic event treated with saline displayed increased anxiety-like behavior, as

seen in higher latency to leave the initial quadrant, and made less crossings, compared with the other groups. Folic acid administration was effective in preventing these effects on HI animals. It has been reported that folate deficiency before the birth of rats increased anxiety and decreased the number of rearings in the plus maze test [29]. Data from studies with humans evaluating the effects of restricting the intake of folate also identified behavioral impairment. Current investigations have been demonstrated evidences for a direct association between lower dietary folate intake and depression in male smokers [30] and in older women [31]. It is interesting to consider that the present study analyzed the behavior of males and females together, only after exclude a significant effect of animal sex. In a previous study, it was also observed that male and female animals, with 30 and 45 postnatal days, had similar behavior in the open field test, when analyzing the number of crossings, rearing and fecal boli [32].

Inhibitory avoidance test measures learning through the animal's latency to descend from the platform, which is motivated by the experience of an aversive event [33]. Present data corroborate previous findings indicating that neonatal HI causes aversive memory impairment [10] as well as spatial memory deficits in adolescent animals [34,35]. Moreover, the present study showed that animals subjected to HI and treated with FA had no cognitive impairment on the inhibitory avoidance test. This interesting result indicate, for the first time, that folic acid may be considered as a neuroprotective strategy for reversal or alleviate cognitive deficits caused by neonatal hypoxia-ischemia.

As regard to  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity assessment, in frontal cortex and striatum data analysis indicated that HI animals treated with saline had a

decrease in  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity on both hemispheres (ipsilateral and contralateral), comparing with control group. These results are consistent with a recent report which identified a decrease in  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in cortex 1 hour after the hypoxic-ischemic insult [36]. Additionally, present results demonstrated that FA supplementation was able to reverse decreased  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity, specially in striatum. We could suggest that this finding is partially responsible by the behavioral effects identified on inhibitory avoidance and open field tasks. This suggestion corroborates findings reported by Matté and colleagues [18] which state that hyperhomocysteinemic rats treated with AF had a recovery of decreased  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity and memory impairments. These authors suggested that these findings probably can be attributed to the antioxidant properties of folic acid [15,18]. Regarding to ischemic events, a prospective study correlates the increase in plasma folate with reduced risk for hemorrhagic stroke [37]. Moreover Kremer and Grosso [38] studied the relationship of FA with hypoxic-ischemic events in the perinatal period. These authors observed that mutations in the gene encoding 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in women with a nutritional deficiency of folate, may represent a risk factor for hypoxic-ischemic encephalopathy in neonates. When analyzing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in the frontal cortex present data showed partial recovery of inhibition in the HI-FA group, being observed only on the contralateral side to lesion. It is reasonable consider that contralateral side to be less affected by HI than ipsilateral side, as previously stated [10].

In conclusion, here present data suggest that hypoxia-ischemia produces



angiogenic effects and aversive memory deficits, and that treatment with folic acid was able to prevent these effects. When evaluating the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity, treatment with FA was able to reverse the inhibition of enzyme activity partially in striatum and totally in frontal cortex. Thus, folic acid may be considered a candidate for neuroprotection after a neonatal hypoxic-ischemic event and, probably, this effect is partially mediated by recovering of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enzyme activity.

### **Acknowledgement**

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazil) and (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)).

### **References**

- [1] Mclean C, Ferriero D (2004) Mechanisms of Hypoxic-Ischemic Injury in the Tern Infant. *Semin Perinatol* 28: 425-432. doi:10.1053/j.semperi.2004.10.005
- [2] Volpe JJ (2000) *Neurology of the Newborn*. Saunders. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company p. 217-394.
- [3] Paula S, Vitola AS, Greggio S, Paula D, Mello, PB, Lubianca JM, Xavier LL, Fiori HH, Dacosta JC (2009) Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by

intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr Res* 65: 631 –635. doi:10.1203/PDR.0b013e31819ed5c8

[4] Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini (2007) Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Pienal Res* 44: 157 – 167. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00503.x

[5] Halliwell B (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52: 253-65. doi: 10.1111/j.1753-4887.1994.tb01453.x

[6] Wyse ATS, Streck EL, Worm P, Wajner A, Ritter F, Netto CA (2000) Preconditioning Prevents the Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Activity after Brain Ischemia. *Neurochem Res* 25:971–975. doi: 10.1023/A:1007504525301

[7] Vannucci RC (200) Hypoxic-ischemic encephalopathy. *American journal of perinatology* 17: 113-120. doi: 10.1055/s-2000-9293

[8] Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, Rocha AP, Achaval M, Netto CA (2007) Effects of Daily Environmental Enrichment on Memory Déficits and Brain Injury Following Neonatal Hypoxia-ischemia in the Rat. *Neurobiol Learn Mem* 87: 101 -108. doi:10.1016/j.nlm.2006.07.003

[9]. Pereira LO, Strapasson, ACP, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA (2008) Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in females, but not in males, rats after hypoxia-ischemia. *Brain Res* 1218: 257 - 266. doi:10.1016/j.brainres.2008.04.010

[10] Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA (2003) Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairment in the adult rat. *Brain Res* 973: 171–178. doi:10.1016/S0006-8993(03)02436-3

- [11] Della-morte D, Dave KR, Defazio RA, Bao YC, Raval AP, Perez-Pinzon A (2009) Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1- uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience* 159: 993–1002. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.01.017
- [12] Czeizel AE, Dudás I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 26:1832-5.
- [13] Paz R, Hernández-Navarro F (2006) Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico. *Nutr Hosp* 21(1):113-9.
- [14] Bagnyukova TV, Powell CL, Pavliv O, Tryndyak VP, Pogribny IP (2008) Induction of oxidative stress and DNA damage in rat brain a folate/methyl-deficient diet. *Brain Res* 27;1237:44-51. doi:10.1016/j.brainres.2008.07.073
- [15] Doshi SN, Ian FWM, Stuart JM, Derek L, Robert GN, Mahmud BK, Malcolm JL, Jonathan G. Folate improves endothelial function in coronary artery disease. An effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 21: 1196-1202. doi: 10.1161/hq0701.092000
- [16] Nakano E, Higgins, JA, Powers HJ (2001) Folate protects against oxidative modification of human LDL. *Br J Nutr* 86: 637-639. doi: 10.1079/BJN2001478
- [17] Mattson MP, Shea TB (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and disorders. *Trends Neurosci* 26: 137–146. doi:10.1016/S0166-2236(03)00032-8
- [18] 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.

doi:10.1016/j.ijdevneu.2007.10.003

[19]. Kohzuki M, Tomimatsu T, Fukuda H, Kanagawa T, Kanzaki T, Shimoya K, Murata Y (2006) Long-term neuroprotective effects of carbon dioxide on neonatal rat hypoxicischemic brain injury: An experimental study of skilled motor tasks. *Am J Obstet Gynecol* 195: 240–245. doi:10.1016/j.ajog.2005.12.036

[20] Ikeda T (2008) Stem cells and neonatal brain injury. *Cell Tissue Res* 331: 263–269. doi: 10.1007/s00441-007-0546-8

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

[22] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981). The influence of immaturity on hypoxicischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9: 131–141. doi: 10.1002/ana.410090206

[23] Lalonde R, Joyal CC, Botez MI (1993) Effects of folic acid and folinic acid on cognitive and motor behavior in 20-month-old rats. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 703–707. doi:10.1016/0091-3057(93)90188-Y

[24] Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EBS, Andreazza A C (2009) Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. *Neurochem Int* 54: 7–13. doi:10.1016/j.neuint.2008.08.011

[25] Netto CA, Dias RD, Izquierdo I (1986) Differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. *Psychoneuroendocrinology* 11: 437–446. doi:10.1016/0306-4530(86)90005-3

- [26] Izquierdo I, Schroder N, Netto CA, Medina JH (1999) Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance task in rats through NMDA receptor and camkii-dependent mechanisms in the hippocampus. *Eur J Neurosci*. 11: 3323 – 3328. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00742.x
- [27] Wyse ATS, Brusque AM, Silva CG, Streck EL, Wajner M, Wannmacher CMD (1998) Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport* 9: 1719–1721.
- [28] Chan KM, Delfer D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated atpase activity. *Anal Biochem* 157: 375–380.
- [29] Ferguson SA, Berry KJ, Hansen DK, Wall KS, White G, Antony AC (2005) Behavioral effects of prenatal folate deficiency in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73(4):249-52. doi: 10.1002/bdra.20111
- [30] Sánchez-Villegas SA, Doreste J, Schlatter J, Pla J, Rastrollo BM, Martínez-Gonzalez MAM (2009) Association between folate, vitamin B6 and vitamin B12 intake and depression in the SUN cohort study. *J Hum Nutr Diet* 22: 122 – 133. doi: 10.1111/j.1365- 277X.2008.00931.x
- [31] Ramos MI, Allen LH, Haan MN, Green R, Miller JW (2004) Plasma folate concentrations are associated with depressive symptoms in elderly Latina women despite folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 80(4):1024 - 1028.
- [32] Masur J, Schutz MT, Boerngen R (1980) Gender differences in open-field behavior as a function of age. *Dev Psychobiol* 13(2): 107 - 110.
- [33] Izquierdo, I., Medina, J.H (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68(3): 285-316. doi:10.1006/nlme.1997.3799

- [34] Almli CR, Levy TJ, Han BH, Shah AR, Gidday JM, Holtzman DM (2000) BDNF protects against memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Exp Neurol* 166, 99–114. doi:10.1006/exnr.2000.7492
- [35] Young RSK, Kolonich J, Woods CL, Yagel SK (1986) Behavioral performance of rats following neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke* 17(6):1313-6. doi: 10.1161/01.STR.17.6.1313
- [36] 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: 115-120. doi:10.1016/j.ijdevneu.2010.12.005
- [37] Van GB, Hulthdin J, Johansson I, Stegmayr B, Hallmans G, Nilsson TK, Weinehall L, Witthoft C, Palmqvist R, Winkvist A (2005) Folate, vitamin B12, and risk of ischemic and hemorrhagic stroke: a prospective, nested case-referent study of plasma concentrations and dietary intake. *Stroke* 36(7): 1426-31. doi: 10.1161/01.STR.0000169934.96354.3a
- [38] Kremer DR, Grosso C (2005) Maternal mutation 677C > T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene associated with severe brain injury in offspring. *Clin Genet* 67(1): 69 - 80. doi: 10.1111/j.1399-0004.2004.00373.x

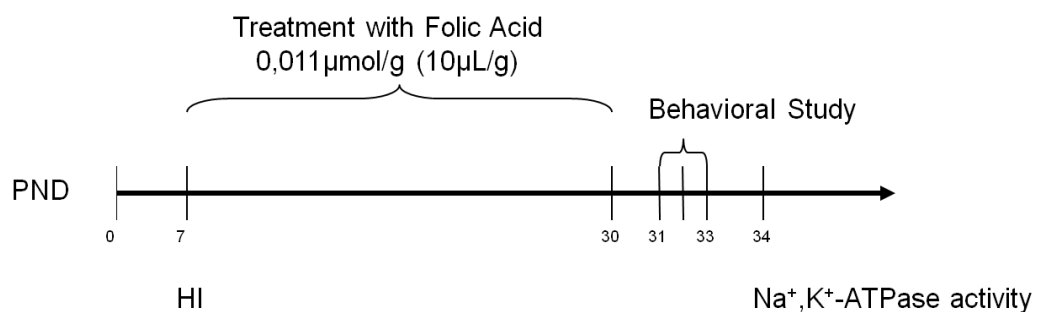
## Legends to Figures

Fig. 1 Time line of experimental procedures.

Fig. 2. Inhibitory avoidance - Latencies to step down the platform in training and test sessions \* Significant difference when compared to groups CT-S and CT-FA ( $p < 0.05$ ) on test day. Results are expressed as median  $\pm$  interquartile range.

Fig. 3. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity. A) Enzyme activity in right and left striatum. \*Significant difference when compared to the CT groups. B) Enzyme activity in right and left frontal cortex. \*Significant difference when compared to the CT groups. # Significant difference when compared to the CT-S. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

**Figure 1.**



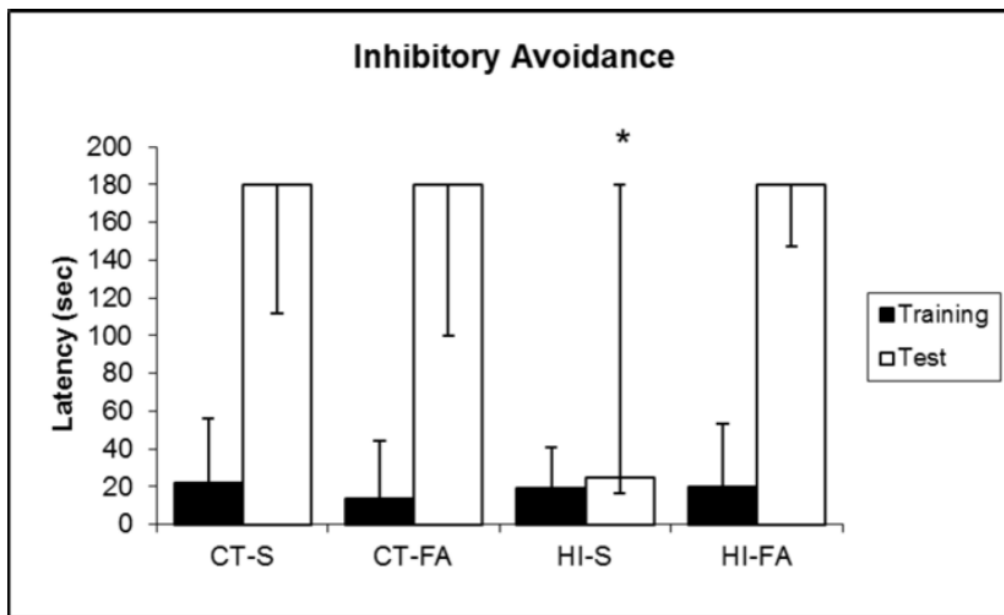
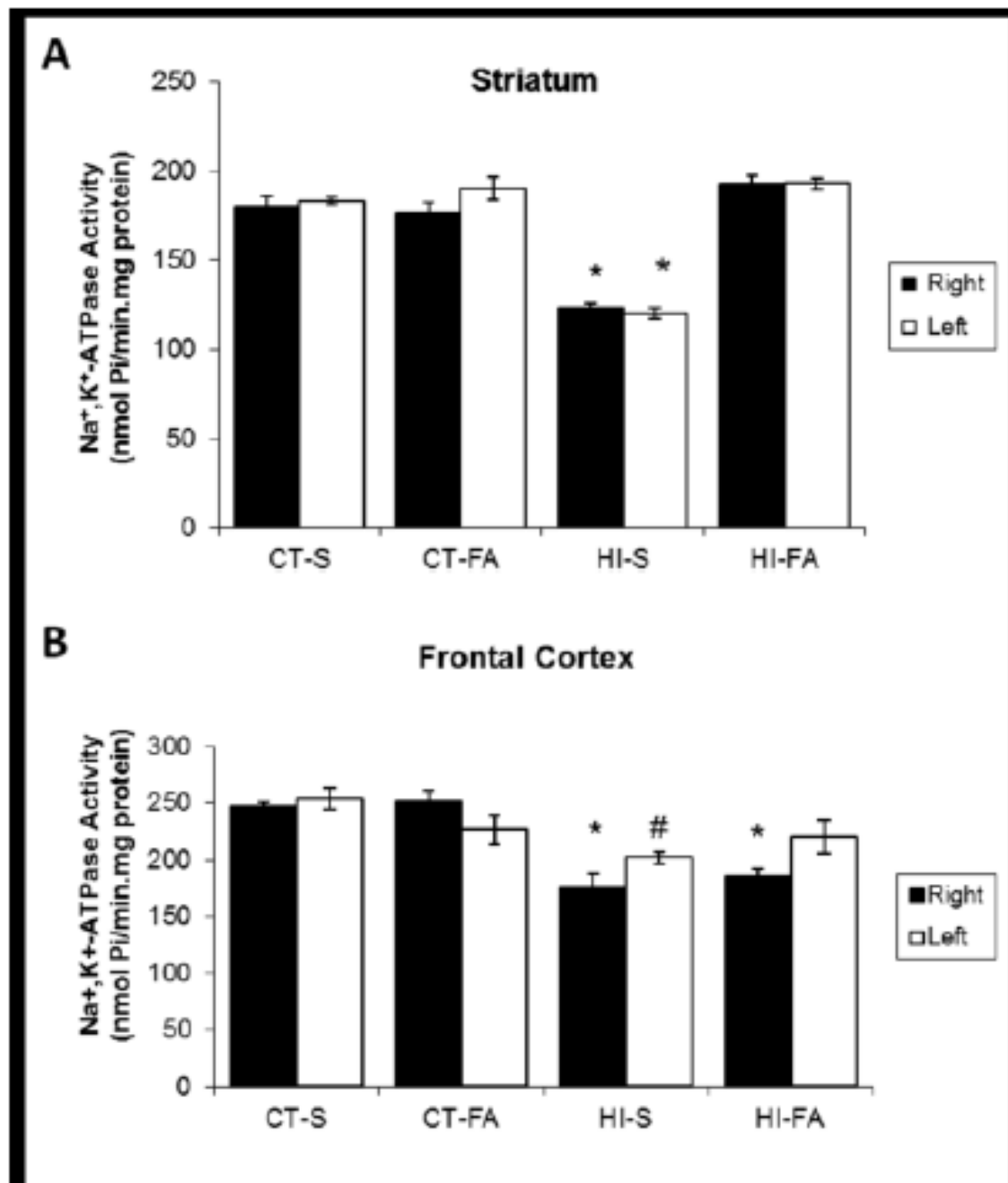
**Figure 2.**



Figure 3.



**Table 1.**

Table 1 - Open Field				
	Latency	Rearings	Fecal Boli	Crossings
CT-V	2.36±0.6	41.3±3.1	4.9±1.2	103.5±5.1
CT-FA	2.30±0.3	46.3±2.8	3.0±0.7	93.0±4.2
HI-S	7.9±3.3*	33.7±6.1 <sup>#</sup>	2.8±0.9	84.8±1.4
HI-FA	2.18±0.4	37.0±2.9	3.46±0.8	97.9±5.7

Observed Variables in the Open Field Task: latency to leave the first quadrant, rearings, number of fecal boli and crossings. \*Significant difference of the HI-S group when compared with all other groups; <sup>#</sup>Significant difference between HI-S and CT-FA groups ( $p < 0.05$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

## **5. Experimento 2**

### **5.1 Materiais e Métodos**

#### **5.1.1 Animais**

Foram utilizados 59 ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais receberam ração e água *ad libitum*, sendo eles mantidos em ambiente climatizado ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro / escuro de 12 horas. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade, sob o Nº 17401 e está de acordo com a Lei AROUCA de 8 de Outubro de 2008, que regulamenta procedimentos para uso científico de animais.

#### **5.1.2 Indução de Hipóxia-Isquemia**

Foi utilizado o modelo experimental baseado na preparação de Levine (1960), modificado por Rice e colaboradores (1981) para ratos neonatos. O modelo consistiu na associação da ligação permanente da artéria carótida comum direita com a exposição a uma atmosfera hipóxica. Aos sete dias pós-

natal, os animais foram anestesiados com halotano 2-4% e submetidos ao procedimento cirúrgico. Este processo foi iniciado com uma incisão na linha média da face anterior da região cervical, sendo então a artéria carótida comum direita identificada, isolada de estruturas adjacentes, e ligada com fio cirúrgico de seda 4.0. Finalizado este procedimento, os animais foram devolvidos às caixas moradia, onde permaneceram por duas horas para recuperação. Após a recuperação, em grupos de cinco, os animais foram colocados em uma câmara (1500 mL) e expostos à atmosfera hipóxica (8% de oxigênio e 92 % de nitrogênio, com fluxo de 5L/min) durante 90 min. A câmara de hipóxia permaneceu parcialmente submersa em banho-maria a 37<sup>0</sup>C a fim de que fosse mantida a temperatura corporal dos ratos lactantes dentro de limites fisiológicos. Ao final da hipóxia, os animais foram retirados da câmara e devolvidos à sua caixa de origem. Os animais controle foram submetidos à incisão cirúrgica, porém sem haver a oclusão arterial e sem a exposição ao ambiente hipóxico.

### **5.1.3 Tratamento com Ácido Fólico**

A solução de ácido fólico utilizada foi preparada na concentração 0,011 $\mu$ mol/g de peso corporal (10 $\mu$ L/g) e ajustado o pH para 7,4 com NaOH. A solução foi injetada intraperitoneal imediatamente antes do procedimento de HI e, uma vez ao dia, a partir do 8<sup>o</sup> até o 40<sup>o</sup> dia pós-natal para os animais que foram testados no labirinto aquático de *Morris* e até o 30<sup>o</sup> para os animais

utilizados para análise morfológica (LALONDE *et al.*, 1993 *adaptado por* MATTÉ *et al.*, 2007).

## **5.2 Análise Comportamental**

### **5.2.1 Labirinto Aquático de *Morris***

O labirinto aquático de Morris consiste de um tanque circular (2,0 metros de diâmetro) preenchido com água ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com uma plataforma de escape submersa (2 cm abaixo da superfície da água).

#### **5.2.1.1 Avaliação da Memória de Referência**

Para avaliarmos a memória de referência, nos animais com 40 DPN, foi realizado um período de treino onde a posição da plataforma permaneceu no mesmo local. Os animais realizaram quatro tentativas por dia, com intervalo de 10 min durante cinco dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a fase de treino, uma sessão de 60 segundos, sem a plataforma, foi realizada para avaliar a memória de longo prazo para a posição da plataforma. Todos os animais foram colocados no labirinto em um mesmo ponto, o mais longe possível da posição da plataforma. Foram analisados os seguintes parâmetros

no teste: tempo gasto no quadrante alvo, tempo gasto no quadrante oposto, latência para chegar na plataforma ou no alvo (treino e teste) e número de cruzamentos pelo alvo (ARTENI *et al.*, 2003).

#### **5.2.1.2 Avaliação da Memória de Trabalho**

Para avaliarmos a memória de trabalho, nos 47 DPN, foram realizadas quatro sessões por dia, com cinco minutos de intervalo entre elas, com uma diferente posição da plataforma a cada dia. A memória de trabalho foi avaliada pela média da latência para encontrar a plataforma em cada uma das sessões para cada animal (ARTENI *et al.*, 2003).

### **5.3 Estudos Morfológicos**

Para análise morfológica utilizamos 16 animais que aos 30 DPN foram anestesiados, por via intraperitoneal com hidrato de cloral 150mg/kg, injetados com 1000 UI de heparina no ventrículo esquerdo e perfundidos por via transcardíaca com 150 mL de solução salina seguida de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) em temperatura ambiente. Os encéfalos foram removidos e fixados na mesma solução em temperatura ambiente por 4 h, crioprotégidos através da imersão em soluções crescentes de sacarose (15-30%) em tampão fosfato até afundarem. Após, os encéfalos

foram congelados em nitrogênio líquido (Reagen, Brasil) e guardados em freezer -70°C. Secções coronais de 40µm foram feitas, utilizando-se um criostato (Leitz, Alemanha), nas estruturas: estriado (Bregma 1,20mm) e hipocampo (Bregma – 1,80 mm e 6,80 mm). Para esta análise, os cortes foram corados com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) em lâminas gelatinizadas e o Método de Cavalieri foi utilizado para mensurar o volume total do hipocampo e do corno de Ammon. Para se ter uma estimativa da área lesionada no estriado utilizamos o protocolo descrito por Pereira *et al.* (2007).

### **5.3.1 Volume Hipocampal**

O volume hipocampal foi calculado através da soma das áreas multiplicado pelo intervalo entre os cortes, de acordo com o Método de Cavalieri (RODRIGUES *et al.*, 2004; MIKI *et al.*, 2005). Todo o hipocampo foi seccionado em cortes coronais de 40 µm com intervalo de 200 µm entre cada fatia. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e coradas com HE. As imagens das lâminas foram digitalizadas por um Scanner com resolução de 1200 dpi e com auxílio do Software Image J (NIH, USA) os hipocampos direito e esquerdo foram delineados e suas áreas mensuradas. O limite anterior foi o primeiro corte com células piramidais coradas pela HE e o limite posterior foi o último corte com células granulares do giro denteado (entre as coordenadas Bregma – 1,80 mm e 6,80 mm do Atlas Paxinos e Watson, 2004).

### 5.3.2 Volume do Corno de Ammon

A área de cada corte do hipocampo foi delineada através do Software Image J (NIH, USA) e mensurada. O volume do corno de Ammon foi calculado através da medida da área total do hipocampo, de cada fatia, descontando-se a área do giro denteado conforme descrito por Pereira *et al.* (2007). Após, o resultado de cada área foi multiplicado pelo valor do intervalo entre os cortes (200 $\mu$ m).

### 5.3.3 Área do Estriado

Conforme a metodologia utilizada por Pereira *et al.* (2007), a área do estriado foi medida por quatro secções de cortes coronais com 40 $\mu$ m, seguindo a coordenada Bregma 1,20mm do Atlas Paxinos e Watson, 2004. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e coradas com HE. As imagens foram digitalizadas em Scanner com resolução de 1200 dpi e através do Software Image J (NIH, USA) apenas uma secção foi utilizada e a área do estriado direito e esquerdo foi delineada e mensurada para que tivéssemos uma medida de estimativa da área lesionada nessa estrutura.



#### 5.4 Análise Estatística

Os dados referentes ao aprendizado da tarefa para memória de referência foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguido de teste de *post hoc* de Duncan. Os demais dados foram submetidos à ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações. 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.

## 6. Resultados

### 6.1 Labirinto Aquático de *Morris*

#### 6.1.1 Memória de Referência

Os dados referentes à memória espacial realizados no labirinto aquático de *Morris* estão representados nas figuras 1-5. Foram avaliadas as variáveis: latência para encontrar a plataforma, como indicativo de aprendizado durante o treino; tempo gasto no quadrante alvo e oposto, latência e número de cruzamentos no dia de teste.

Na avaliação do aprendizado durante o treino (Fig. 1) o resultado geral da ANOVA de medidas repetidas mostrou uma diferença estatística somente na variável lesão ( $F(1,39)=38,0$ ;  $p<0.05$ ). O teste *post hoc* de Duncan demonstrou diminuição na latência para encontrar a plataforma nos dias 3, 4 e 5, comparando-se com o dia 1, nos grupos CTS e CTAF. No grupo HIS, a diminuição da latência foi observada apenas nos dias 4 e 5. Tal diminuição de latência ao longo dos dias indica o aprendizado na tarefa. O teste *post hoc* ainda mostrou diferença nos grupos HIS e HIAF em relação ao CTS e CTAF no quarto dia de treino, indicando aprendizado na tarefa nos grupos controle e não nos grupos HI. Ainda, houve maior latência no quinto dia de treino nos grupos HIS e HIAF em relação ao grupo CTS, indicando que tanto o grupo lesão

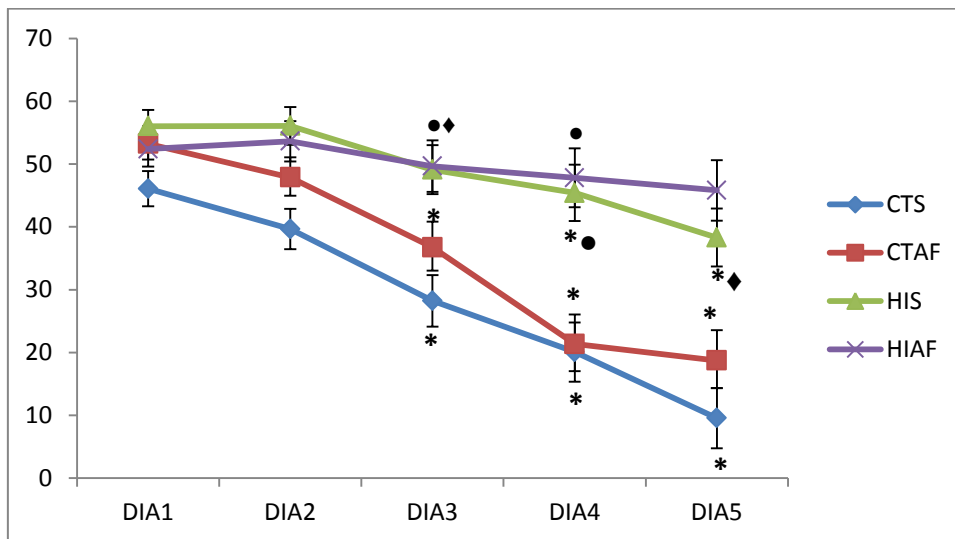
tratado como o não tratado tiveram prejuízo no aprendizado da tarefa. O grupo CTAF também foi diferente quando comparado ao grupo HIAF.

No teste, onde os animais foram avaliados por 60 segundos sem a plataforma submersa, foram observadas as variáveis tempo gasto no quadrante alvo e oposto, latência para chegar ao alvo e número de cruzamentos. Na avaliação do tempo gasto no quadrante alvo o resultado geral da ANOVA de duas vias indicou diferença na variável tratamento (animais HI que receberam AF) ( $F(1,39)=8,54$ ;  $p<0.05$ ). O teste *post hoc* demonstrou aumento do tempo gasto no quadrante alvo no grupo HIS em relação ao CTAF e diminuição desse tempo no grupo CTAF em relação ao CTS.

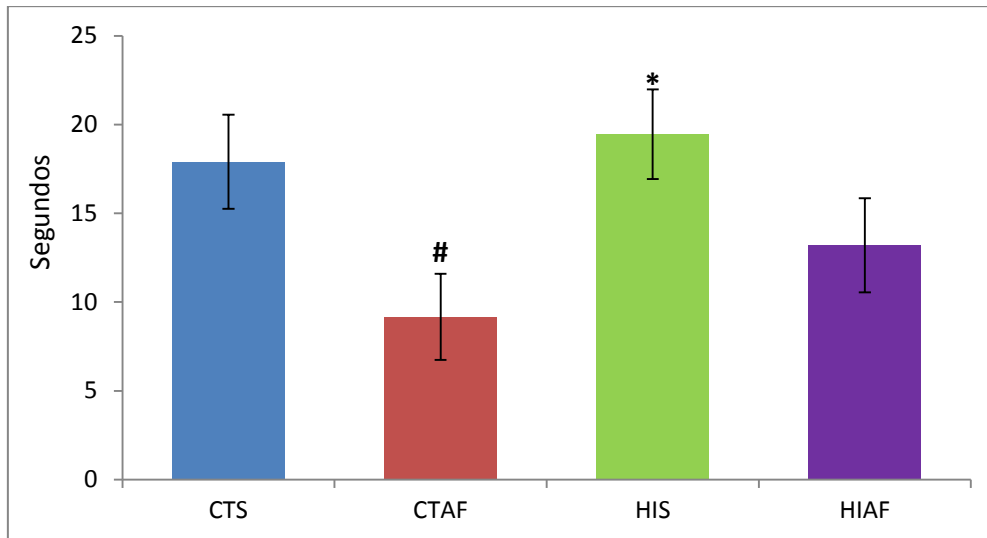
Quando se analisou o tempo gasto no quadrante oposto o resultado geral da ANOVA mostrou resultado significativo em relação a variável tratamento ( $F(1,39)=6,7$ ;  $p<0.05$ ). O *post hoc* de Duncan mostrou que os animais HIS gastaram menos tempo nesse quadrante em relação ao grupo CTAF. No entanto, o grupo CTAF permaneceu maior tempo neste quadrante em relação ao grupo CTS.

Quanto à análise da variável latência, o resultado geral da ANOVA indicou resultado significativo em relação à lesão ( $F(1,39)=11,38$ ;  $p<0.05$ ) e ao tratamento ( $F(1,39)=6,4$ ;  $p<0.05$ ). No teste de *Duncan* observamos que os animais HIS tiveram maior latência para encontrar o alvo no dia de teste em relação ao grupo CTS e que os animais HIAF também apresentaram maior latência para encontrar o alvo no dia de teste quando comparado aos grupos controles. Esse resultado demonstra um prejuízo no aprendizado desses animais submetidos à HI, independente do tratamento farmacológico.

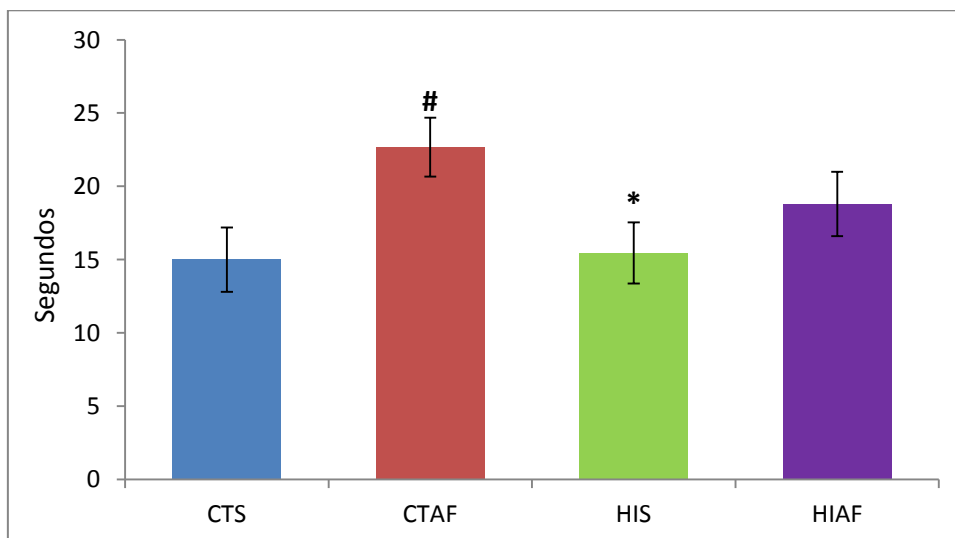
Em relação à variável cruzamentos o resultado geral da ANOVA também mostrou diferença em relação à lesão ( $F(1,39)=12,5$ ;  $p<0.05$ ) e ao tratamento ( $F(1,39)=7,4$ ;  $p<0.05$ ). O teste *post hoc* indicou menor número de cruzamentos nos grupos CTAF, HIS e HIAF em relação ao grupo CTS.



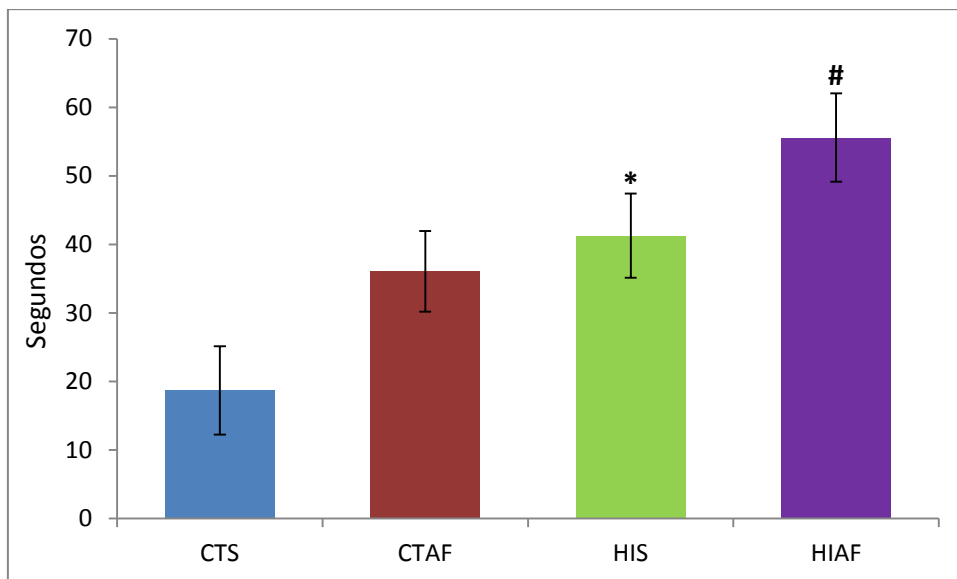
**Figura 1.** Curva de Aprendizado no Labirinto Aquático de *Morris* durante o treino no protocolo para memória de referência. \* Diferença significativa nos grupos CTS, CTAF e HIS em relação ao dia 1 do treino. ● Diferença significativa em relação ao CTS e CTAF no respectivo dia. ◆ Diferença significativa em relação ao grupo CTS no respectivo dia. Os dados foram expressos como média±erro padrão.



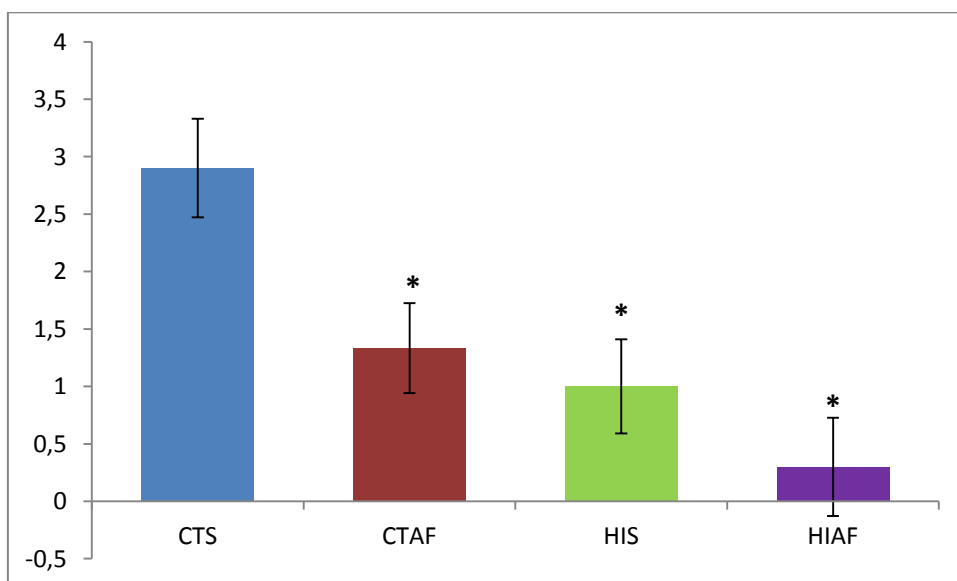
**Figura 2.** Tempo gasto no quadrante alvo no dia de teste. \* Diferença significativa quando comparado com CTAF. # Diferença significativa quando comparado com CTS. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.



**Figura 3.** Tempo gasto no quadrante oposto. \* quando comparado ao CTAF # quando comparado ao CTS. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.



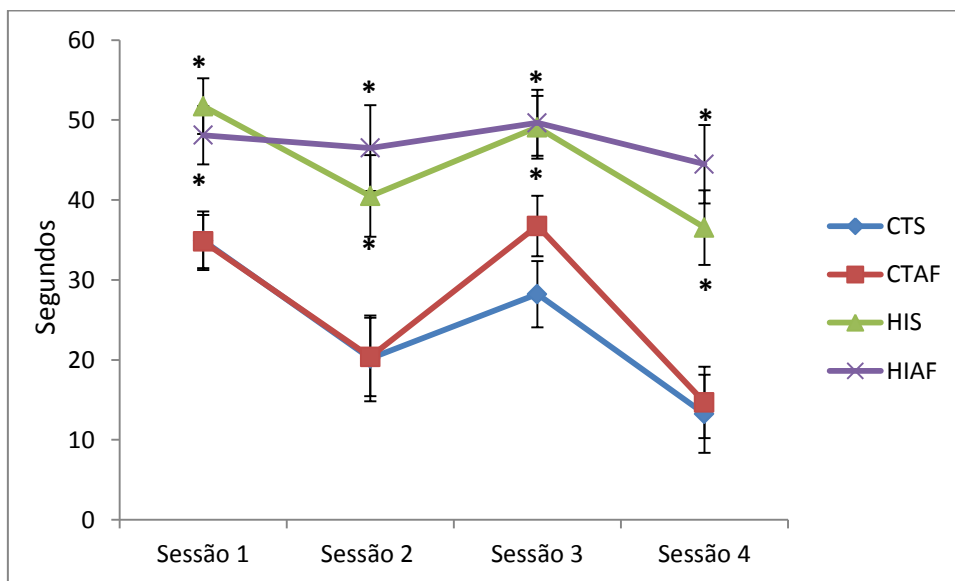
**Figura 4.** Latência para encontrar o alvo. \* Diferença significativa quando comparado ao CTS. # Diferença significativa quando comparado ao CTS e ao CTAF. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.



**Figura 5.** Número de cruzamentos no alvo. \* Diferença significativa quando comparado com o CTS. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

### 6.1.2 Memória de Trabalho

O dado referente à memória de trabalho está representado na figura 6. O resultado geral da ANOVA mostrou que houve diferença na variável lesão em todas as sessões (1-4). O *post hoc* de Duncan indicou diferença quando comparou os grupos HIS e HIAF com os grupos CTS e CTAF em todas as sessões demonstrando que houve prejuízo no aprendizado dos animais HI nessa tarefa.



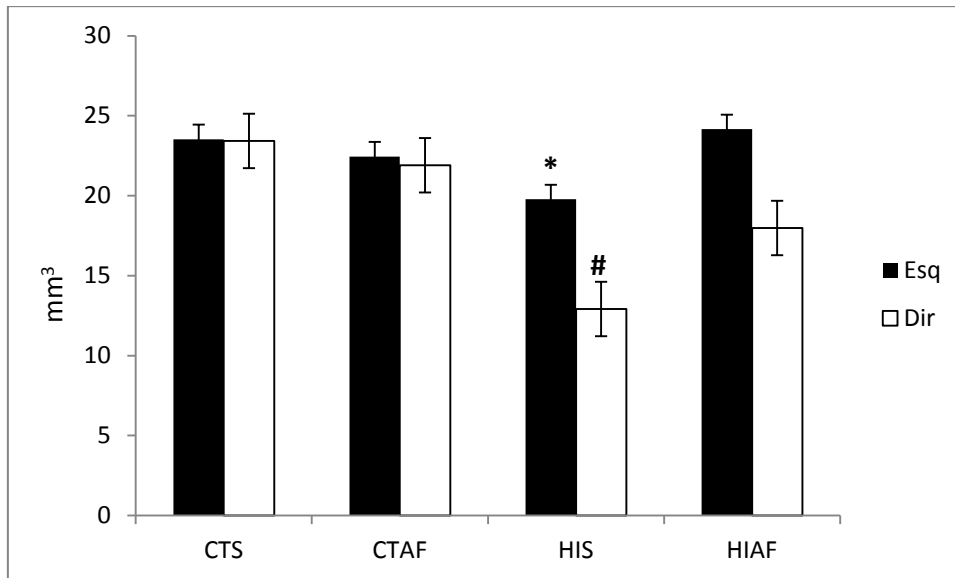
**Figura 6.** Curva de Aprendizado no Labirinto Aquático de *Morris* no protocolo para memória de trabalho.\* Diferença significativa dos grupos HIS e HIAF em relação aos grupos CTS e CTAF nas sessões 1,2,3 e 4. Os dados foram expressos como média±erro padrão.

## 6.2 Análise Morfológica

### 6.2.1 Volume Hipocampal

Os resultados do volume hipocampal são demonstrados na figura 7. O resultado geral da ANOVA indicou que houve uma interação entre lesão e tratamento ( $F(1,12)=9,0$ ;  $p<0.05$ ) no resultado do volume hipocampal esquerdo, contralateral à oclusão arterial. O *post hoc* de Duncan mostrou diferença no grupo HIS em relação ao CTS e HIAF. Quando analisado o lado direito, ipsilateral à lesão, o resultado geral da ANOVA mostrou diferença na variável lesão ( $F(1,12)=17$ ;  $p<0.05$ ). Já o teste *post hoc* indicou que houve redução do volume hipocampal no grupo HIS em relação aos grupos controle. Este resultado representa uma atrofia do hipocampo dos animais submetidos à HI, em ambos os hemisférios, sendo revertida pela suplementação com ácido fólico.



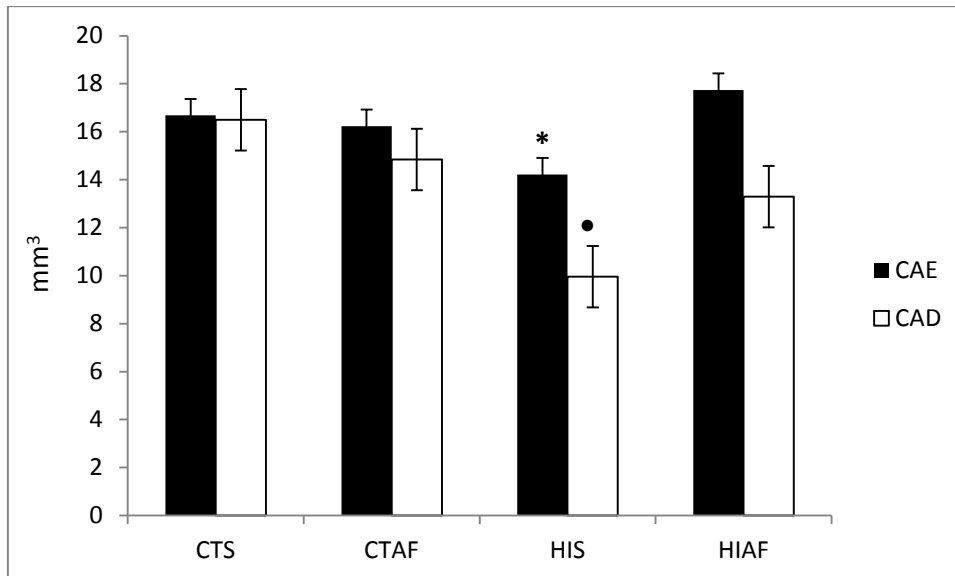


**Figura 7.** Volume hipocampal \* Diferença significativa em relação ao grupo CTS e HIAF. # Diferença significativa em relação aos grupos CTS e CTAF. Os dados foram expressos como média±erro padrão.

### 6.2.2 Volume do Corno de Ammon

O resultado geral da ANOVA indicou diferença, no lado esquerdo, contralateral à lesão, em relação à variável tratamento ( $F(1,12)=4,9$ ;  $p<0.05$ ) e uma interação entre as variáveis tratamento e lesão ( $F(1,12)=8,2$ ;  $p<0.05$ ). O *post hoc* mostrou que houve diminuição do volume do Corno de Ammon do lado esquerdo nos animais HIS em relação aos grupos CTS e HIAF.

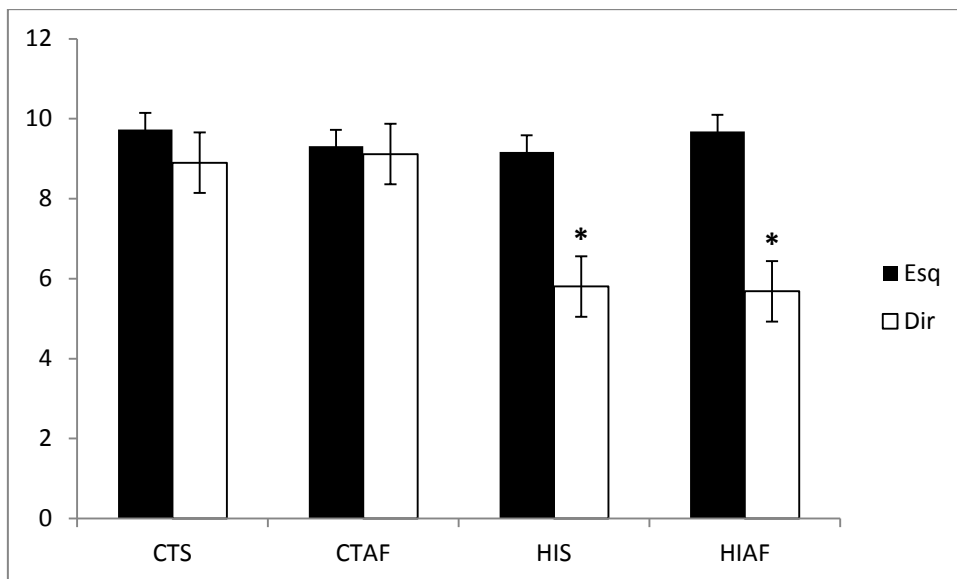
Quando analisado o lado ipsilateral à lesão ou direito, o resultado geral da ANOVA mostrou que houve diferença em relação à variável lesão ( $F(1,12)=9,9$ ;  $p<0.05$ ). O *post hoc* de Duncan indicou que também houve diminuição no volume do Corno de Ammon direito em relação aos grupos controles.



**Figura 8.** Volume do Corno de Ammon \* Diferença significativa quando comparado ao CTS e HIAF. • Diferença significativa quando comparado com os grupos CTS e CTAF. Os dados foram expressos como média±erro padrão.

### 6.2.3 Área do Estriado

Quando se analisou a estimativa de lesão da área do estriado direito o resultado geral da ANOVA mostrou diferença significativa em relação a variável lesão ( $F(1,12)=18,5$ ;  $p<0.05$ ). O *post hoc* de Duncan indicou que houve diminuição da área do estriado nos grupos HIS e HIAF no lado direito, ipsilateral à lesão, em relação aos grupos CTS e CTAF. No lado contralateral à lesão, esquerdo, não houve diferença entre os grupos.



**Figura 9.** Área do estriado – Estimativa de lesão \* Diferença significativa em relação aos grupos CTS e CTAF. Os dados foram expressos como média±erro padrão.

### 6.3 Discussão

O experimento 2 apresenta-se como uma continuação do primeiro experimento e teve como objetivo averiguar a influência do tratamento com ácido fólico sobre a memória espacial no labirinto aquático de Morris. Ainda avaliamos se o tratamento com ácido fólico foi capaz de recuperar as áreas que sofreram maior atrofia pela HI, como o hipocampo, o Corno de Ammon e o estriado.

A tarefa do labirinto aquático de Morris é adequada para se avaliar a cognição em ratos, uma vez que esses roedores são bons nadadores e apresentam boa capacidade de localização espacial. Por outro lado, a água é um meio aversivo para estes animais, e esses procuram escapar. Como a tarefa exige que o animal aprenda a localização da plataforma, o hipocampo é uma estrutura chave no processo de aprendizado e memória que é exigido nessa tarefa. Portanto, é um teste adequado para avaliação da integridade da função hipocampal (OLTON & MARKOWSKA, 1994; SAVE & POU CET, 2000). Nossos resultados mostraram que os animais submetidos à HI tiveram um prejuízo no desempenho da tarefa no labirinto aquático, quando avaliada a memória de referência e de trabalho. Esses achados corroboram os de Arteni *et al.* (2003) que observaram déficit de aprendizado nos animais hipóxico-isquêmicos. Pereira *et al.* (2007) também mostraram que os animais HI adultos tiveram menor número de cruzamentos e maior latência para encontrar o alvo no teste indicando um prejuízo no aprendizado desses animais. Em ambos os protocolos estudados, de referência e de trabalho, o tratamento com ácido

fólico não se mostrou efetivo. Este efeito deve-se, provavelmente, ao fato de que o hipocampo é uma estrutura que possui maior suscetibilidade à lesão causada pela HI e é uma peça chave na formação da memória. Sabe-se que a HI forma uma extensa lesão, por morte celular, principalmente no hipocampo de ratos submetidos a esse procedimento (ARTENI *et al.*, 2003; CARLONI *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2007). Nesse estudo também observamos prejuízo no aprendizado dos animais controle tratados com ácido fólico. Esses resultados corroboram com os de Sittig *et al.* (2012) que observaram déficit na memória espacial de animais que receberam ração suplementada com 8mg de folato/kg, cerca de três vezes mais que a quantidade indicada em uma ração normal.

Quando analisamos o volume hipocampal e o Corno de Ammon os resultados indicaram que houve diminuição do volume de ambas as estruturas nos animais submetidos à HI tratados com salina. Também observamos que os animais HI tratados com ácido fólico demonstraram melhora significativa no volume dessas estruturas. Estes achados estão de acordo com os de Arteni *et al.* (2003); Rodrigues *et al.* (2004) e Pereira *et al.* (2007) que estudaram o volume hipocampal e o Corno Amonn e observaram diminuição no volume dessas estruturas nos animais HI. No entanto, Rodrigues e colegas (2004) observaram que animais HI que foram submetidos à estimulação tátil por 10 minutos apresentaram reversão da atrofia hipocampal. Estes autores atribuem a melhora da atrofia ao leve efeito estressor da estimulação tátil, a qual aumenta os níveis de corticosterona que pode estar associada à neuroplasticidade. Sabe-se que os gânglios da base, estruturas responsáveis pelo controle motor dos indivíduos, também são afetados pela hipóxia-isquemia

(NOWAK *et al.*, 2011). Nesse contexto, a análise da estimativa de lesão mensurada no estriado demonstrou que houve diminuição na área dessa estrutura no lado ipsilateral à lesão, ou direito, tanto nos animais HI que receberam salina quanto nos que receberam ácido fólico. No entanto, quando analisamos o lado esquerdo ou contralateral à lesão, esse hemisfério pareceu não ser afetado. Estes dados corroboram com os de Pereira *et al.* (2007) que observaram diminuição da área estriatal nos animais hipôxicos-isquêmicos. No sistema nervoso central (SNC) a injúria resultante da hipóxia-isquemia torna os astrócitos reativos e responsivos de uma maneira típica denominada astrogliose (ENG *et al.*, 2000), caracterizada pela síntese rápida da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e filamentos intermediários, proliferação e/ou hipertrofia glial. Como observado neste trabalho ocorreu melhora significativa no volume hipocampal e prejuízo no aprendizado da tarefa no labirinto aquático de *Morris* nos animais HI tratados com ácido fólico. Sugere-se então, que a recuperação do volume hipocampal, muito provavelmente, deve-se a cicatrização glial. Ainda, alterações morfológicas podem acontecer, tais como aumento da arborização e aumento de espinhos dendríticos, porém sem uma efetiva comunicação sináptica.

Portanto, nossos resultados demonstraram que houve um déficit de aprendizado no labirinto aquático de *Morris* e que o tratamento com ácido fólico não foi capaz de revertê-lo. Todavia, este é o primeiro trabalho que mostra a recuperação da atrofia hipocampal gerada pela HI nos animais tratados com essa vitamina, e podemos sugerir que mais estudos são necessários para que possamos atribuir essa recuperação ao papel antioxidante do ácido fólico.

## 7. Discussão geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar uma possível estratégia neuroprotetora para as alterações comportamentais, bioquímicas e morfológicas ocasionadas pela HI neonatal, através do tratamento com ácido fólico. Para isso avaliamos o comportamento motor, a memória aversiva e a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no experimento 1, e avaliamos a memória de referência, de trabalho e o volume de lesão no experimento 2.

Sabe-se que a hipóxia-isquemia neonatal leva a um dano neurológico permanente que pode se apresentar na forma de paralisia cerebral, retardo mental, epilepsia e déficit cognitivo (ZHENG *et al.*, 2006). O modelo animal utilizado neste trabalho representa bem os déficits encontrados em humanos que sofreram HI. Estudos mostram que esses animais apresentam maior hiperatividade, possuem déficits importantes de memória, tanto na memória aversiva quanto na memória espacial e de trabalho (IKEDA *et al.*, 2001; MCAULIFFE *et al.*, 2006). Também apresentam atrofia no estriado, córtex pré-frontal e hipocampo (ARTENI *et al.*, 2003; MISHIMA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2007), áreas que foram estudadas nessa dissertação. Como a hipóxia-isquemia inicia o dano encefálico pela depleção energética, a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é a primeira a ter a sua função comprometida e isso contribui para a morte celular dando início a lesão encefálica. Ainda, estudos histológicos demonstram que o hipocampo, estrutura chave na formação da memória, é o primeiro alvo a ser comprometido sofrendo intensa atrofia, principalmente no lado ipsilateral à lesão (ARTENI *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004).

A utilização do ácido fólico como estratégia neuroprotetora neste trabalho teve motivação em estudos prévios, os quais mostraram a relação da suplementação com essa vitamina com a prevenção de eventos isquêmicos (ASSANELLI *et al.*, 2004) e melhora de déficits cognitivos ocasionados pelo estresse oxidativo gerado pela homocisteinemia (MATTÉ *et al.*, 2007). Estes pesquisadores têm atribuído ao ácido fólico um importante papel antioxidante. Sabendo-se que a lesão causada pela HI ocorre em grande parte, devido ao estresse oxidativo, neste estudo o ácido fólico foi escolhido como estratégia neuroprotetora a ser investigada.

### **7.1 Estudos comportamentais – Avaliação do comportamento motor, da memória aversiva, espacial e trabalho**

Nossos resultados demonstraram que os animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal, tratados com salina, apresentaram maior latência para sair do quadrante inicial e menor número de *rearings* na avaliação no campo aberto, comparando-se com os demais grupos. Estes resultados indicam aumento dos níveis de ansiedade nesses animais. Estes dados corroboram com estudo de Ferguson *et al.* (2005) que observaram maior ansiedade e menor número de *rearings* no labirinto em cruz elevado, nove a doze semanas após o nascimento em animais que tinham deficiência de folato. No entanto, neste estudo observamos reversão do efeito ansiogênico nos animais HI, tratados com ácido fólico. Quanto ao número de cruzamentos não houve diferença entre os grupos. Este resultado mostra que não houve alteração da atividade locomotora ampla dos animais.



O teste de esQUIVA inibitória infere o aprendizado do animal através da latência para descer da plataforma (IZQUIERDO & MEDINA, 1997), o qual é motivado pela experiência do evento aversivo. Este teste tem a amígdala como estrutura chave no reconhecimento aversivo (MCGAUGH, et al., 1995). Neste trabalho nós confirmamos que a hipóxia-isquemia ocasionou um prejuízo na memória aversiva, assim como foi identificado no trabalho de Arteni *et al.* (2003). No entanto, também foi observado neste trabalho que houve reversão no déficit de aprendizado dessa tarefa nos animais HI tratados com ácido fólico. Sugere-se que este efeito, provavelmente, tenha ocorrido devido à recuperação do dano à amígdala ou a formação de novas comunicações sinápticas. Por ser uma estrutura de difícil acesso, inexistem trabalhos demonstrando o índice de lesão ocasionado pela hipóxia-isquemia na amígdala. Todavia, demonstramos nesse trabalho que houve reversão do déficit causado na memória aversiva, que tem como estrutura principal a amígdala. Com isso podemos sugerir que este efeito possa ser atribuído ao potencial antioxidante do ácido fólico (DOSHI *et al.*, 2001; MATTÉ *et al.*, 2007; KOLLING *et al.*, 2011) evitando que a lesão oxidativa causada pela HI ocorra nessa estrutura.

Observamos também prejuízo no aprendizado das tarefas no labirinto aquático de *Morris* quando avaliamos a memória espacial e de trabalho. Esses dados corroboram os de Pereira *et al.* (2008) que observou déficits na memória espacial e de trabalho nos animais HI. Almlí *et al.* (2000) e Young *et al.* (1986) também encontraram déficit na memória espacial em animais HI adolescentes.

Matté *et al.* (2007) demonstraram que animais, em um modelo de homocistinúria, apresentavam déficits cognitivos na tarefa no labirinto aquático

de *Morris*. Entretanto, esses autores observaram que houve melhora do déficit nos animais tratados com ácido fólico e também atribuem esses achados ao papel do ácido fólico como antioxidante. No presente trabalho nós avaliamos a memória de referência e de trabalho após 40 dias de tratamento com ácido fólico e neste caso observamos que houve prejuízo cognitivo também nos animais controle tratados com ácido fólico. Este resultado corrobora com o estudo de Sittig *et al.* (2012) que observaram prejuízo na memória espacial, no labirinto aquático de *Morris*, em animais que tiveram sua dieta suplementada com 8mg de folato/kg partir do 30 DPN até o 60 DPN. Esses autores atribuem esse resultado a diminuição dos níveis dos hormônios tireoidianos circulantes, Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4), e também a uma diminuição do número de receptores  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  para esses hormônios no hipocampo.

## **7.2 Avaliação bioquímica – Atividade da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase**

A enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é uma proteína integral de membrana que tem papel chave na manutenção da homeostase celular garantindo a correta transmissão elétrica através da troca iônica de  $\text{Na}^+$  por  $\text{K}^+$  (LINGREL & KUNTZWEILER, 1994). Neste trabalho avaliamos a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no córtex pré-frontal e no estriado tanto do lado ipsilateral quanto no lado contralateral à lesão. No hipocampo, a análise ficou prejudicada devido a grande atrofia gerada pela HI nessa estrutura. Os resultados da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no córtex pré-frontal e estriado indicaram que os animais HI não tratados tiveram uma diminuição na atividade dessa enzima em ambos os hemisférios (ipsilateral e contralateral), quando

comparado ao grupo controle. Estes resultados corroboram com o estudo de Weiss *et al.* (2011), que identificaram diminuição na atividade dessa enzima no córtex de animais HI. Nossos achados também estão de acordo com o estudo de Simão *et al.* (2010) que também observaram, em um modelo de isquemia global, diminuição da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Além disso, nossos resultados demonstraram que a suplementação com ácido fólico foi capaz de reverter a redução da atividade da enzima, especialmente no estriado. Podemos sugerir que este achado é parcialmente responsável pelos efeitos comportamentais identificados na esQUIVA inibitória e as tarefas de campo aberto.

### **7.3 Avaliação morfológica – Volume hipocampal e estriatal**

Nesta dissertação foi avaliado ainda o volume hipocampal bem como a área do estriado para termos uma estimativa de lesão nessa estrutura. Nossos resultados demonstraram que houve diminuição no volume hipocampal bem como no volume do Corno de Ammon nos animais HI tratados com salina. Esses dados corroboram com os estudos de Pereira *et al.* (2007) e Arteni *et al.* (2003), que observaram diminuição no volume dessas estruturas nos animais HI. Todavia, observamos uma reversão do volume nos animais tratados com ácido fólico, indicando que o tratamento com essa vitamina apresentou um potencial preventivo ao dano gerado pela HI no hipocampo.

Quanto à lesão estimada no estriado, nossos resultados indicaram que o lado esquerdo, ou contralateral à lesão, não foi afetado pela hipóxia-isquemia e que houve redução da área no lado direito, ou ipsilateral à lesão tanto nos

animais HI tratados como nos animais não tratados. Sabe-se que existe formação de cicatriz glial após o insulto hipóxico-isquêmico e provavelmente este processo foi demonstrado nesse trabalho através da observação da melhora no volume hipocampal e prejuízo no aprendizado das tarefas no labirinto aquático de *Morris*. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados a fim de verificar possíveis aumentos nas densidades sinápticas e arborização dendrítica dessas estruturas e também elucidar os mecanismos envolvidos na reversão da atrofia hipocampal nos animais tratados com ácido fólico.

## 8. Conclusões

***Os resultados obtidos nessa dissertação nos permitem concluir que:***

O tratamento com ácido fólico foi capaz de reverter o efeito ansiogênico, o déficit na memória aversiva e a inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase causado pela HI neonatal;

Também foi efetivo na reversão da atrofia hipocampal;

Neste trabalho não observamos melhora no prejuízo causado pela HI na memória espacial e de trabalho.

## 9. Perspectivas

Investigar outras variáveis que possam ser afetadas pela HI neonatal, como: parâmetros do estado oxidativo do hipocampo, córtex e estriado.

Além disso, seguir a avaliação morfológica a fim de verificar alterações como cicatrização glial, nas diferentes estruturas e níveis sinaptofisina por ser importante na comunicação sináptica.

## 10. Referências Bibliográficas

ALMLI, C.R., LEVY, T.J., HAN, B.H., SHAH, A.R., GIDDAY, J.M., HOLTZMAN, D.M. BDNF protects against memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental Neurology*, 166: 99–114, 2000.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS AND COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE, AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN. Use and abuse of the APGAR score. *Pediatrics*, 98:141-142, 1996.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante no anexo desta resolução. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF*, 18 de dezembro de 2002.

ARTENI, N.S.; SALGUEIRO, J.; TORRES, I.; ACHAVAL, M.; NETTO, C.A. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairment in the adult rat. *Brain Research*, 973, 171–178, 2003.

ASSANELLI, D.; BONAMONE, A.; PEZZINI, A.; ALBERTINI, F.; MACCALI, P.; GRASSI, M.; ARCHETTI, S.; NEGRINI, R.; VISIOLI, F. Folic Acid and Vitamin E Supplementation Effects on Homocysteinemia, Endothelial Function and Plasma Antioxidant Capacity in Young Myocardial-Infarction Patients. *Pharmacology Research*, 49, 79-84, 2004.

BAGNYUKOVA, T.V.; POWELL, C.L.; PAVLIV, O.; TRYNDYAK, V.P.; POGRIBNY, I.P. Induction of oxidative stress and DNA damage in rat brain a folate/methyl-deficient diet. *Brain Research*, 07.073, 2008.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas de oxigênio e defesa do organismo. *Química Nova*, 29: 113-123, 2006.

BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. Handbook of vitamins. 2nd ed. New York: Marcel Decker, 1991. p.453-490.

BRODY, T. Nutritional biochemistry. SanDiego: Academic Press, 2ed, 1994.

CARLONI, S.; PERRONE, S.; BUONOCORE, G.; LONGINI, M.; PROIETTI, F.; BALDUINI. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Journal Pienal Research*, 44: 157–167, 2007.

CHAN, K. M.; DELFER, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry*, 157: 375–380, 1986.

CRUZ, A.C.S. & CECCON, M.E.J. Prevalência de asfixia perinatal e encefalopatia hipóxico-isquêmica em recém-nascidos de termo considerando dois critérios diagnósticos. *Revista brasileira de crescimento e desenvolvimento human*,. 20(2):302-316, 2010.

CZEIZEL, A.E. Folic acid and prevention of birth defects. *The Journal of The American Medical Association*, 5;275(21):1635-6, 1996.



CZEIZEL, A.E.; & DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *The New England Journal of medicine*, 327: 1832–1835, 1992.

DELLA-MORTE, D.; DAVE, K.R.; DEFAZIO, R.A.; BAO, Y.C.; RAVAL, A.P.; PEREZ-PINZON, A. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience*, 159: 993–1002, 2009.

DUGAN, L.L.; CHOI, D.W. Excitotoxicity, free radicals; cell membrane changes. *Annals Neurology*, 35: S17-S21, 1994.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP- Thirty-one Years (1969-2000). *Neurochemistry Research*, 25:1439-1451, 2000.

ESQUILIANO, G.R.; RAMIRÉZ, I.G.; VALDÉZ, A.T.; AGUILAR, C.A.T. Dano Neurológico secundário a hipóxia isquemia perinatal. *Archivos de Neurociencias*. V.9, N 3, Sept, 2004.

FERGUSON, S.A.; BERRY, K.J.; HANSEN, D.K.; WALL, K.S.; WHITE, G.; ANTONY, A.C. Behavioral effects of prenatal folate deficiency in mice. Birth Defects Research. *Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 73(4):249-52, 2005.

FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 307p

GUINSBURG, R. Síndrome hipóxico-isquêmica no recém-nascido: neuropatologia, aspectos clínicos e estratégias potenciais para a prevenção. I

Simpósio internacional de reanimação neonatal, Belo Horizonte/MG. Clínica de perinatologia. v. 2, p. 387-414. 2002.

IKEDA, T. Stem cells and neonatal brain injury. *Cell and Tissue Research*, 331: 263-269, 2008.

IZQUIERDO, I.; & MEDINA, J.H. The biochemistry of memory and its regulation by modulation processes. *Psychobiology*, 25: 1–9, 1997.

KOLLING, J.; SCHERER, E.B.; DA CUNHA, M.J.; WYSE, A.T. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid. *Cardiovascular Toxicology*, 11(1):67-73, 2011.

KREMER, D.R. & GROSSO, C., Maternal mutation 677C > T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene associated with severe brain injury in offspring. *Clinical Genetics*, 67(1): 69 – 80, 2005.

LAFEMINA, M.J.; SHELDON, R.A.; FERRIERO, D.M. Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. *Pediatric Research*, 59(5):680–683, 2006

LAI, MING-CHI & YANG. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of biomedicine and biotechnology*, 2011:609813.

LALONDE, R.; JOYAL, C.C.; BOTEZ, M.I., Effects of folic acid and folinic acid on cognitive and motor behavior sin 20-month-old rats. *Pharmacology Biochememistry and Behavior*, 44: 703–707, 1993.

LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *American Journal of Pathology*, 36, 1–17, 1960.

LINGREL, J.B.; & KUNTZWEILER, T. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal Biological Chemistry*, 269:19659-19662, 1994.

LIU, X.H.; KWON, D.; SCHIELKE, G.P.; YANG, G.Y.; SILVERSTEIN, F.S.; BARKS, J.D. Mice deficient in interleukin-1 converting enzyme are resistant to neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Journal of Cerebral Blood & Flow Metabolism.*, 1999, 19, 1099-1108.

MACCARI, M.L.; MELONI, A.M.; CENTURIÓN, C.G.; VELOSO, F. Hipertensión arterial grave en dos pacientes com homocistinuria familiar: respuesta al tratamiento com vitamina B6, ácido fólico y enalapril. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 105(6): 532-534, 2007.

MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L.; ROTHMAN, D. L.; SHULMAN, R. G. Energy on Demand. *Science*, 283: 496-497, 1999.

MATTÉ, C.; SCHERER, E.B.S.; STEFANELLO, F.M.; BARSCHAK, A.G.; VARGAS, C.R.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T.S. Concurrent folate treatment prevents Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> -ATPase activity inhibition and memory impairments caused by chronic hyperhomocysteinemia during rat development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 25: 545–552, 2007.

MATTSON, M.P. & SHEA, T.B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and disorders. *Trends in Neurosciences*, 26, 137–146, 2003.

MCAULIFFE, J.J.; MILES, L.; VORHEES,C.V. Adult neurological function following neonatal hypoxia-ischemia in a mouse model of the term neonate: water maze performance is dependent on separable cognitive and motor components. *Brain research*, 1118: 208-221, 2006.

MCGAUGH, J.L.; CAHILL, L.; PARENT, M.B.; MESCHES, M.H.; COLEMAN-MESCHES, K.; SALINAS, J. A.. Involvement of the amygdala in the regulation of memory storage. In: MacGaugh JL, Bermúdez-Rattoni F & Prado-Alcalá RA (Editors), *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory*. Lawrence Erlbaum, Mahwah, NJ, 17-39, 1995.

MCLEAN, C. & FERRIERO, D. Mechanisms of Hypoxic-Ischemic Injury in the Tern Infant. *Seminars in Perinatology*, 28: 425-432, 2004.

MISHIMA, K.; IKEDA, T.; AOO, N.; TAKAI, N.; TAKAHASHI, S.; EGASHIRA, N.; IKENOUE, T.; IWASAKI, K.; FIJIWARA, M. Hypoxic-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brains damage related to memory impairment. *Neuroscience Letters*, 376: 194-199, 2005.

MORGANE, P.J., AUSTIN-LAFRANCE, R.J; BRONZINO, J.D., TONKISS,J., GALLER,J. Malnutrition and developing central nervous system. In: ISSAACSON, R.L., JENSEN,K.F. THE VULNERABLE BRAIN AND ENVIROMENTAL RISKS: THE MALNUTRITION AND HAZARD ASSESSMENT. New York: Plenum Press, V.1,P03-43, 1992.

NOWAK, A.D.; BOCK, A.; PONFICK, M.; GDYNIA, HANS-JURGEN. Parkinsonism following bilateral hypoxic-ischemic lesions of the striatum. *Journal of Neurology*, Springer, 2011.

OLTON, D.S.; & MARKOWSKA, A.L. Memory and hippocampal function as targets for neurotoxic substances. *Neurotoxicology*. 15 (3):439-444,1994.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - World Health Organization. Neonatal and perinatal mortality: country, regional and global estimates. Geneva: WHO; 2006.

PAULA, DE S.; VITOLA, A.S.; GREGGIO, S.; PAULA, DE D.; MELLO, P.B.; LUBIANCA, J.M.; XAVIER, L.L.; FIORI, H.H.; DACOSTA, J.C. Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatric Research*, 65: 631 –635, 2009.

PAXINOS, G., WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth edition. New York. Elsevier, 2004.

PEREIRA, L.O.; ARTENI, N.S.; PETERSEN, R.C.; ROCHA, A.P.; ACHAVAL, M.; NETTO, C.A. Effects of Daily Environmental Enrichment on Memory Deficits and Brain Injury Following Neonatal Hypoxia-ischemia in the Rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87: 101 -108, 2007.

PEREIRA, L.O.; STRAPASSON, A.C.P.; NABINGER, P.M.; ACHAVAL, M.; NETTO, C.A. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in females, but not in males, rats after hypoxia-ischemia. *Brain Research*, 1218: 257–266, 2008.

PERLMAN, J. M. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic Encephalopathy. *Pediatrics*. v. 117, p. 28-33. 2006.

PROCIANOY, R. S. & SILVEIRA, R.C. Hypoxic-Ischemic Syndrome. *Jornal de Pediatria, Sociedade Brasileira de Pediatria*, Vol 77, Supl 1/S63, 2001..

RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology*, 9: 131–141, 1981.

RODRIGUES, A.; ARTENI, N.; ABEL, C.; ZYLBERSZTEJN, D.; CHAZAN, R.; VIOLA, G.; XAVIER, L.; ACHAVAL, M.; NETTO, C. A. Tactile Stimulation and Maternal Separation Prevent Hippocampal Damage in Rats Submitted to Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Brain Research*, 1002: 94-99, 2004.

SAID, H.M.; & MOHAMMADKHANI, R. Folate transport in intestinal brush border membrane: involvement of essential histidine residue(s). *Biochemical Journal*, 290: 237–240, 1993.

SANDERS R. D.; PATEL, N.; HOSSAIN, M.; MA, D.; MAZE, M. Isoflurane exerts antinociceptive and hypnotic properties at all ages in fischer rats. *British Journal of Anaesthesia*, v. 95 (3), p. 393–399, 2005.

SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, p. 795-824, 2000.

SERVICE, CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Recommendations for the use folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR* 41 (RR – 14): 1–7, 1992.

SIMAO, F.; MATTÉ, A.; MATTÉ, C.; SOARES, F.M.S.; WYSE, A.T.S.; NETTO, C.A.; SALBEGO, C.G. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by transiente global cerebral ischemia in rats. *Journal of nutritional biochemistry*. 22(2011)921-928, 2010.

SIROTNAK, F.M.; TOLNER, B. Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annual Review of Nutrition*, 19:91-122, 1999.

SITTIG, L.J.; HERZING, L.B.K.; XIE, H.; BATRA, K.K.; SHUKLA, P.K.; REDEI, E.E. Excess folate during adolescence suppresses thyroid function with permanent deficits in motivation and spatial memory. *Genes and Behavior*, 11: 193-200, 2012.

VAN, G.B.; HULTDIN, J.; JOHANSSON, I.; STEGMAYR, B.; HALLMANS, G.; NILSSON, T.K.; WEINEHALL, L.; WITTHOFT, C.; PALMQVIST, R.; WINKVIST, A. Folate, vitamin B12, and risk of ischemic and hemorrhagic stroke: a prospective, nested case-referent study of plasma concentrations and dietary intake. *Stroke*, 36(7):1426-31, 2005. .

VANNUCCHI, H.; JORDÃO, JR.A.A. Vitaminas hidrossolúveis. In Dutra-de-Oliveira, J.E.; Marchini, J.S. *Ciências Nutricionais*. São Paulo; Sarvier; 1998. P191-207.

VANNUCCI R.C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *American journal of perinatology*, 17:113-120. 2000.

VANNUCCI R.C.; VANNUCCI S.J. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Developmental Neuroscience*, 27: 81-86, 2005.

VOLPE, J. Perinatal Hypoxic-Ischemic. *Neurology of the Newborn*. Saunders. Ed.40. 265-318, 2000.

WEIS, S.N.; SCHUNCK, R.V.; PETTENUZZO, L.F.; KROLOW, R.; MATTÉ, C.; MANFREDINI, V.; DO CARMO, R.; PERALBA, M.; VARGAS, C.R.; DALMAZ,

C.; WYSE, A.T.; NETTO, C.A. Early biochemical effects after unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29: 115-120, 2011.

WEITZDOERFER R.; POLLAK A.; LUBEC B. Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. *Seminars of Perinatology*, 28: 249-256, 2004.

WELSH, F.A.; VANNUCCI, R.C.; BRIERLEY, J.B. Columnar alterations of NADH fluorescence during hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2, 221-228, 1982.

WENG, L.C.; YEH, W.T.; BAI, C.H.; CHEN, H.J.; CHUANG, S.Y.; CHANG, H.Y.; LIN, B.F.; CHEN, K.J.; PAN, W.H. Is ischemic stroke risk related to folate status or other nutrients correlated with folate intake? *Stroke*, 39(12): 3152–3158, 2008.

WYSE, A.T.S.; BRUSQUE, A.M.; SILVA, C.G.; STRECK, E.L.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.M.D. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport*, 9: 1719–1721, 1998.

YAGER, J.Y., Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Seminars in Pediatric Neurology*, 11: 31-46, 2004.

YOUNG, R.S.K.; KOLONICH, J.; WOODS, C.L.; YAGEL, S.K. Behavioral performance of rats following neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke* 17(6):1313-6, 1986.



ZHENG, TONG; ROSSIGNOL, CANDACE; LEIBOVICI, AVITAL; ANDERSON, KEVIN J.; STEINDLER, DENNIS A.; WEISS, MICHAEL D. Transplantation of Multipotent Astrocytic Stem Cells into a Rat Model of Neonatal Hypoxic-ischemic Encephalopathy. *Brain Research*, 1112(1): 99-105, 2006.