

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

**A INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE
O PREJUÍZO COMPORTAMENTAL, BIOQUÍMICO E
MORFOLÓGICO CAUSADO PELA HIPÓXIA-ISQUEMIA
NEONATAL EM RATOS**

LENIR ORLANDI PEREIRA SILVA

Porto Alegre

2007

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

**A INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE
O PREJUÍZO COMPORTAMENTAL, BIOQUÍMICO E
MORFOLÓGICO CAUSADO PELA HIPÓXIA-ISQUEMIA
NEONATAL EM RATOS**

LENIR ORLANDI PEREIRA SILVA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Neurociências pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

**Porto Alegre
2007**

"Algo é só impossível até que alguém duvide
e acabe provando o contrário."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a agradeço a Deus por ter tanto o que e para quem agradecer.

À primeira pessoa que me recebeu na UFRGS, abriu as portas desta Instituição, propiciou-me o importante exercício da independência na pós-graduação e compartilhou comigo sua vasta experiência tanto no *saber* quanto no *conviver*. Ao Mestre Alex, com carinho, obrigada por tudo!

A uma importante colaboradora deste trabalho, não muito paciente, mas *sempre presente*, e muito mais que o “Gênio da Histologia”... Profa. Matilde agradeço pela colaboração em todos os momentos e pelo carinho de sempre!

A uma colaboradora especial, orientadora profissional e emocional presente nestes 4 anos, e, acima de tudo, a uma grande amiga, para todas as horas. Obrigada querida amiga Ionara! Ah, aproveito para pedir desculpas ao Tuti e à Marina, pelo “aluguel” da esposa e mãe.

Aos membros da banca, fico grata pelas contribuições. Ao Prof. Marcellino, pelas trocas de experiências sobre a estimulação; à Profa. Ângela, por todos os *bons fluidos* partilhados e, ao Prof. Aldo, o meu “ídolo” na Neurociência, por ser um belo *exemplo* a ser seguido.

À minha antecessora, que me passou os cuidados da HI e deu as primeiras orientações na familiarização com o laboratório, mas que, muito além disso, tornou-se uma verdadeira amiga. *Sua louca*... Nice, obrigada por tudo!

E, um agradecimento especial. Não só agradecerei pela contribuição nos trabalhos desta, mas muito, muito mais que isso, por me permitirem a experiência da orientação, sempre com muita paciência, disposição e respeito. Obrigada à Ruth, ao Anderson, à Paty e ao Ata, *alunos IC destaque* neste trabalho!

Aos companheiros do grupo (“isquêmicos”, “lesionados”, indecisos, todos!), agradeço por estarem presentes, seja num dia de experimento, num seminário, na hora do cafezinho, nos congressos ou na troca de experiência do dia-a-dia. Especialmente, à amiga catarinense Fernanda, que, juntamente comigo, fez crescer a população de migrantes e defensores do mais belo estado do Brasil!

Aos colegas do grupo do Estresse: Profa Carla e Ana Paula, as anfitriãs do grupo; à dupla do L, Luísa e Léo, sempre carinhosos, presentes e muito sorridentes; e à nova geração, “liderada” pela Letícia e Willian, obrigada pelo quase sempre harmonioso convívio e pelo exercício de dividir.

Aos colegas e professores do PPG Neuro! Agradeço a todos porque foram muitas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a minha formação e também para que bons momentos ficassem guardados na lembrança...

Agradeço também ao CNPq, CAPES e UFRGS.

À minha família de Porto Alegre, que me adotou com muito carinho e que, em muitos momentos, prestou importante colaboração para a execução desta tese (transporte de ratos, uso do micro em momento de desespero, etc). Vó, sogro, sogra, Ricardo e Lizandra, obrigada pela disposição em sempre estar prontos para ajudar!

Agora parece ser um bom momento para eu agradecer a minha herança! “Filhas, a herança que a gente deixa para vocês é o estudo. Aproveitem!” Eu fiz 30 anos e continuo estudando; levei a sério a célebre frase do meu pai! Obrigada aos meus pais, minhas irmãs, cunhado e meus fofos sobrinhos por me estimularem, amarem e por estarem sempre comigo!

E, finalmente, agradeço ao meu Amor por *tudo*! É um *tudo* tão extenso que talvez só seja comparável à importância deste gaúcho da minha vida. O Nando talvez seja o primeiro responsável por esta tese, já que foi ele que me trouxe para mais perto do “minuano”. Querido, obrigada por todo o companheirismo, que foi desde o “podes dar uma olhadinha no gás durante a hipóxia ou nos ratos durante o enriquecimento?”, “vamos limpar estas lâminas juntos para acabar mais rápido?” até a impressão desta tese! Juro que vou tentar entender um pouco de psicologia e te ajudar na dissertação...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Hipóxia-isquemia encefálica: mecanismos neuropatológicos	14
1.2 Hipóxia-isquemia encefálica: o modelo experimental de Levine-Rice..	18
1.3 Enriquecimento Ambiental	20
1.4 Hipóxia-isquemia e intervenções comportamentais/ambientais	25
2 OBJETIVO.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3 RESULTADOS.....	30
4 DISCUSSÃO GERAL.....	32
5 CONCLUSÕES.....	45
6 PERSPECTIVAS.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Esquema do funcionamento da sinapse glutamatérgica.....	4
Figura 2 - Procedimento modificado de Levine; que utiliza a combinação de hipóxia e isquemia.....	8
Figura 3 – Esquema ilustrando os efeitos sensoriais, cognitivos, motores e sociais da exposição de ratos ao ambiente enriquecido.....	11
Figura 4 – Sessões coronais representativas do efeito da HI e da estimulação tátil (TS).....	14

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Desenho experimental.....	22
Figura 2 – Performance no protocolo de memória de referência no labirinto aquático.....	23
Figura 3 – Teste do protocolo de memória de referência.....	24
Figure 4 – Performance no protocolo de memória de trabalho.....	24
Figura 5 – Medida do volume hipocampal.....	25

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Índice de preferência no teste de reconhecimento de objetos.....	54
--	----

Figura 2 – Performance de ratos e ratas adolescentes no protocolo de memória de referência.....	55
Figura 3 – Performance de ratos e ratas adultos no protocolo de memória de referência.....	56
Figura 4 – Performance de ratos e ratas adolescentes no protocolo de memória de trabalho.....	57
Figura 5 – Performance de ratos e ratas adultos no protocolo de memória de trabalho.....	58
Figura 6 – Medida do volume hipocampal.....	59

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Efeitos do enriquecimento ambiental sobre os níveis de radicais livres (DCF) em hipocampo e córtex de ratos hipóxico-isquêmicos.....	85
Figura 2 – Efeitos do enriquecimento ambiental sobre a atividade da SOD em hipocampo e córtex de ratos hipóxico-isquêmicos.....	86
Figura 3 – Efeitos do enriquecimento ambiental sobre os níveis de BDNF em hipocampo e córtex de ratos hipóxico-isquêmicos.....	87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Correlações de Spearman.....25

Tabela 2 – Área cortical.....25

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Área do estriado em animais hipóxico-isquêmicos estimulados em ambiente enriquecido.....60

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Níveis de TBARS em hipocampo e córtex frontal.....88

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
Ca ⁺²	Íon cálcio
CA1	Subcampo 1 do corno de Ammon
CT	Grupo controle
DCF	2',7' diclorofluoresceína
DCF-DA	Diacetato de 2',7'diclorofluoresceína
DCFH	2',7' diclorofluoresceína (forma reduzida)
EA	Enriquecimento ambiental
HI	Hipóxia-isquemia
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
N ₂	Nitrogênio
NMDA	N-metil-D-aspartato
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ [•]	Radical superóxido
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do enriquecimento ambiental (EA) sobre a memória e a morfologia hipocampal, estriatal e cortical, estado oxidativo e níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), em ratos Wistar submetidos à hipóxia-isquemia (HI) neonatal. No *capítulo 1* foram examinados os efeitos do EA sobre o prejuízo na memória observado no labirinto aquático de Morris (LAM) e sobre a atrofia hipocampal e cortical em animais hipóxicos-isquêmicos adultos. Ratos Wistar machos, no 7º dia pós-natal (DPN) foram submetidos ao modelo de Levine-Rice de HI neonatal, no qual a artéria carótida comum direita é ocluída permanentemente e, na seqüência, os animais foram mantidos em uma atmosfera hipóxica (90 min, 8% O₂-92% N₂). Duas semanas após a HI, os animais foram estimulados em um ambiente enriquecido (1h/dia, por 9 semanas). No LAM, os animais HI mantidos em ambiente padrão apresentaram pior performance quando comparados aos grupos CT e o grupo HI enriquecido teve mesmo comportamento que os grupos CT. Uma significativa atrofia hipocampal e cortical foi identificada nos animais hipóxico-isquêmicos, porém, nesta análise, o EA não resultou em proteção significativa. O *capítulo 2* teve como intuito investigar se a manutenção em ambiente enriquecido precocemente (8º-30 DPN) seria efetiva na recuperação da atrofia hipocampal pela HI, e, se os efeitos cognitivos vistos no EA diário seriam extensivos a outro tipo de memória e, também a outros períodos do desenvolvimento. Ratos e ratas Wistar machos foram submetidos à HI (conforme descrito acima) e, no dia seguinte, foram colocados em um ambiente enriquecido. Na seqüência, a memória de reconhecimento, no teste de reconhecimento de objetos e a memória espacial no LAM são analisadas. Na vida adulta, os animais foram submetidos a mais uma sessão experimental no LAM. O déficit cognitivo observado na memória de reconhecimento nos animais HI foi revertido pela estimulação. Porém, o prejuízo na memória espacial foi parcialmente revertido pelo EA; a memória de trabalho nas fêmeas, no período da adolescência, foi mais claramente beneficiada por este efeito. E, corroborando os resultados do primeiro experimento, a HI resultou em dano tecidual ao hipocampo e também ao estriado, sem indicação de efeito significativo pela estimulação. O *capítulo 3* teve como objetivo investigar se a modulação do estado oxidativo e os níveis de BDNF cerebrais podem estar envolvidos no efeito neuroprotetor cognitivo do EA em animais adultos submetidos à HI. Ratos Wistar machos foram utilizados neste experimento; os procedimentos de HI e EA foram os mesmos do primeiro experimento. Os animais foram sacrificados 24 horas após o término do período de enriquecimento (85º DPN), quando hipocampo e córtex foram dissecados para a posterior determinação dos parâmetros de estresse oxidativo (quantificação de radicais livres, dano em macromoléculas e atividade da enzima superóxido dismutase - SOD) e dos níveis de BDNF. Os resultados demonstraram uma diminuição na quantidade de radicais livres no hipocampo esquerdo dos animais HI e um aumento destes níveis no córtex direito; e, também, um aumento na atividade da SOD no hipocampo direito dos animais HI e uma diminuição desta atividade no hipocampo esquerdo nos animais não estimulados. Além disso, os níveis de BDNF foram aumentados no hipocampo dos animais HI mantidos em ambiente padrão. Estes resultados sugerem que o efeito neuroprotetor cognitivo do EA diário pode não ser dependente da expressão de BDNF nem do estado oxidativo do hipocampo e córtex.

ABSTRACT

This study was undertaken to investigate the environmental enrichment (EE) effects over memory function and hippocampus and cortex morphology, oxidative status and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels, consequent to neonatal hypoxia-ischemia (HI) in Wistar rats. The objective of *chapter 1* was to examine, in adulthood, the effects of daily EE on memory deficits in the Morris water maze (MWM) and hippocampal and cerebral damage, caused by neonatal HI. Male wistar rats at the 7th postnatal day were submitted to the Levine-Rice model of neonatal HI, comprising permanent occlusion of the right common carotid artery and a period of hypoxia (90 min, 8%O₂-92%N₂). Two weeks after the HI event, animals were stimulated by the enriched environment (1h/day for 9 weeks). In the MWM, non-stimulated HI animals had worse performance than controls and HI-enriched rats showed memory performance as good as that of controls. There was a reduction of both hippocampal volume and cortical area, ipsilateral to arterial occlusion, in HI animals; EE did not affect these morphological measurements, despite its clear cognitive neuroprotective effect. The *chapter 2* investigated whether early continuous housing in an enriched environment would be effective in recovering hippocampal atrophy consequent to the neonatal HI, as well as if the benefits of continuous EE would extend to other memory types, both in adult and adolescent female and male rats. As described above, animals were submitted to HI and, starting 1 day after the event, they were housed in an enriched environment (8th-30th PN day). Performances of animals in the novel-object recognition were assessed in the adolescence period and in the MWM task in the adolescence and, again, in adulthood. Cognitive deficits arising after neonatal HI in the novel-object recognition test were completely recovered by the environmental stimulation, in animals of both genders. However, spatial memory impairment in the MWM was partially prevented by EE; the effect was observed especially in female adolescent rats on the working memory. Corroborating the findings of the first experiment, there was no enrichment effect over hippocampus volume and striatum area. These data indicate that early housing in an enriched environment recovered performance in the object recognition task and, in adolescent females, in the working memory spatial task after a neonatal hypoxic-ischemic event. No effects of enrichment were revealed in adult animal performance nor in tissue atrophy of hippocampus and striatum consequent to HI. The *chapter 3* was designed to investigate whether the modulation of brain oxidative status and/or BDNF content in adulthood are involved in functional neuroprotection caused by EE after neonatal HI. Protocols of the HI and EE utilized in this experiment were the same as of the first experiment. Male rats were sacrificed 24 hours after the enrichment period, i.e., at PN day 85. We have determined BDNF levels and several oxidative stress parameters, specifically the free radicals levels, macromolecules damage and superoxide dismutase (SOD) activity, in hippocampus and frontal cortex samples. It was found a decrease in free radical content in the left hippocampus of HI animals and an increase in non-stimulated rats in the right cortex; also, increased SOD activity in the right hippocampus of HI and a decrease of enzyme activity in the left hippocampus of stimulated groups were found. Moreover, BDNF levels were increased in the hippocampus of the non-stimulated HI group. These results suggest that the neuroprotective cognitive effect of daily environmental enrichment may not be dependent on BDNF expression nor on the oxidative status in hippocampus and cortex.

1 INTRODUÇÃO

A hipóxia-isquemia (HI) encefálica é a maior causa de mortalidade aguda e de morbidade neurológica crônica que ocorre em recém-nascidos, e pode ser conseqüência de vários processos patológicos, como asfixia intra-uterina severa e outras complicações da gravidez e do parto (BERGER & GARNIER, 1999). Estimativas recentes da Organização Mundial de saúde indicam que dos 37% de casos de mortalidade infantil antes dos 5 anos de idade, 23% são relacionados com asfixia perinatal (DURAN *et al.*, 2007). Há evidências de que a epilepsia, a paralisia cerebral e deficits cognitivos e motores, entre outros, podem estar associados a eventos hipóxico-isquêmicos no período neonatal (THORNGREN-JERNECK *et al.*, 2004; LINDSTROM *et al.*, 2006). Os prejuízos cognitivos e motores são de grande importância clínica, podendo interferir nas atividades do cotidiano e resultar em total dependência para as atividades da vida diária (GILLBERG, 2003).

1.1 Hipóxia-isquemia encefálica: mecanismos neuropatológicos

Diferentes mecanismos estão relacionados com a hipóxia-isquemia neonatal: menor perfusão sistêmica devida a hipovolemia, diminuição do aporte sangüíneo do parênquima cerebral, com conseqüente déficit energético, e peroxidação de macromoléculas biológicas por geração de radicais livres gerados durante a reperfusão dos tecidos (SAUGSTADT, 1996). No encéfalo, os processos patológicos relacionados com a HI envolvem principalmente a excitotoxicidade glutamatérgica, o estresse oxidativo e a inflamação (MISHRA & DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1999; MCLEAN & FERRIERO, 2004).

A *excitotoxicidade*, como mecanismo de dano neuronal, é desencadeada a partir de um desequilíbrio entre a liberação e a recaptação de glutamato. Este

neurotransmissor excitatório, ao ser liberado pelas vesículas pré-sinápticas, atua sobre receptores pós-sinápticos, a saber: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e cainato. Esta atividade glutamatérgica na fenda sináptica é regulada por astrócitos, os quais têm o importante papel de remover rapidamente o glutamato e convertê-lo em glutamina, substância que é restituída ao neurônio para novamente ser convertida à glutamato (MAGISTRETTI *et al.* 1999). Este mecanismo de recaptção do glutamato requer um gasto energético e, conseqüentemente, sofre prejuízo na presença de falência energética (Figura 1).

A hipóxia-isquemia, por alterar tanto a produção de ATP quanto a glicogenólise, implica em desequilíbrio na neurotransmissão glutamatérgica. A recaptção ineficiente do glutamato resulta na manutenção prolongada deste neurotransmissor na fenda sináptica e, subseqüentemente, em maior ativação dos receptores pós-sinápticos. O receptor NMDA, que é super-expressado no encéfalo em desenvolvimento, permite o influxo dos íons Na^+ e Ca^+ e também de água em quantidades excessivas ao neurônio pós-sináptico. A água e o Na^+ desencadeiam a morte celular por necrose e o aumento intracelular dos níveis de Ca^+ resulta em disfunção mitocondrial, falência energética, ativação de proteases e de fosfolipases, que vão culminar com a morte neuronal por apoptose (MCLEAN & FERRIERO, 2004).

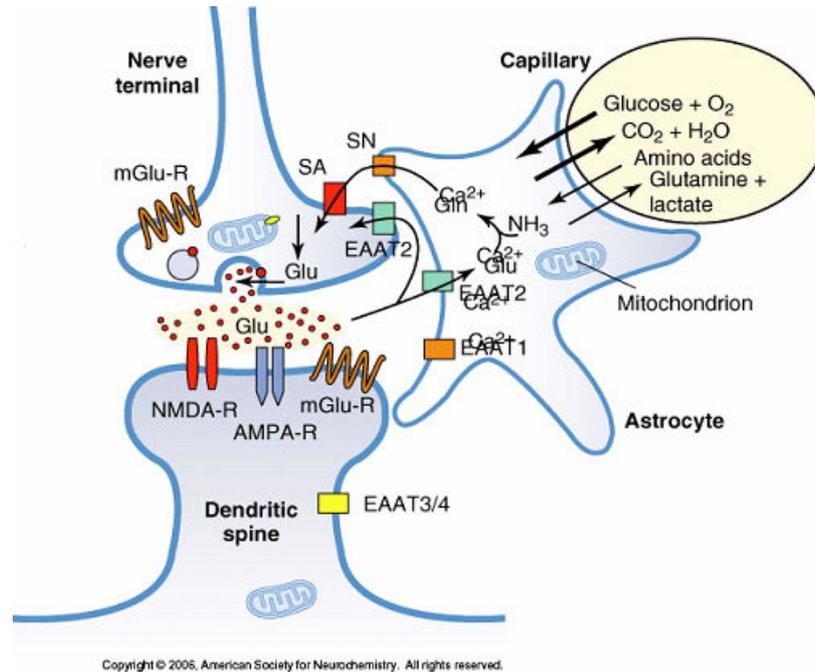


Figura 1 – Esquema do funcionamento da sinapse glutamatérgica.

A condição hipóxico-isquêmica também altera o metabolismo energético das células. A tensão tecidual de oxigênio é expressivamente reduzida causando uma ineficiência da respiração mitocondrial e da produção de ATP pela fosforilação oxidativa. Assim, é estimulada a glicólise anaeróbica com aumento na produção de lactato, fato que precede o desenvolvimento de dano encefálico (KRISTIAN, 2004). O aumento nos níveis de radicais livres é apontado como desencadeador de dano aos componentes mitocondriais e, ainda, pode ser responsável pela inibição da citocromo c oxidase, um importante marcador do metabolismo aeróbico (CADENAS & DAVIES, 2000 e SHARPE & COOPER, 1998).

Espécies reativas de oxigênio, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido, e os radicais hidroxil e peroxil, são continuamente produzidos como subproduto do metabolismo energético. Devido a sua alta reatividade, as espécies

radicais atuam sobre as moléculas constitutivas das células causando prejuízos funcionais importantes. Em contrapartida, existem mecanismos de defesa antioxidante responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Esses mecanismos podem ser enzimáticos: a superóxido dismutase (SOD) que converte radicais superóxido em H_2O_2 ; a catalase (CAT) que é responsável pela metabolização do H_2O_2 ; e a glutathiona peroxidase (GPx) que remove os radicais peróxido dos peróxidos. Atividades antioxidantes não enzimáticas, exercidas pelas vitaminas E e C e pela glutathiona, também desempenham papel importante nos mecanismos de defesa antioxidante (HALLIWELL, 1992). Na HI, ocorre alteração funcional e estrutural das mitocôndrias, o que vem a resultar em acúmulo de radicais livres. E, como principal implicação do desequilíbrio entre a produção de radicais livre e a atividade antioxidante também ocorre excitotoxicidade, com dano e possível morte celular, conseqüente à peroxidação lipídica, destruição protéica e danos ao DNA (FERRIERO, 2001).

O encéfalo exibe uma resposta imune adaptativa na presença da HI. Esta envolve a liberação de citocinas pela microglia, as quais são mediadoras da resposta inflamatória, e está associada a maior lesão tecidual após um evento hipóxico-isquêmico (MCLEAN & FERRIERO, 2004). Foi descrito que a expressão de interleucina (IL)-1 aumentou após a HI neonatal e que a administração de antagonistas do receptor da IL-1 reduziu o dano encefálico (GROW & BARKS, 2002). No entanto, o mecanismo pelo qual os mediadores inflamatórios influenciam a patogênese da HI permanece desconhecido. Um indicativo do mecanismo envolvido nas conseqüências da inflamação pela HI é a ação da microglia. As células da microglia, quando ativadas pelo evento hipóxico-isquêmico, além da liberação de citocinas estimulam também a

liberação de glutamato, radicais livres e óxido nítrico. Desta forma, a inflamação seria mais um fator a contribuir para a excitotoxicidade e morte celular (WOOD, 1995).

O resultado desses eventos é a lesão tecidual por morte celular; no caso da HI, o principal alvo encefálico são as células piramidais do hipocampo, especialmente da região CA1, visto que essas células apresentam vulnerabilidade seletiva ao dano isquêmico (ITO *et al.*, 1975; PULSINELLI *et al.*, 1982).

1.2 Hipóxia-isquemia encefálica: o modelo experimental de Levine-Rice

O interesse no estudo da encefalopatia hipóxico-isquêmica, sua fisiopatologia e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas serviu como motivação para o desenvolvimento e o aprimoramento de modelos experimentais. O modelo atualmente mais utilizado para o estudo da HI neonatal em roedores é aquele proposto por Levine (1960) e modificado por Rice e colaboradores (1981). Este consiste na associação de uma isquemia unilateral, ou seja, na ligação unilateral da artéria carótida comum de um dos lados, seguida de hipóxia sistêmica produzida pela inalação de uma mistura gasosa contendo apenas 20 % de oxigênio, por determinado período de tempo (vide Figura 2; RICE *et al.*, 1981; VANNUCCI & VANNUCCI, 2005).

O procedimento experimental é realizado aos 7 dias de vida pós-natal porque o encéfalo de roedores com 7 dias de idade corresponde, em nível de desenvolvimento, ao encéfalo dos humanos ao nascimento quando a camada neuronal do córtex está completa, a matriz germinativa está involuída e a substância branca sofreu pouca mielinização (VANNUCCI *et al.*, 1997).

O modelo de HI em ratos de 7 dias apresenta muitas vantagens: é altamente reproduzível, de baixo custo, possui baixa mortalidade, produz injúria cerebral em 90% dos ratos e permite a recuperação do fluxo sanguíneo, mesmo com a oclusão da carótida. Pela natureza progressiva da hipóxia/isquemia, são encontrados alterações no fluxo sanguíneo e desarranjos metabólicos celulares similares aos observados na injúria cerebral perinatal humana, causando dano localizado no córtex cerebral, no estriado, no hipocampo e no tálamo, regiões cerebrais freqüentemente afetadas após asfixia severa em humanos (WALTON *et al.*, 1999). O dano encefálico é geralmente encontrado limitado ao hemisfério ipsilateral à isquemia, onde é freqüentemente observada diminuição do número celular, da arborização dendrítica e do número de espinhos dendríticos, bem como atrofia tecidual (DUMAN *et al.*, 2004; XIA *et al.*, 2005). Além disso, déficits mnemônicos são observados no labirinto aquático de Morris (ALMLI *et al.*, 2000; MCAULIFFE *et al.*, 2006), labirinto radial de 8 braços (MISHIMA *et al.*, 2005) e esquiva inibitória (ARTENI *et al.*, 2003) em animais submetidos ao modelo de Levine-Rice. Há evidências de que os déficits observados no labirinto aquático podem, em parte, ser devidos à perda dos neurônios da região CA1 do hipocampo resultante da diminuição do aporte sanguíneo para esta região (NUNN *et al.*, 1994; OLSEN *et al.*, 1994).

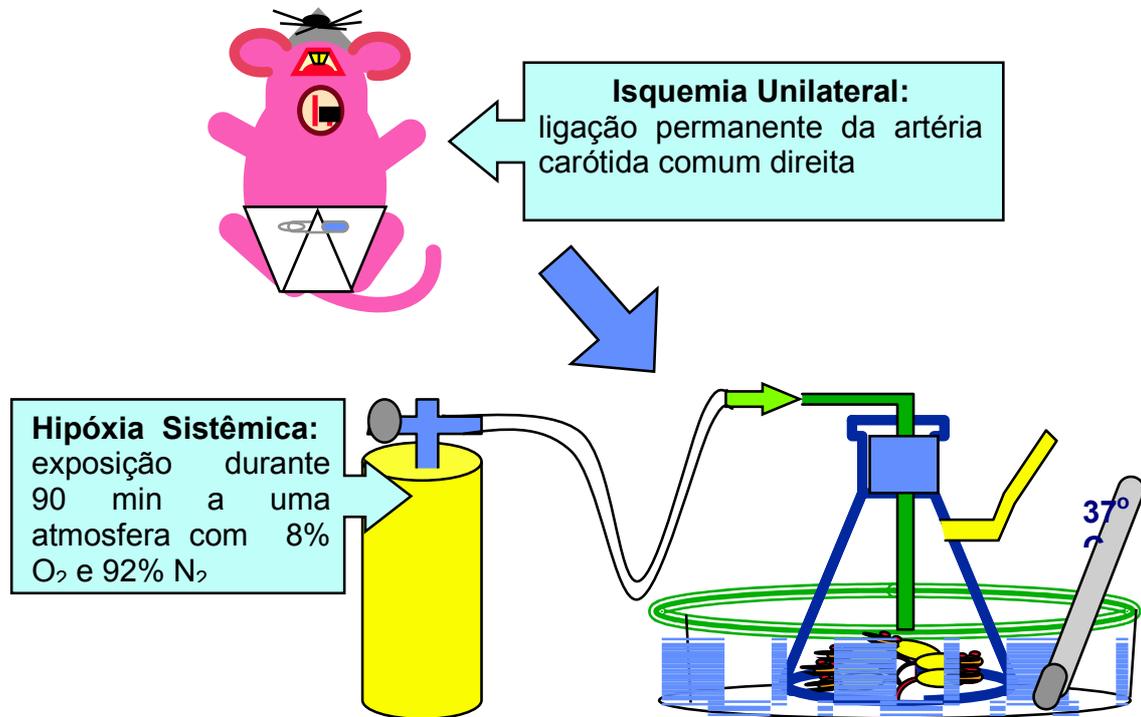


Figura 2 - Procedimento modificado de Levine; que utiliza a combinação de hipóxia e isquemia.

1.3 Enriquecimento Ambiental

É sabido que a estimulação no período neonatal pode afetar o comportamento e as respostas endócrinas, além de ter um efeito positivo sobre o processo de envelhecimento, protegendo o hipocampo da perda neuronal e das disfunções relacionadas à idade (MOHAMMED *et al.*, 1993). No caso da hipóxia-isquemia neonatal, que é acompanhada pela diminuição dos níveis de receptores de glicocorticóides no hipocampo, a estimulação tátil nas primeiras semanas de vida pós-natal provoca um aumento no número destes receptores em animais adultos (MEANEY

& AITKEN, 1985), estimula a neurogênese hipocampal pós-natal (WARSHLAK & WEINSTOCK, 1990) e previne a atrofia hipocampal (RODRIGUES *et al.* 2004). Por outro lado, no caso da isquemia cerebral em animais adultos, diversas alterações hipocampais adaptativas têm sido encontradas, tais como, re-estruturação dendrítica (BIERNASKI & CORBETT, 2001), sinaptogênese reativa (HOMER *et al.*, 1996) e neurogênese aumentada (YAGITA *et al.*, 2001), evidenciando a presença de uma plasticidade sináptica estimulada pelo dano encefálico. Estas mudanças, segundo Briones e colaboradores (2004), podem sinalizar que o encéfalo lesado tornar-se mais sensível aos efeitos de um treino comportamental, visto que já experienciou mudanças adaptativas prévias. No dano pela HI neonatal, talvez, este mesmo efeito possa também ocorrer, o que justifica em parte, a importância da estimulação comportamental precoce.

O enriquecimento ambiental (EA) é definido como uma combinação de interação social, exercícios físicos e exposição continuada a “possibilidades de aprendizagem” que, segundo Krech e colaboradores (1960), pode alterar a estrutura e função do encéfalo de roedores. Na literatura, o ambiente enriquecido tem sido referido a condições de moradia em caixas ou câmaras exploratórias, onde há a facilitação da estimulação sensorial, cognitiva e motora (vide Figura 3; NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006). Para isto, são utilizadas caixas-moradia maiores do que as caixas-padrão de laboratório, o número de animais mantidos no ambiente enriquecido também é maior e ainda, objetos para exploração e outros que possibilitem atividade física (rodas, rampas) fazem parte do ambiente enriquecido. Em estudos com animais com dano encefálico, a exposição ao enriquecimento ambiental pode desempenhar papel

importante na plasticidade neuronal hipocampal e, também, melhorar as funções cognitivas afetadas (VAN PRAAG *et al.*, 2000).

O protocolo da estimulação por EA é variável. Geralmente, há variações no tamanho das caixas, na composição, duração, complexidade social e de estímulos por objetos, e na frequência da troca de objetos. Alguns trabalhos utilizam a manutenção permanente dos animais no ambiente enriquecido após um evento isquêmico, enquanto outros também utilizam a estimulação prévia (BIERNASKIE & CORBETT, 2001; BELAYEV *et al.*, 2003). Ainda, existem estudos que utilizam a manutenção permanente no ambiente, enquanto outros utilizam um protocolo de estimulação durante um determinado período do dia (RAMPON *et al.*, 2000; Frick & FERNANDES, 2003; GOBBO & MARA, 2004). Esta variedade de protocolos de estimulação acaba por dificultar a discussão e a comparação dos efeitos do enriquecimento ambiental sobre os mais diversos aspectos avaliados (BENNETT *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que o córtex cerebral de animais acondicionados em um ambiente enriquecido apresenta maior espessura, em comparação com animais que vivem em condições padrão. Este efeito cortical pode ocorrer por inúmeros fatores, dentre eles, aumento do soma neuronal, do número e comprimento dos dendritos, bem como do número de espinhas dendríticas (DIAMOND *et al.*, 1964). Recentemente, estes achados foram corroborados por estudos que demonstram que o EA pode influenciar a recuperação após um evento isquêmico, induzindo mudanças estruturais no córtex contralateral, com aumento na densidade dos espinhos dendríticos e do número de neurônios no giro denteado (HOHANSSON, 1996; TUOR *et al.*, 2001, PUURUNEN *et al.*, 2001, JOHANSSON & BELLCHENKO, 2002).

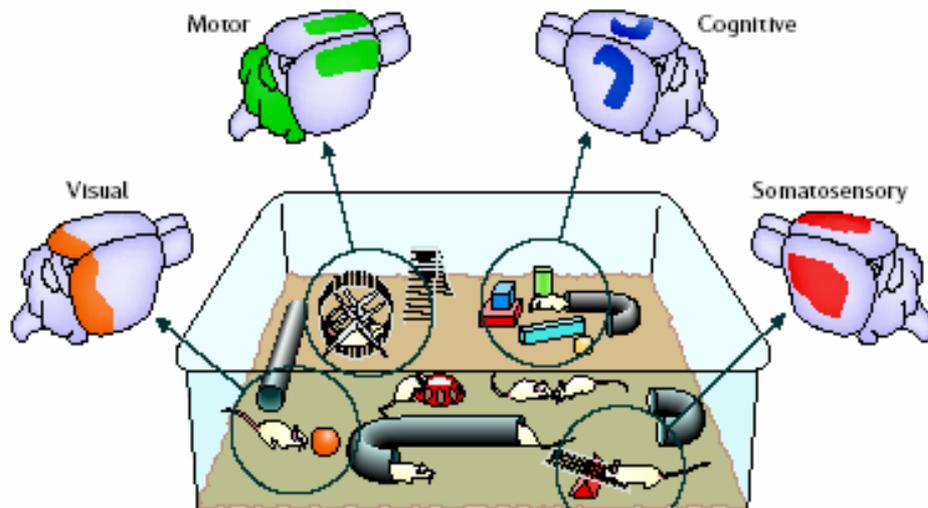


Figura 3 – Esquema ilustrando os efeitos sensoriais, cognitivos, motores e sociais da exposição de ratos ao ambiente enriquecido (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006).

Belayev e colaboradores (2003) verificaram que ratos expostos a um EA por duas semanas antes e 6 dias após um evento isquêmico mostraram maior preservação das células piramidais da região CA1 do hipocampo em relação a animais não expostos ao EA. Outro estudo demonstrou que os neurônios piramidais das camadas II e III do córtex do hemisfério não lesado em ratos isquêmicos expostos ao EA apresentavam maior número de espinhas dendríticas, em comparação com animais mantidos em um ambiente padrão (JOHANSSON & BELICHENKO, 2002).

O EA também pode causar mudanças neuroquímicas. Em estudo recente foi verificado que o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) teve seus níveis aumentados em ratos que viveram em um ambiente enriquecido, comparando-se com animais que viveram em condições padrão (GOBBO & O'MARA, 2004). Os fatores neurotróficos controlam as vias de sinalização intra e intercelular que formam os

circuitos neuronais durante o desenvolvimento e regulam a plasticidade bem como a sobrevivência neuronal, o crescimento axonal e a neurotransmissão no encéfalo adulto (MATTSON *et al.*, 2004).

O BDNF tem sido proposto como importante fator relacionado com os efeitos neuroprotetores do EA. Está bem estabelecido na literatura que ocorre um aumento dos níveis de BDNF após um período de estimulação em ambiente enriquecido (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006; ZHU *et al.*, 2006). Tem-se ainda evidenciado a íntima relação da neurogênese hipocampal com os níveis de BDNF (Rossi *et al.*, 2006). Além das alterações estruturais e funcionais do encéfalo, a estimulação ambiental é também considerada importante para atenuar déficits cognitivos e preservar a integridade tecidual após lesão cerebral em ratos (PASSINEAU *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado que ratos mantidos em um ambiente enriquecido após evento isquêmico tiveram melhor aquisição no teste do labirinto aquático de Morris após um período de ambientação (PUURUNEN *et al.*, 1997, PUURUNEN *et al.*, 2001, JOLKKONEN *et al.*, 2003, BRIONES *et al.*, 2000) além de apresentarem melhor performance no labirinto radial (LEGGIO *et al.*, 2005), e no labirinto radial motivado pelo escape da água (BENNETT *et al.*, 2005).

Existem também evidências da interação entre os efeitos protetores do enriquecimento ambiental e o estresse oxidativo. Um estudo relacionou a melhora cognitiva e motora em ratos velhos pelo enriquecimento com a simultânea diminuição do estresse oxidativo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2004). Este resultado sugere mais um possível mecanismo de ação do enriquecimento ambiental.

Ainda, o aumento dos níveis de sinaptofisina foi relatado juntamente com recuperação da memória em ratos velhos mantidos em ambiente enriquecido (FRICK & FERNANDEZ, 2003). A sinaptofisina é uma proteína pré-sináptica ligante de cálcio localizada nas membranas das vesículas pré-sinápticas que contêm neurotransmissores. Reduções nos níveis de sinaptofisina têm sido associadas ao dano cognitivo pelo envelhecimento e também em quadros neuropatológicos (LIU *et al.*, 1996).

1.4 Hipóxia-isquemia e intervenções comportamentais/ambientais

Alguns estudos avaliaram o impacto de experiências precoces sobre a função cognitiva e as respostas comportamentais ao estresse em animais que passaram por um insulto biológico. O primeiro deles, que investigou o efeito de intervenções comportamentais em animais hipóxico-isquêmico, foi publicado em 2002 (FERNÁNDEZ-TERUEL *et al*). Entre as conclusões desse trabalho, ressalta-se o efeito cognitivo benéfico nos animais hipóxico-isquêmicos submetidos à separação de curto período durante o período neonatal. Um trabalho recente do nosso grupo de pesquisa analisou o efeito morfológico de um outro tipo de manipulação, a estimulação tátil, em ratos HI. A estimulação tátil por um período de 10 minutos do oitavo ao vigésimo primeiro dia pós-natal resultou em recuperação da atrofia hipocampal consequente à HI (Figura 4; RODRIGUES *et al*, 2004).

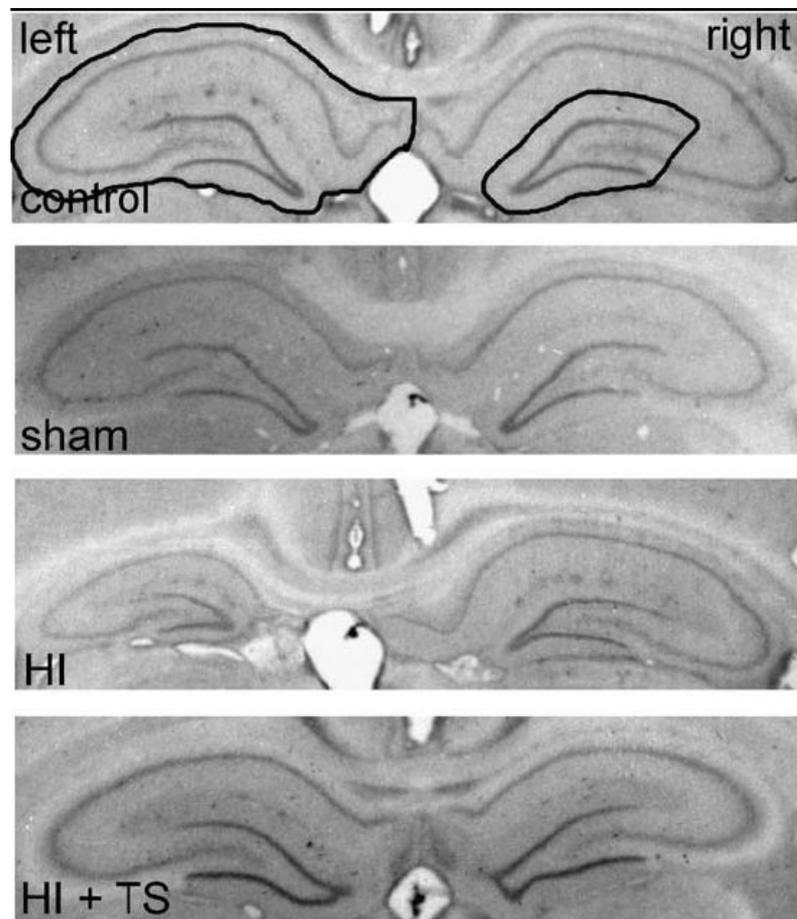


Figura 4 – Sessões coronais representativas do efeito da HI e da estimulação tátil (TS). É possível observar a recuperação da atrofia hipocampal pela TS (HI+ST) em comparação com o grupo de animais não estimulados –HI (modificado de RODRIGUES *et al.*, 2004).

Há também um bom número de trabalhos acerca dos efeitos do EA sobre o dano encefálico isquêmico em modelos animais adultos (JOHANSON, 1996; GOBBO & MARA, 2004). Porém, para nosso conhecimento, não existem estudos verificando o papel deste tipo de estímulo ambiental sobre um dano encefálico causado por um evento hipóxico-isquêmico neonatal. A proporção que se estabelece em relação ao número de estudos com dano isquêmico no adulto e a HI neonatal não é diretamente

proporcional à incidência e a morbi-mortalidade desta patologia, visto que nascem, ainda hoje, muitas crianças que sofrem por toda a vida as conseqüências do dano encefálico isquêmico perinatal.

Logo, nesta Tese decidimos investigar as conseqüências da estimulação pelo enriquecimento ambiental em animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal. Considerando-se a abordagem que será utilizada neste estudo, a **hipótese de trabalho** é que o enriquecimento ambiental poderá causar efeitos neuroprotetores cognitivos e morfológicos sobre as conseqüências deletérias da hipóxia-isquemia. Alguns dos possíveis mecanismos relacionados com os efeitos supracitados serão investigados, com o intuito de contribuir para o conhecimento dos aspectos moleculares e funcionais envolvidos na estimulação ambiental.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é verificar o efeito de distintos protocolos de enriquecimento ambiental sobre: (1) memória espacial, (2) memória de reconhecimento, (3) morfologia encefálica, (4) estado oxidativo e (5) níveis de BDNF hipocampal, em ratos submetidos a um evento hipóxico-isquêmico no período neonatal.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Analisar, no período adulto, o comportamento no labirinto aquático de Morris e mensurar o volume hipocampal e a área cortical de ratos machos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal e estimulados em ambiente enriquecido diariamente, duas semanas após a HI, durante 9 semanas;

2.2.2 Avaliar, nos períodos da adolescência e da vida adulta, o comportamento no teste de reconhecimento de objetos e no labirinto aquático de Morris e analisar o volume hipocampal e a área estriatal de ratos machos e fêmeas submetidos à hipóxia-isquemia neonatal e mantidos em ambiente enriquecido do oitavo ao trigésimo dia de vida pós-natal;

2.2.3 Mensurar, no período adulto, alguns parâmetros de estresse oxidativo e de BDNF em hipocampo e córtex de ratos machos submetidos à HI neonatal e estimulados em ambiente enriquecido diário, desde o desmame até a idade adulta.

3 RESULTADOS

Os resultados desta Tese serão apresentados na forma de artigos que relatam os experimentos relacionados aos objetivos específicos.

3.1 Capítulo 1 (Objetivo 2.2.1)

“Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat.”

(Pereira, L. O., Arteni, N. S., Petersen, R. C., Da 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)

3.2 Capítulo 2 (Objetivo 2.2.2)

“Effects of early environmental housing after hypoxia ischemia in the neonatal rat.”

Lenir Orlandi Pereira, Atahualpa Cauê Paim Strapasson, Patrícia Machado Nabinger, Matilde Achaval, Carlos Alexandre Netto

(a ser submetido para publicação)

3.3 Capítulo 3 (Objetivo 2.2.3)

“Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia-ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex.”

Lenir Orlandi Pereira, Patrícia Nardin, Patrícia Machado Nabinger, Atahualpa Cauê Paim Strapasson, Carlos Alberto Saraiva Gonçalves, Ionara Rodrigues Siqueira^{1,3}, Carlos Alexandre Netto

(a ser submetido para publicação)

4 DISCUSSÃO GERAL

Esta tese teve como objetivo geral estudar as conseqüências do enriquecimento ambiental sobre parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos apresentados após um evento hipóxico-isquêmico no período neonatal em ratos. O enfoque comportamental é voltado para a memória, por ser esta uma importante função encefálica que permite ao indivíduo se adaptar ao ambiente, construir sua própria história e, por último, fazer parte e construir a cultura de uma população (BENFENATI, 2007). Além disso, é consenso na literatura vigente que o déficit mnemônico é uma das principais conseqüências cognitivas da encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal, tanto em humanos, quanto em modelos animais (WANG *et al.*, 2002; MANERU *et al.*, 2003). Já no que tange às alterações morfológicas, foi realizado um estudo da extensão da lesão em estruturas vulneráveis à HI, as quais também são relacionadas com a neurobiologia da memória. O hipocampo é o principal objeto de estudo, pois se apresenta como alvo primeiro da lesão hipóxico-isquêmica. Esta suscetibilidade é mais seletiva às células do Corno de Amon, principalmente os neurônios piramidais da área CA1 hipocampal (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991; GEE *et al.*, 2006). O córtex e o estriado também foram estudados, pela estreita relação que têm com a formação da memória e por serem estruturas encefálicas que igualmente sofrem dano pela HI. Na seqüência do estudo morfológico, hipocampo e córtex também foram analisados sob o aspecto bioquímico. O dano oxidativo, apontado como um dos principais mecanismos de dano celular pela HI (MCLEAN & FERRIERO, 2004), e os níveis de BDNF, citado como mediador das conseqüências do enriquecimento ambiental, (ROSSI *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2006;) foram os parâmetros bioquímicos definidos para serem avaliados nesta tese.

A apresentação da estimulação por enriquecimento ambiental como estratégia para a recuperação dos efeitos deletérios da HI vem motivada pelos consistentes resultados neuroprotetores desta estimulação sobre outras neuropatologias. Estudos recentes têm indicado efeito benéfico do EA especialmente sobre o prejuízo funcional e alterações morfológicas pelo envelhecimento, e também em modelos de isquemia no adulto e doenças neurodegenerativas em roedores (JOHANSSON, 2004; COSTA, 2007; MORA *et al.*, 2007). Ainda, a estimulação ambiental tem sido apontada como fator importante na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas em humanos (BRIONES, 2006).

Efeito cognitivo da estimulação diária no ambiente enriquecido, com início 2 semanas após a hipóxia-isquemia neonatal em ratos adultos.

No primeiro experimento, a exposição (1h/dia) no ambiente enriquecido, iniciada 2 semanas após a HI e mantida por 9 semanas, resultou na prevenção do prejuízo na memória de referência e na memória de trabalho de ratos adultos hipóxico-isquêmicos, observadas no labirinto aquático de Morris. O déficit mnemônico encontrado como seqüela da HI corrobora os dados previamente publicados por Ikeda e colaboradores (2001), Arteni e colaboradores (2003) e MCAULIFFE e colaboradores (2006), os quais demonstraram que roedores submetidos à hipóxia-isquemia neonatal apresentaram pior performance no labirinto radial, na esquiiva inibitória e labirinto aquático de Morris, respectivamente. Por outro lado, o resultado referente à recuperação cognitiva pelo EA após um evento hipóxico-isquêmico é o primeiro a ser publicado na literatura vigente consultada. Existem, porém, estudos demonstrando os efeitos benéficos do ambiente enriquecido sobre os prejuízos comportamentais

conseqüente a eventos isquêmicos em animais adultos, ou mesmo, comparando-se a performance de animais controle com animais enriquecidos (PUURUNEN *et al.*, 2001;LEGGIO *et al.*, 2005).

Efeito morfológico da estimulação diária no ambiente enriquecido, com início 2 semanas após a hipóxia-isquemia neonatal em ratos adultos.

O efeito morfológico da hipóxia-isquemia neonatal foi encontrado pela avaliação do volume hipocampal analisado através da utilização do método de Cavalieri. Este método foi idealizado pelo matemático Bonaventura Cavalieri e é conhecido como “princípio de Cavalieri” (MANDARIN-DE-LACERDA, 1995). Ele propôs cortar um objeto por planos de cortes paralelos com uma espessura conhecida e medir as áreas dos cortes do objeto. A soma das áreas multiplicada pela espessura estima, sem viés, o volume do objeto independentemente da forma do objeto e da orientação dos cortes. O achado, pela mensuração do volume do hipocampo, foi uma atrofia desta estrutura em toda a sua extensão no hemisfério ipsilateral à oclusão arterial (Capítulo 1). E ainda, estudos prévios, tanto do nosso grupo de pesquisa quanto de outros grupos, já haviam indicado este efeito em decorrência da encefalopatia hipóxico-isquêmica (RODRIGUES *et al.*, 2004; MISHIMA *et al.*, 2005). Além do hipocampo, observou-se dano no córtex dos animais submetidos à HI, em comparação com os animais não-isquêmicos.

A hipótese de trabalho referente ao efeito do enriquecimento ambiental sobre a extensão da lesão encefálica, especificamente hipocampo, córtex e estriado, não foi confirmada. Ficou claro que a exposição dos animais ao ambiente enriquecido, 1 hora por dia, 2 semanas após a HI, não resultou em proteção morfológica das estruturas analisadas, no que se refere à extensão do dano tecidual. Ressalta-se aqui, o fato de

que este dado é apresentado como uma ausência de efeito sobre o volume da lesão tecidual e não sobre um efeito morfológico generalizado. Outrossim, acredita-se na possibilidade de existência de alterações morfológicas, por exemplo, sabe-se que o aumento no número de espinhos dendríticos pode resultar da estimulação ambiental, sem necessariamente evitar a atrofia de determinada estrutura (LEGGIO *et al.*, 2005). Outros estudos envolvendo as conseqüências do EA não encontraram efeito benéfico nas variáveis morfológicas investigadas. Farrel e colaboradores (2001) encontraram maior morte celular na região CA1 após estimulação por EA e Gobbo e Mara (2004) indicaram que o EA não protegeu a morte celular em CA1 após a isquemia global. Neste trabalho, o que pode ter contribuído para a não identificação do efeito morfológico estudado foi o fato da estimulação pelo enriquecimento ambiental ter iniciado “tardiamente”. Porém, a palavra “tardio” perde seu sentido no momento em que observa-se uma evidente recuperação cognitiva pós-lesão. Ao contrário, é importante ressaltar o achado de que não obstante o enriquecimento ambiental tenha começado 2 semanas após a HI, foi possível seu efeito neuroprotetor. Este se torna um resultado importante na medida em que é identificada uma janela terapêutica de até 2 semanas para a implementação de uma estratégia de recuperação da encefalopatia hipóxico-isquêmica. O conceito de janela terapêutica, na clínica, assume importante papel devido a sua importância para a efetividade de uma estratégia de tratamento (AMATO & DONATI, 2000).

O Capítulo 2 apresenta-se como uma continuação do primeiro experimento e vem responder à seguinte questão: se a estimulação no ambiente enriquecido tivesse início precoce, na seqüência da HI, seria identificado o efeito morfológico do EA sobre a

atrofia hipocampal? Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da manutenção de ratos e ratas em um ambiente enriquecido, iniciando no dia seguinte à HI, sobre a memória e a morfologia encefálica.

Efeito cognitivo da estimulação contínua no ambiente enriquecido, com início 1 dia após a hipóxia-isquemia neonatal em ratas e ratos adolescentes e adultos.

No Capítulo 2 foram avaliadas também a memória de reconhecimento de objetos e a memória espacial durante o período da adolescência, permitindo assim uma análise temporal/evolutiva do comportamento dos animais. Os resultados deste experimento confirmam tanto a presença do déficit cognitivo quanto da atrofia hipocampal consequente à HI, observados no Capítulo 1. Tanto no período da adolescência quanto na vida adulta houve prejuízo de memória espacial, bem como de reconhecimento de objetos na adolescência. Um outro estudo já havia analisado a memória de animais 7 e 16 semanas após o evento hipóxico-isquêmico, onde foi relacionado o aumento do dano encefálico com o agravamento do prejuízo cognitivo ao longo dessas semanas (MISHIMA *et al.*, 2005). Quanto ao dano morfológico, a atrofia hipocampal foi evidente nos animais submetidos à HI, assim como o dano ao estriado.

Ao observar-se o efeito do enriquecimento ambiental, percebe-se uma clara recuperação do déficit cognitivo observado na memória de reconhecimento de objetos, tanto nas ratas quanto nos ratos hipóxico-isquêmicos. No entanto, não foi tão evidente o efeito do EA sobre a memória espacial: na adolescência, as fêmeas HI apresentaram recuperação do déficit de memória de trabalho no labirinto aquático e, na vida adulta, este efeito foi encontrado nos machos.

Efeito morfológico da estimulação contínua no ambiente enriquecido, com início 1 dia após a hipóxia-isquemia neonatal em ratas e ratos adolescentes e adultos.

Confirmando o resultado apresentado no Capítulo 1, também neste estudo não foi encontrado efeito neuroprotetor do enriquecimento ambiental sobre a atrofia hipocampal. Da mesma forma, o dano ao estriado não foi amenizado pela estimulação. Ratifica-se então o resultado de que o efeito cognitivo do EA não está relacionado à prevenção/recuperação da extensão do dano tecidual ao hipocampo, córtex e estriado. Além da possibilidade de existirem outras conseqüências morfológicas do EA, seu efeito cognitivo pode estar vinculado a mudanças bioquímicas e fisiológicas encefálicas. Aumento da densidade de receptores glutamatérgicos e aumento dos níveis de sinaptofisina são algumas das alterações que acompanham a recuperação funcional pelo EA (JOLKKONEN *et al.*, 2003; LAMBERT *et al.*, 2005), ambas relacionadas com aumento da neurotransmissão e plasticidade. Ickes e colaboradores (2000) demonstraram um aumento nos níveis das neurotrofinas, fator de crescimento neuronal (NGF) e BDNF, no córtex e hipocampo de animais mantidos em ambiente enriquecido. E, ainda, Fernández e colaboradores (2004) apresentaram resultados associando os efeitos cognitivos e motores do EA com a diminuição do estresse oxidativo pelo envelhecimento.

É consensual o fato da estimulação ambiental resultar em efeitos benéficos após um evento isquêmico, por ocasião de uma doença neurodegenerativa ou mesmo na prevenção dos déficits cognitivos do envelhecimento. Porém, há que se ressaltar que os mecanismos neurobiológicos que medeiam as conseqüências desta estimulação são minimamente conhecidos. De encontro com esta afirmação, reconhece-se que

embora de grande importância clínica, a encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal carece do desenvolvimento de opções terapêuticas, tanto na área reabilitação quanto no âmbito farmacológico. Então, o conhecimento dos mecanismos relacionados com os efeitos cognitivos do enriquecimento ambiental poderia apresentar-se como importante opção terapêutica também em estudos com humanos.

Efeitos da hipóxia-isquemia neonatal e do enriquecimento ambiental diário sobre o estado oxidativo e os níveis de BDNF em hipocampo e córtex de ratos adultos.

O objetivo do Capítulo 3 foi investigar se os níveis de BDNF e/ou o estado oxidativo estão correlacionados com a neuroproteção funcional em hipocampo e córtex de ratos machos hipóxico-isquêmicos. Estes dois procedimentos experimentais foram realizados a partir das estruturas encefálicas de animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal no 7º dia de vida pós-natal e estimulados em ambiente enriquecido a partir do desmame, durante 9 semanas (1h/dia). Cabe ressaltar que o procedimento de estimulação utilizado neste estudo foi o mesmo utilizado no Capítulo 1. Esta opção foi feita devido ao fato de que o efeito neuroprotetor cognitivo foi melhor evidenciado nos animais mantidos no enriquecimento diário, mesmo que iniciado 2 semanas após a HI. A partir desta observação, os achados bioquímicos observados aqui relacionam-se diretamente com o efeito cognitivo do EA apresentado no primeiro experimento desta tese. Então, para os experimentos do Capítulo 3, o sacrifício dos animais aconteceu aproximadamente 24 horas após o fim do período de enriquecimento porque foi este o momento no qual os animais tiveram seu comportamento observado (Capítulo 1) e, ainda, para permitir uma avaliação, na totalidade, das conseqüências do período de enriquecimento. Os níveis de BDNF foram similares no córtex e hipocampo esquerdo.

No entanto, ocorreu um aumento significativo de BDNF no hipocampo direito dos animais hipóxico-isquêmicos mantidos em ambiente padrão. Chama-se a atenção ao fato de que os animais HI estimulados no ambiente enriquecido tiveram semelhantes níveis de BDNF, comparando-se com os animais dos grupos controle.

O fator neurotrófico derivado do encéfalo é apontado como importante neuroprotetor. Além de ter seus níveis aumentados em consequência a eventos isquêmicos (PLOUGHMAN *et al.*, 2007), a administração de BDNF é indicada como estratégia terapêutica para esses eventos (AMLI *et al.*, 2000). Conseqüências morfológicas e cognitivas são abordagens comuns nos estudos envolvendo as funções do BDNF. Melhor performance no labirinto aquático de Morris e maior sobrevivência das células piramidais da região CA1 hipocampal são algumas delas (GOBBO & MARA, 2004). A hipótese envolvendo os efeitos cognitivos do enriquecimento ambiental vem pautada nesses dados; sendo assim, esperava-se um aumento nos níveis de BDNF nos grupos estimulados. Surpreendentemente, os resultados indicaram um aumento de BDNF apenas no grupo hipóxico-isquêmico mantido em ambiente padrão. Analisando conjuntamente os resultados do Capítulo 1 com os do Capítulo 3, temos um aumento de BDNF relacionado com um déficit mnemônico (grupo HI não-estimulado) e uma recuperação cognitiva da HI associada a níveis padrão de BDNF em córtex e hipocampo (grupo HI enriquecido). Esta análise destaca uma correlação inversa do BDNF com a cognição, porém este não é o primeiro trabalho a encontrar este resultado. Koh e colaboradores (1995) administraram BDNF como pré-tratamento para a privação de oxigênio e glicose em cultura de neurônios e encontraram uma potencialização da morte celular por necrose. E também, pré-tratamento com BDNF potencializou a

neurodegeneração induzida por NMDA (PREHN, 1996). O mecanismo proposto para os efeitos deletérios do BDNF inclui a ativação de canais de sódio, os quais induzem a liberação de íons Ca^{2+} do retículo endoplasmático via receptor trkB (Blum et al., 2002; Rose et al., 2003). Isto posto, é possível concluir que o efeito cognitivo do enriquecimento ambiental parece não ser mediado por um aumento nos níveis de BDNF, nem no hipocampo, nem no córtex frontal em animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal. Por outro lado, o aumento nos níveis desta neurotrofina apenas no grupo hipóxico-isquêmico mantido em ambiente padrão não descarta a relação da neuroproteção cognitiva do EA com o BDNF. Este resultado é um forte indicativo para a motivação de novos estudos incluindo esta temática.

A partir disto, apresenta-se na próxima sessão desta tese a avaliação do estado oxidativo do hipocampo e córtex como possível mediador do efeito funcional do enriquecimento ambiental.

Também como parte do Capítulo 3, realizou-se a quantificação da formação de radicais livres, a medida dos níveis de lipoperoxidação pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, a medida dos níveis de dano em proteínas pela medida tióis total e a medida da atividade da superóxido dismutase, como medida da atividade antioxidante dos tecidos avaliados em hipocampo e córtex de ratos machos adultos submetidos à hipóxia-isquemia no período neonatal. Os principais achados deste estudo foram um aumento na quantidade de DCF formado no hipocampo dos animais HI e no córtex dos animais não estimulados; um aumento da lipoperoxidação pelo enriquecimento ambiental no hipocampo esquerdo e, ainda, aumento da atividade da

SOD no hipocampo ipsilateral e diminuição desta atividade nos grupos mantidos em ambiente padrão no hipocampo contralateral à isquemia.

Os resultados acima citados não permitem uma exata conclusão de alterações específicas pela hipóxia-isquemia neonatal ou pelo enriquecimento ambiental. Esta observação a longo prazo, em considerando o evento hipóxico-isquêmico, possivelmente é influenciada pela adaptação, especialmente do sistema celular antioxidante. Os mecanismos de defesa antioxidante envolvem: defesa enzimática com a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase; e os antioxidantes não-enzimáticos, dentre eles o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (Vitamin E), os carotenóides e os flavonóides. (VALKO *et al.*, 2007). O desequilíbrio na relação quantidade de radicais livres produzidos e atividade antioxidante de um tecido é que pode ter importante papel no dano celular. No presente estudo, um aumento de DCF formado, ou seja um aumento na produção de radicais livres, no córtex de animais HI não estimulados pode indicar uma ineficácia na atividade do sistema antioxidante da estrutura encefálica estudada. Sendo assim, pode-se sugerir que, mesmo 3 meses depois de um evento hipóxico-isquêmico, sinais de dano oxidativo podem ser apontados no encéfalo de roedores. Este dado se relaciona diretamente com o resultado do Capítulo 1, no qual o enriquecimento ambiental iniciado somente 2 semanas após a HI, foi efetivo em recuperar e/ou prevenir o prejuízo cognitivo; se o dano encefálico por estresse oxidativo pode perdurar por longos períodos após a HI, uma estimulação, ainda que “tardia” pode ser efetiva na recuperação de suas conseqüências.

As medidas de lipoperoxidação não sofreram diferença pela HI, nem no hipocampo nem no córtex dos animais estudados. No entanto, foi observado um surpreendente efeito do enriquecimento no sentido de aumentar os níveis de TBARS no hipocampo contralateral. Este aumento na lipoperoxidação pode apontar um efeito deletério da estimulação sobre o encéfalo acometido pela HI, visto que a lipoperoxidação indica a degradação dos lipídeos das membranas celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Um estudo prévio também encontrou aumento da morte celular em CA1 hipocampal relacionado ao enriquecimento ambiental (FARREL *et al.*, 2001). Porém, a grande maioria dos estudos publicados aponta o efeito protetor do enriquecimento ambiental (JOHANSSON, 2004; LEGGIO *et al.*, 2005). São necessários mais estudos para permitir uma discussão mais conclusiva da possível participação da estimulação ambiental no aumento dos níveis de estresse oxidativo.

A superóxido dismutase é uma importante enzima participante do sistema de defesa antioxidante. Existem dois tipos principais: SOD1, dependente de cobre e zinco, presente no citoplasma das células, SOD2, dependente de manganês, na mitocôndria, e recentemente foi identificada uma SOD3, cobre-dependente, localizada no espaço extracelular (VALKO *et al.*, 2007). A SOD catalisa a dismutação do superóxido em H_2O_2 . No Experimento 3, foi encontrado aumento da atividade da SOD no hipocampo ipsilateral e no hipocampo contralateral nos grupos mantidos em ambiente padrão. Ambos os resultados corroboram trabalhos publicados anteriormente. Bidmon e colaboradores (1998) utilizaram um modelo de fototrombose focal, em ratos, e encontraram um aumento da SOD2 30 e 60 dias após a fototrombose. Ainda, Candelario-Jalil e colaboradores (2001) encontraram aumento da SOD2 até 72 horas

após isquemia cerebral transitória. O aumento da superóxido dismutase sugere que a produção de superóxido pode ser mantida em níveis acima do normal por longo período após um evento neuropatológico. Os resultados deste estudo confirmam o papel do estresse oxidativo no dano tecidual em animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal e apresentam evidências de que o status oxidativo dos tecidos acometidos pode manter-se alterado até mesmo meses após a HI.

Foi encontrado, também, um aumento na atividade da SOD no hipocampo contralateral à isquemia nos animais não-estimulados. Em contrapartida, um estudo demonstrou que o tratamento combinado do enriquecimento ambiental com uma dieta antioxidante foi efetivo em aumentar a atividade da SOD e de outras enzimas antioxidantes (OPII *et al.*, 2007).

Não foram encontradas diferenças na medida de tióis totais no hipocampo e córtex dos animais em estudo. Porém um estudo prévio encontrou uma diminuição nos níveis de tióis 150 minutos após a HI neonatal (DAFRÉ *et al.*, 2003). Esta discrepância entre os resultados está provavelmente relacionada com a considerável diferença no momento de sacrifício de animais entre o estudo citado e o experimento desta tese.

Por fim, pode-se verificar que não é claro o papel do estresse oxidativo e os níveis de BDNF como mediadores da resposta cognitiva em animais hipóxico-isquêmicos estimulados em ambiente enriquecido. Outros estudos são necessários para a identificação de possíveis mecanismos que atuem como mediadores da resposta funcional do enriquecimento ambiental após um evento isquêmico.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta Tese permitem concluir que:

O enriquecimento ambiental diário, iniciado duas semanas após a hipóxia-isquemia encefálica neonatal, resultou na recuperação do prejuízo na memória espacial sem alterar a atrofia hipocampal e o dano cortical em ratos adultos;

O enriquecimento ambiental realizado após a hipóxia-isquemia encefálica neonatal, mantido do oitavo ao trigésimo dia pós-natal, reverteu o déficit na memória de reconhecimento de ratos e ratas adolescentes, e o prejuízo na memória de trabalho em ratas adolescentes; porém este protocolo de enriquecimento não resultou em proteção morfológica em relação à extensão da atrofia hipocampal e da lesão estriatal;

A hipóxia-isquemia neonatal aumentou os níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo – BDNF - no hipocampo ipsilateral à oclusão arterial, medido 24 após o final do período de enriquecimento, sem causar alterações no córtex frontal;

O efeito cognitivo do enriquecimento ambiental diário parece não estar relacionado com os altos níveis de BDNF em hipocampo e córtex frontal, conforme a hipótese de trabalho sugeria;

Os dados sugerem que o enriquecimento ambiental reverte o aumento nos níveis de BDNF induzidos pela hipóxia-isquemia neonatal;

A hipóxia-isquemia resultou em aumento na atividade da superóxido dismutase, efeito este parcialmente revertido pelo enriquecimento ambiental;

O enriquecimento ambiental não alterou os níveis de radicais livres nem o dano oxidativo em lipídios.

6 PERSPECTIVAS

Investigar outras variáveis morfológicas que possam ser influenciadas pelo enriquecimento ambiental, tais como arborização dendrítica e densidade de espinhos dendríticos nos hipocampos dos animais submetidos à hipóxia-isquemia;

Avaliar o efeito temporal do enriquecimento ambiental sobre os níveis de BDNF, ou seja, no início e durante o período de estimulação, buscando possível relação deste com os níveis desta neurotrofina;

Examinar a relação entre as alterações induzidas pelo enriquecimento ambiental em animais HI e os níveis de sinaptofisina hipocampal, por ser esta uma importante proteína para a neurotransmissão;

Analisar outros parâmetros que possam dar maior suporte para o estudo da relação entre o enriquecimento ambiental o estado oxidativo do hipocampo e córtex de ratos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal;

Investigar o efeito do enriquecimento ambiental e da hipóxia-isquemia neonatal, em longo prazo, a atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo energético, tais como a citocromo c oxidase e succinato desidrogenase.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMLI, C. R.; LEVY, T. J.; HAN, B. H.; SHAH, A. R.; GIDDAY, J. M.; HOLTZMAN, D. M. BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental Neurology*, 166: 99-114, 2000.
- AMATO, M.; DONATI, F. Update on perinatal hypoxic insult: mechanism, diagnosis and interventions. *European Journal of Pediatric Neurology*, 4:203-209, 2000.
- 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.
- BENFENATI, F. Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomedica*, 1:58-66, 2007.
- BELAYEV, A.; SAUL, I.; LIU, Y.; ZHAO, W.; GINSBERG, M. D.; VALDES, M. A.; BUSTO, R.; BELAYEV, L. Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, 964: 121-127, 2003.
- BENNETT, J. C.; MCRAE, P. A.; LEVY, L. J.; FRICK, K. M. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85, 139-152, 2005.
- BLUM, R.; KAFITZ, K.W.; KONNERTH, A. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na. *Nature*, 419, 687-693, 2002.
- BERGER, R.; GARNIER, Y. Patophysiology of perinatal brain damage. *Brain Research Reviews*, 30: 107-134, 1999.
- BIERNASKIE, D.; CORBETT, D. Enriched rehabilitation training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *Journal of Neuroscience*, 21: 5272-80, 2001.
- BRIONES, T. L. Environment, physical activity, and neurogenesis: implications for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 3:49-54, 2006.
- BRIONES, T. L.; SUH, E.; JOZSA, L.; HATTAR, H.; CHAI, J.; WADOWSKA, M. Behaviorally-induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia. *Brain Research*, 997: 137-146, 2004.
- BRIONES, T. L.; THERRIEN, B.; METZGER, B. Effects of environment on enhancing functional plasticity following cerebral ischemia. *Biological Research for Nursing*, 1: 299-309, 2000.
- CADENAS, E; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29: 222-230, 2000.
- COSTA, D. A.; CRACCHIOLO, J. R.; BACHSTETTER, A. D.; HUGHES, T. F.; BALES, K. R.; PAUL, S. M.; MERVIS, R. F.; ARENDASH, G. W. POTTER H. Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiology of Aging*, 28: 831-844, 2007.
- DAFRE, A.L.; ARTENI, N. S.; SIQUEIRA, I. R.; NETTO, C. A. Perturbations in the thiol homeostasis following neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats. *Neuroscience Letters*, 345: 65-68, 2003.

- DAHLQVIST, P.; RÖNNBÄCK, A.; RISEDAL, A.; NERGARDH, R.; JOHANSSON, L-M.; SECKL, J. R.; JOHANSSON, B. B.; OLSSON, T. Effects of postischemic environment on transcription factor and serotonin receptor expression after permanent focal cortical ischemia in rats. *Neuroscience*, 119: 643-652, 2003.
- DIAMOND, M. C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R. The effects of an enriched environment on the rat cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 123: 111-119, 1964.
- DURAN, R.; DURAN, R.; ALADAG, N.; VATANSEVER, U.; SUT, N.; ACUNAS, B. The impact of Neonatal Resuscitation Program courses on mortality and morbidity of newborn infants with perinatal asphyxia. *Brain Development*, in press, 2007.
- FARRELL, R.; EVANS, S.; CORBETT, D. Environmental enrichment enhances recovery of function but exacerbates ischemic cell death. *Neuroscience*, 107:585-592, 2001.
- FERNÁNDEZ, C.I.; COLLAZO, J.; BAUZA, Y.; CASTELLANOS, M.R.; LÓPEZ, O. Environmental enrichment-behavior-oxidative stress interactions in the aged rat: issues for a therapeutic approach in human aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019: 53-57, 2004.
- FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; ESCORIHUELA, R. M.; GIL, L.; AGUILAR, R.; STEIMER, T.; TOBEÑA, A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73: 233-245, 2002.
- FERRIERO, D. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Development Neuroscience*, 23: 198-202, 2001
- FRICK, K. M.; FERNANDEZ, S. M. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiology of Aging*, 24: 615–626, 2003.
- GEE, C. E.; BENQUET, P.; RAINETEAU, O.; RIETSCHIN, L.; KIRBACH, S. W.; GERBER, U. NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 23: 2595-2603, 2006.
- GILLBERG, C. Deficits in attention, motor control, and perception: A brief review. *Archives of Disease in Childhood*, 88: 904-910, 2003.
- GOBBO, O. L.; O'MARA, S. M. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behavioral Brain Research*, 152: 231-241, 2004.
- GROW, J.; BARKS, J. D. Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. *Clinical Perinatology*, 29:585– 602, 2002.
- HALLIWELL, B.H. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction? *Annals of Neurology*, 32: 510–515, 1992.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*: Oxford University Press, 3 th ed., 1999.

- HOMER, C. H.; DAVIES, H. A.; BROWN, J.; STEWART, M. G. Reduction in numerical synapse density in chick dorsal hippocampus following transient global ischemia. *Brain Research*, 735: 354-359, 1996.
- ICKES, B.; PHAM, T. M.; SANDERS, L. A.; ALBECK, D. S.; MOHAMMED, A. H.; GRANHOLM, A. C. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental Neurology*, 164: 45-52, 2000.
- IKEDA, T.; MISHIMA, K.; YOSHIKAWA, T.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M.; XIA, Y. X.; IKENOUE, T. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behavioral Brain Research*, 118: 17-25, 2001.
- ITO, U.; SPATZ, M.; WALKER, J. T. J.; KLATZO, I. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. *Acta Neuropathologica*, 32: 29-23, 1975.
- JOHANSSON, B. B. Functional outcome in rats transferred to an enriched environment 15 days after focal brain ischemia. *Stroke*, 27: 324-326, 1996.
- _____. Functional and cellular effects of environmental enrichment after experimental brain infarcts. *Restorative Neurology Neuroscience*, 22:163-174, 2004.
- JOHANSSON, B. B.; BELICHENKO, P. V. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22: 89-96, 2002.
- JOLKKONEN, J.; GALLAGHER, N. P.; ZILLES, K.; SIVENIUS, J. Behavioral deficits and recovery following transient focal cerebral ischemia in rats: glutamatergic and GABAergic receptor densities. *Behavioral Brain Research*, 138: 187-200, 2003.
- KOH, J. Y.; GWAG, B. J.; LOBNER, D.; CHOI, D.W. Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science*, 268: 573-575, 1995.
- KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 53: 509-519, 1960.
- KRISTIAN, T. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium*, 36: 221-233, 2004.
- LAMBERT, T. J.; FERNANDEZ, S. M.; FRICK, K. M. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83: 206-216, 2005.
- LEGGIO, M. G.; MANDOLESI, L.; FREDERICO, F.; SPIRITO, F.; RICCI, B.; GELFO, F.; PETROSINI, L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behavioral Brain Research*, 163: 78-90, 2005.
- LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *American Journal of Pathology*, 36: 1-17, 1960.
- LINDSTROM, K.; LAGERROOS, P.; GILLBERG, C.; FERNELL, E. Teenage outcome after being born at term with moderate neonatal encephalopathy. *Pediatric Neurology*, 35:268-274, 2006.

- LIU, X.; ERIKSON, C.; BRUN, A. Cortical synaptic changes and gliosis in normal aging, Alzheimer's disease and frontal lobe degeneration. *Dementia*, 7: 128–134, 1996.
- MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L.; ROTHMAN, D. L.; SHULMAN, R. G. Energy on demand. *Science*, 283: 496-497, 1999.
- MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. *Métodos quantitativos em morfologia*. Eduerj. Rio de Janeiro. 1995; p. 4-23.
- MANERU, C.; SERRA-GRABULOSA, J. M.; JUNQUE, C.; SALGADO-PINEDA, P.; BARGALLO, N.; OLONDO, M.; BOTET-MUSSONS, F.; TALLADA, M.; MERCADER, J. M. Residual hippocampal atrophy in asphyxiated term neonates. *Journal of Neuroimaging*, 13: 68-74, 2003.
- MATTSON M. P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neuroscience*, 27: 589 –594, 2004.
- 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.
- MCLEAN, C.; FERRIERO, D. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Seminars in Perinatology*, 28: 425-432, 2004.
- MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Development Brain Research*, 22: 301-304, 1985.
- MISHRA, O .P.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Research Bulletin*, 48: 233-238, 1999.
- MISHIMA, K.; IKEDA, T.; AOO, N.; TAKAI, N.; TAKAHASHI, S.; EGASHIRA, N.; IKENOUE, T.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neuroscience Letters*, 376, 194-199, 2005.
- MOHAMMED, A. H.; HENRIKSSON, B. G.; SODERSTRON, S.; EDENDAL, T.; OLSSON, T.; SECKL, J. R. Environmental influences on the cerebral nervous system and their implications for the aging rat. *Behavioral Brain Research*, 52: 183-191, 1993.
- MORA, F.; SEGOVIA, G.; DEL ARCO, A. Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Research Reviews*, no prelo, 2007.
- NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 697-709, 2006.
- NOOR, J. I.; UEDA, Y.; IKEDA, T.; IKENOUE, T. Edaravone inhibits lipid peroxidation in neonatal hypoxic-ischemic rats: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience Letters*, 414: 5-9, 2007.

- NUNN, J. A.; LEPEILLET, E.; NETTO, C. A.; HODGES, H.; GRAY, J. A.; MELDRUM, B. S. Global ischaemia: hippocampal pathology and spacial deficits in the water maze. *Behavioral Brain Research*, 62: 41-54, 1994.
- OLSEN, G. M.; SCHEEL-KRUGER, J.; MOLLER, A.; JENSEN, L. H. Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. *Behavioral Neuroscience*, 108: 681-690, 1994.
- OPII, W. O.; JOSHI, G.; HEAD, E.; MILGRAM, N. W.; MUGGENBURG, B. A.; KLEIN, J. B.; PIERCE, W. M.; COTMAN, C. W.; BUTTERFIELD, D.A.. Proteomic identification of brain proteins in the canine model of human aging following a long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment: Relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, in press, 2007.
- PASSINEAU, M. J.; GREEN, E.J.; DIETRICH, W. D. Theurapeutics effects of environmental enrichment on cognitive function and tissue integrity following severe traumatic brain injury rats. *Experimental Neurology*, 168: 373-384, 2001.
- PLOUGHMAN, M.; GRANTER-BUTTON, S.; CHERNENKO, G.; ATTWOOD, Z.; TUCKER, B. A.; MEAROW, K. M.; CORBETT, D. Exercise intensity influences the temporal profile of growth factors involved in neuronal plasticity following focal ischemia. *Brain Research*, 1150: 207-216, 2007.
- PREHN, J. H. Marked diversity in the action of growth factors on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal degeneration. *European Journal of Pharmacology*, 306: 81-88, 1996.
- PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J. B.; PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals of Neurology*, 11: 491-498, 1982.
- PUURUNEN, K.; JOLKKONEN, J.; SIRVIÖ, J.; HAAPALINNA, A.; SIVENIUS, J. An α_2 -adrenergic antagonist, atipamezole, facilitates behavioral recovery after focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology*, 40: 597-606, 2001.
- PUURUNEN, K.; KOISTINAHO, J.; SIRVIÖ, J.; JOLKKONEN, J.; SIVENIUS, J. Enriched-environment housing increases neuronal Fos-staining in the dentate gyrus after a water maze spatial learning task. *Neuropharmacology*, 40: 440-447, 2001.
- PUURUNEN, K.; SIRVIÖ, J.; KOISTINAHO, J.; MIETTINEN, R.; HAAPALINNA, A.; RIEKKINEN, P.; SIVENIUS, J. Studies on the influence of enriched-environment housing combined with systemic administration of an alpha2-adrenergic antagonist on spatial learning and hyperactivity after global ischemia in rats. *Stroke*, 28: 623-631, 1997.
- RAMPON, C.; TANG, Y.-P.; GOODHOUSE, J.; SHIMIZU, E.; KYIN, M.; TSIEN, J. Z. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neuroscience*, 3: 238-244, 2000.
- RICE, J. F.; 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.
- ROSSI, C.; ANGELUCCI, A.; COSTANTIN, L.; BRASCHI, C.; MAZZANTINI, M.; BABBINI, F.; FABBRI, M. E.; TESSAROLLO, L.; MAFFEI, L.; BERARDI, N.; CALEO, M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of

hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 24: 1850-1856, 2006.

RODRIGUES, A. L.; ARTENI, N. S.; 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.

ROSE, C.R.; BLUM, R.; PICHLER, B.; LEPIER, A.; KAFITZ, K.; KONNERTH, A. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin evoked calcium signaling in glial cells. *Nature*, 426: 74-78, 2003.

SHARPE, M. A.; COOPER, C. E. Interactions of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 30961-30972, 1998.

SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, 40: 599-636, 1991.

THORNGREN-JERNECK, K.; ALLING, C.; HERBST, A.; AMER-WAHLIN, I.; MARSAL, K. S100 protein in serum as a prognostic marker for cerebral injury in term newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatric Research*, 55: 406-412, 2004.

TUOR, U. I.; HUDZIK, T. J.; MALISZA, K.; SYDSERFF, S.; KOZLOWSKI, M. R.; DEL BIGIO, M. R. Long-term deficits following cerebral hypoxia-ischemia in four-week-old rats: correspondence between behavioral, histological, and magnetic imaging assessment. *Experimental Neurology*, 167: 272-81, 2001.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1: 191-198, 2000.

VANNUCCI, R. C.; VANNUCCI S. J. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Annals of the New York Academy of Science*, 234-249, 1997.

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

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44-84, 2007.

WALTON, M.; CONNOR, B.; LAWLOR, P.; YOUNG, D.; SIRIMANNE, E.; GLUCKMAN, P.; COLE, G.; DRAGUNOW, M. Neuronal Death and Survival in Two Models of Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Brain Research Reviews*, 29: 137-168, 1999.

WANG, L. S.; ZHOU, J.; SHAO, X. M.; TANG, X. C. Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury in neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Brain Research*, 949: 162-170, 2002.

WARSHLAK, A.; WEINSTOCK, M. Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. *Physiology and Behavior*, 48: 289-292, 1990.

- WOOD, P. L. Microglia as a unique cellular target in the treatment of stroke: Potential neurotoxic mediators produced by activated microglia. *Neurological Research*, 17:242-248, 1995.
- XIA, W. J., YANG, M., FOK, T.F., LI, K., CHAN, W. Y., NG, P. C., NG, H. K., CHIK, K. W., WANG, C.C., GU, G. J., WOO, K. S., FUNG, K. Partial neuroprotective effect of pretreatment with tanshinone IIA on neonatal hypoxia-ischemia brain damage. *Pediatric Research*, 58: 784-790, 2005.
- YAGITA, Y.; KITAGAWA, K.; OHTSUKI, T.; TAKASAWA, K.; MIYATA, T.; OKANO, H.; HORI, M.; MATSUMOTO, M. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*, 32: 1890-1896, 2001.
- YONEMORI, F.; YAMADA, H.; YAMAGUCHI, T.; UEMURA, A.; TAMURA, A. Spatial memory disturbance after focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16: 973-980, 1996.
- ZHU, S. W.; YEE, B. K.; NYFFELER, M.; WINBLAD, B.; FELDON, J.; MOHAMMED, A. H. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behavioral Brain Research*, 169: 10-20, 2006.