



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós Graduação em Neurociências

**O ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL COMO ESTRATÉGIA  
NEUROPROTETORA NA HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL:  
A FUNÇÃO DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E O PERFIL  
NEUROINFLAMATÓRIO NO HIPOCAMPO DE RATOS.**

**Ramiro Diaz**

Junho 2017



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós Graduação em Neurociências

**O ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL COMO ESTRATÉGIA  
NEUROPROTETORA NA HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL:  
A FUNÇÃO DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E O PERFIL  
NEUROINFLAMATÓRIO NO HIPOCAMPO DE RATOS.**

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

**Ramiro Diaz**

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

Junho 2017

Não é sobre ter  
Todas as pessoas do mundo pra si  
É sobre saber que em algum lugar  
Alguém zela por ti  
É sobre cantar e poder escutar  
Mais do que a própria voz  
É sobre dançar na chuva de vida  
Que cai sobre nós

É saber se sentir infinito  
Num universo tão vasto e bonito  
É saber sonhar  
E, então, fazer valer a pena cada verso  
Daquele poema sobre acreditar

Não é sobre chegar no topo do mundo  
E saber que venceu  
É sobre escalar e sentir  
Que o caminho te fortaleceu  
É sobre ser abrigo  
E também ter morada em outros corações  
E assim ter amigos contigo  
Em todas as situações

A gente não pode ter tudo  
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?  
Por isso, eu prefiro sorrisos  
E os presentes que a vida trouxe  
Pra perto de mim

Não é sobre tudo que o seu dinheiro  
É capaz de comprar  
E sim sobre cada momento  
Sorriso a se compartilhar  
Também não é sobre correr  
Contra o tempo pra ter sempre mais  
Porque quando menos se espera  
A vida já ficou pra trás

Segura teu filho no colo  
Sorria e abraça teus pais  
Enquanto estão aqui  
Que a vida é trem-bala, parceiro  
E a gente é só passageiro prestes a partir

Laiá, laiá, laiá, laiá, laiá

(Música de Ana Vilela)

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Lenir, por me proporcionar a alegria e a satisfação de ser um “filho” da UFRGS, por acreditar em mim do início ao fim. Por me incentivar, me ensinar e me criticar nestes passos iniciais no fantástico mundo da ciência. MUITO OBRIGADO por me ajudar, não apenas a escrever um artigo, mas sim, pela incessante ajuda para que eu pudesse escrever esse importante capítulo da minha vida profissional.

Aos colegas de laboratório Jaqueline, Joseane, Clarissa e a “galera da Simone” por todos os momentos de tensão e risadas. Em especial à Ethi e a Fran, que me prestaram socorro em pleno Domingo, vocês ressignificaram a palavra “parceria”.

Queria escrever um capítulo especial desta tese para a Brubru, Helô e Patixinha, vocês foram essenciais para que eu pudesse estar desfrutando desse momento. Faltam-me palavras para agradecer tudo que vocês me proporcionaram. No momento de tensão, vocês foram o “relax”, na tristeza foram as risadas mais verdadeiras e num ambiente de competição plena, vocês foram a amizade absoluta. Ainda que seja pouco, MUITO OBRIGADO por TODOS os momentos que passamos. Amo vocês !!!

Agradecimentos à Silvia, pelas inúmeras tentativas de organizar o laboratório e aturar todos os surtos, pelas risadas e desabafos na beira da bancada.

Aos professores que tive nesta jornada da pós-graduação, em especial aos professores Carlos Alexandre Netto, Simone Marcuzzo, Matilde Achaval, Alberto Rasia, Carmen Gottfried, vocês se tornaram exemplos.

Aos meus professores da graduação em especial à Carla Brito, Luis Fernando Alvarenga, Janice Lukrafka, Alexandre Simões Dias, Mariane

Monteiro, pelo exemplo e pela dedicação vocês despertaram o professor que há em mim.

Aos colegas da pós-graduação pela troca de conhecimentos, em especial à Gisele Lovatel, Ligia Centenaro e ao Régis Mestriner que além de colegas, se tornaram exemplos e referências do início ao fim da PG.

Aos colegas de graduação e que hoje são amigos pra vida toda Tita, CYNthia, Amanda, vocês fazem parte desta realização.

Às colegas fisioterapeutas do tempo de Santa Casa, Daiane Scortegagna e especialmente Aline, Ariane e Riele, por ser quem são e estarem presentes nos meus pensamentos durante esta longa jornada.

Aos meus colegas da Universidade de Caxias do Sul – UCS, por serem exemplos, pelos incentivos e pela inspiração. Em especial ao Leandrinho, por todas as conversas no “madrugadão” Caxias-PoA, por todos os conselhos, pela amizade que vai além da docência.

Aos meus alunos, por me incentivarem a cada dia ser um professor melhor. Pelos questionamentos, pelas discussões, pelo carinho e confiança. Vocês são o meu combustível diário.

Aos “Galos”, por toda a amizade, troca de mensagens, conversas com e sem fundamento. Obrigado por trazerem a alegria quando a tristeza se “abancava”.

Aos “AfilhaBiDindos”, Chico e Querizinha: vocês são fundamentais para que eu possa dar e receber o que há de melhor neste mundo, estar escrevendo os capítulos da minha vida ao lado de vocês é fantástico.

Aos “Bruschettas Queimadas”, por todas as noites não dormidas, pelos diálogos mais rasos, até a filosofia mais profunda. Pelo cuidado, pelo carinho, pela atenção e principalmente, pela paciência, irei sempre agradecer e retribuir o amor de vocês.

Ao Cássio e as “Luzes” por me incentivarem e acreditarem e me encherem de carinho.

À minha irmã Marina, por ser para sempre e todo sempre a ligação entre o meu passado e o meu futuro. Por sempre ter um ombro para desabafar e um grito (literalmente) de incentivo para dar. Por acreditar em mim! Te Amo Hermana, “su atentada”.

À minha família “de casa”, em especial ao tio Aici e à tia Cira que me devolveram o sentido familiar, me exemplificando que juntos superamos as adversidades e que com “o andar da carruagem as coisas se organizam”, à família da Rosi, pelos momentos de alegria.

Aos meus afilhados Gui, Manu, Luisa, Pietra, Anita, Luciane, Caio, Julia e Luciane vocês são a alegria do meu coração, o alento, o carinho que preciso para seguir adiante, vocês me inspiram a ser melhor. Amo vocês sem medida!

À minha Mãe, pelo sentido e direção que me mostrou na presença, pela inspiração, ensinamentos e saudades na ausência. Carrego em mim, muito de ti e isso me fez chegar até aqui. Te Amo !

À minha Vó, por ser o Amor, o Carinho, a Gratidão, a Alegria e a Paz em forma de pessoa. Por se fazer presente em todos os dias da minha vida, por ser essencial e por eu buscar a tua essência. Meu amor é infinito por ti e para ti!

Ao PPG neurociências, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (querida UFRGS) e ao CNPq pela minha bolsa.

Para a minha maior incentivadora, aquela que entrou no meu coração e não reparou na bagunça. Para aquela que não é exagerada, apenas tem vontade e intensidade para sentir tudo com um amor infinito. Para quem me incentiva a ser melhor e me ajuda reconstruir quando não estou “tão bom”. Para aquela que conhece todas as minhas versões, invenções e está e estará ao meu lado nas maiores lições desta vida. Para aquela que divido a vida, a Chimia e toda a tristeza e alegria. Para ti Rosi, me faltam palavras de agradecimento, de reconhecimento. Te Amo, ainda parece pouco.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	5
LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS .....	8
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	13
<i>Introdução</i> .....	15
<i>Hipóxia-isquemia encefálica neonatal</i> .....	17
<i>Modelo animal de hipóxia-isquemia encefálica neonatal</i> .....	32
<i>Enriquecimento ambiental</i> .....	34
<i>Justificativa</i> .....	37
<i>Objetivos</i> .....	39
OBJETIVO GERAL .....	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<i>Capítulo 1</i> .....	41
ENVIRONMENTAL ENRICHMENT ATTENUATES THE BLOOD BRAIN BARRIER DYSFUNCTION INDUCED BY THE NEONATAL HYPOXIA-ISCHEMIA .....	41
<i>Capítulo 2</i> .....	42
O enriquecimento ambiental altera o perfil neuroinflamatório e facilita a aquisição da esquiva no labirinto em cruz elevado em roedores submetidos à hipóxia-isquemia neonatal .....	42
<i>Discussão</i> .....	76
<i>Conclusões</i> .....	85
<i>Perspectivas</i> .....	87
<i>Bibliografia</i> .....	89
<i>Anexo</i> .....	109



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO DA TESE

Figura 1: Fisiopatologia de lesão encefálica hipóxico-isquêmica

Figura 2: Representação esquemática das proteínas que formam a barreira hematoencefálica.

Figura 3: Representação esquemática das junções intercelulares

Figura 4: Modelo experimental de hipóxia-isquemia encefálica neonatal

Figura 5: Ilustração do enriquecimento ambiental

### CAPÍTULO 1

Figura 1: Expression of proteins of the BBB at PND 8 in the left and right hippocampus.

Figura 2: Expression of proteins of the BBB the PND 22 in the left and right hippocampus.

Figura 3: Expression of proteins of the BBB at PND 60 in the left and right hippocampus.

Figura 4: View of the whole brain after infusion with Evans blue dye at PND 8, PND 22 and PND 60.

Figura 5: Immunohistochemistry for GFAP at PND 22 and 60 in the left hippocampal CA1 region.

## CAPÍTULO 2

Figura 1: Resultados do labirinto em cruz elevado (LCE).

Figura 2A: Resultados da análise bioquímica (IL-1 $\beta$ ).

Figura 2B: Resultados da análise bioquímica (TNF- $\alpha$ ).

Figura 3A: Resultados da Imuno-histoquímica – Iba1 (densidade óptica).

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO DA TESE

Tabela 1: Ação das citocinas no sistema nervoso central.

### CAPÍTULO 2

Tabela 1: Resultados não significativos do LCE.

Tabela 2: Resultados do Teste Claro / Escuro (TCE).

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA (a.amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazolproprionato).

ANOVA (análise de variância).

AOI (área óptica de interesse).

AQP-4 (aquaporina 4).

AQPs (aquaporinas).

ATP (adenosina trifosfato).

BHE (barreira hematoencefálica).

Ca<sup>+</sup> (cálcio).

CA1 (região 1 do corno de Ammon).

Cl<sup>-</sup> (cloro).

CTAE (controle ambiente enriquecido).

CTAP (controle ambiente padrão).

CX 43 (conexina 43).

DPN (dia pós-natal).

EA (enriquecimento ambiental).

EG (excitotoxicidade por glutamato).

EO (estresse oxidativo).

GFAP (proteína fibrilar glial ácida).

GLUT1 (transportador de glicose 1).

GLUTs (proteínas que transportam glicose).

H<sub>2</sub>O (água).

HI (hipóxia-isquemia).

HIAE (hipóxia-isquemia ambiente enriquecido).

HIAP (hipóxia-isquemia ambiente padrão).

IbA1 (*ionized calcium-binding adaptor molecule-1*).

ILs (interleucinas).

IL-1 $\beta$  (interleucina 1-beta).

JAs (junções aderentes).

JCs (junções comunicantes / *gap junctions*).

JOs (junções oclusivas / *tight junctions*).

LCE (labirinto em cruz elevado).

Na<sup>+</sup> (sódio).

NMDA (N.metil-D-aspartato).

PBS (tampão fosfato salino).

SNC (sistema nervoso central).

TCE (teste claro/escuro).

TNF –  $\alpha$  (fator de necrose tumoral).

VE (vascular endotelial).

VEGF (fator de crescimento endotelial vascular).

WB (*western blotting*).

$\alpha$ -cat (alfa-catenina).

B-cat (beta-catenina).

$\gamma$ -cat (gama-catenina).

$\delta$ -cat (delta-catenina).

## RESUMO

Inúmeras estratégias neuroprotetoras vêm sendo desenvolvidas para o tratamento da encefalopatia neonatal causada pela hipóxia-isquemia (HI). O enriquecimento ambiental (EA) é uma ferramenta que propicia interação social, estimulação visual, sensorial e atividade física de forma espontânea e assim induz mudanças comportamentais e neurofisiológicas. O objetivo desta tese foi investigar os efeitos do EA em relação à estrutura e expressão de proteínas constituintes da barreira hematoencefálica (BHE) e parâmetros bioquímicos de citocinas neuroinflamatórias no hipocampo em fases subsequentes do desenvolvimento. Ainda, o escopo comportamental desta tese foi analisar o efeito do EA precoce sobre a ansiedade demonstrada por ratos adultos submetidos à HI. Para tanto, ratos Wistar machos e fêmeas, no 7º dia pós-natal (DPN), foram submetidos ao modelo de Levine-Rice de HI neonatal. Os animais foram divididos em quatro grupos: CTAP (controle ambiente padrão), CTAE (controle ambiente enriquecido), HIAP (hipóxia-isquemia ambiente padrão) e HIAE (hipóxia-isquemia ambiente enriquecido). Os animais dos grupos EA permaneceram no enriquecimento ambiental mantido desde o 8º DPN. Após o desmame os animais foram divididos em grupos e estimulados no EA (1 h/dia por 5 semanas). Análises da expressão de proteínas estruturantes da BHE no hipocampo ( $\beta$ -catenina, ocludina, conexina-43, aquaporina-4, transportador de glicose 1 - Glut-1 e proteína fibrilar glial ácida - GFAP) foram quantificadas através de Western Blotting (WB). Observamos a permeabilidade e integridade da BHE através da coloração com azul de Evans e também foi realizada imuno-histoquímica para GFAP na região 1 do corno de Ammon -

CA1 do hipocampo no 22º e 60º DPN. Realizamos análises da expressão das citocinas inflamatórias fator de necrose tumoral alfa - TNF- $\alpha$  e interleucina 1 beta - IL-1 $\beta$ , juntamente com análise imuno-histoquímica para marcação de microglia ativada na fase adulta de animais HI submetidos ao EA. Ademais, foram avaliados os efeitos da HI e do EA sobre a ansiedade no primeiro dia de exposição dos animais ao labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste claro/escuro (TCE).

Os nossos dados mostraram que o EA foi efetivo para reverter as alterações causadas pela HI aumentando a expressão de ocludina no 22º DPN e de  $\beta$ -catenina e GFAP no 60º DPN e diminuindo o extravasamento de azul de Evans. No 8º DPN não há alteração na BHE, sendo sugestivo de imaturidade da BHE. A avaliação imuno-histoquímica de Iba-1 demonstra ativação microglial após HI e o perfil bioquímico apresenta grande expressão das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em animais hipóxico-isquêmicos estimulados em EA. Através dos níveis de ansiedade encontrados, podemos estabelecer que o EA favorece uma ação menos impulsiva reduzindo o comportamento de risco dos animais após a HI.

Assim, nossos resultados contribuíram para a compreensão do mecanismo da HI, visto que apresentamos de forma singular que o EA é eficaz na recuperação da disfunção da BHE maximizando os efeitos neuroprotetores de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  sobre aspectos comportamentais relacionados à ansiedade.



## ABSTRACT

Several neuroprotective strategies have been developed for the treatment of the neonatal encephalopathy caused by hypoxic ischemia (HI). The environmental enrichment (EE) is a strategy that propitiates social interaction, visual and sensorial stimulation, and physical activity spontaneously and, thus, it causes behavioral and neurophysiological changes. The aim of this thesis was to investigate the effects of EE on the structure and expression of proteins in the blood-brain barrier (BBB) and biochemical parameters of neuroinflammatory cytokines in the hippocampus in subsequent developmental stages. Moreover, the behavioral scope of this thesis was to analyze the effect of early EE on anxiety expressed by adult rats. Male and female Wistar rats, PND 7, were submitted to the Levine-Rice model of neonatal HI.

The animals were divided into four groups: CSE (control - standard environment), CEE (control - enriched environment), HISE (hypoxic ischemia - standard environment) and HIEE (hypoxic ischemia - enriched environment). The animals of the EE groups were kept in the environmental enrichment since PND 8. After weaning, the animals were divided into groups and exposed to the EE (1h a day for 5 weeks). Expression analyses of the BBB structural proteins in the hippocampus ( $\beta$ -catenin, occludin, connexin-43, aquaporin-4, Glut-1, and GFAP) were quantified by Western Blotting (WB). We observed the BBB permeability and integrity through Evans blue staining as well as immunohistochemistry for GFAP in the CA1 hippocampus region on PND 22, and 60. We performed analyzes of the expression of the inflammatory

cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , together with immunohistochemical analysis for quantification of Iba-1 in the adult phase of HI animals submitted to EE. Furthermore, the effects of the HI and the EE on anxiety on the first day of exposition to the elevated plus maze test (EPM) and the light-dark box test (LDB) were assessed.

Our data have shown that the HI reduces occludin expression on PND 22 and  $\beta$ -catenin and GFAP on PND 60 along with the extravasation of Evans blue, indicating BBB dysfunction in these periods and reversion of the alterations by the EE. On PND 8, there is no BBB change, which is suggestive of BBB immaturity. The immunohistochemical assessment of Iba-1 demonstrates microglial activation after HI and the biochemical profile shows great expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  cytokines in hypoxic-ischemic animals stimulated in EE. Through the levels of anxiety found, we can establish that the EE favors a less impulsive behavior and reduces the anxiogenic factor of animals after HI.

Thus, our results have contributed to the understanding of the HI mechanism; we presented in a unique way the recovery of the BBB dysfunction and the maximization of the neuroprotective effects of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  on behavioral aspects related to anxiety of animals exposed to the EE after HI.

# Introdução

A hipóxia-isquemia (HI) encefálica que ocorre no período neonatal é uma das principais causas de mortalidade, correspondendo a um quarto dos três milhões de mortes no período neonatal e metade dos 2,6 milhões de mortes no terceiro trimestre após o nascimento (Lawn *et al.*, 2005 e 2009), sendo também responsável por um grande número de casos de invalidez ao longo da vida (Johnston *et al.*, 2011; Shalak *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1979).

Estima-se em países desenvolvidos que a incidência de asfixia seja de 2,5 a cada 1000 nascimentos a termo (Liao *et al.*, 2012; Kurinczuk *et al.*, 2010). A prevalência de asfixia neonatal na população brasileira é de aproximadamente 2% dos nascidos vivos (Souza *et al.*, 2003).

Achados clínicos como baixo Apgar nos primeiros 5 minutos após o nascimento, avaliação neurológica anormal, crises convulsivas e acidose metabólica são comuns em pacientes neonatos hipóxico-isquêmicos que muitas vezes necessitam de suporte respiratório imediatamente após o nascimento (Liao *et al.*, 2012; McQuillen *et al.*, 2004; Dezateux *et al.*, 2004; Dilenge 2001).

Mesmo havendo uma evolução tecnológica / científica nos cuidados relacionados ao recém-nascido, as condutas clínicas de crianças pós HI são limitadas a manutenção da oxigenação, ao controle da homeostase, da hipertensão intracraniana e ao tratamento das convulsões acabando por não interferir na prevenção e interrupção dos mecanismos da lesão (Vannucci 2000).

Considerando os avanços tecnológicos e a criação de novos conhecimentos, houve uma redução de 50% na taxa de mortalidade dos recém-nascidos asfisiados. Devido a esta maior taxa de sobrevivência, há um aumento na prevalência de sequelas do quadro neurológico em longo prazo subsequente da lesão hipóxico-isquêmica.

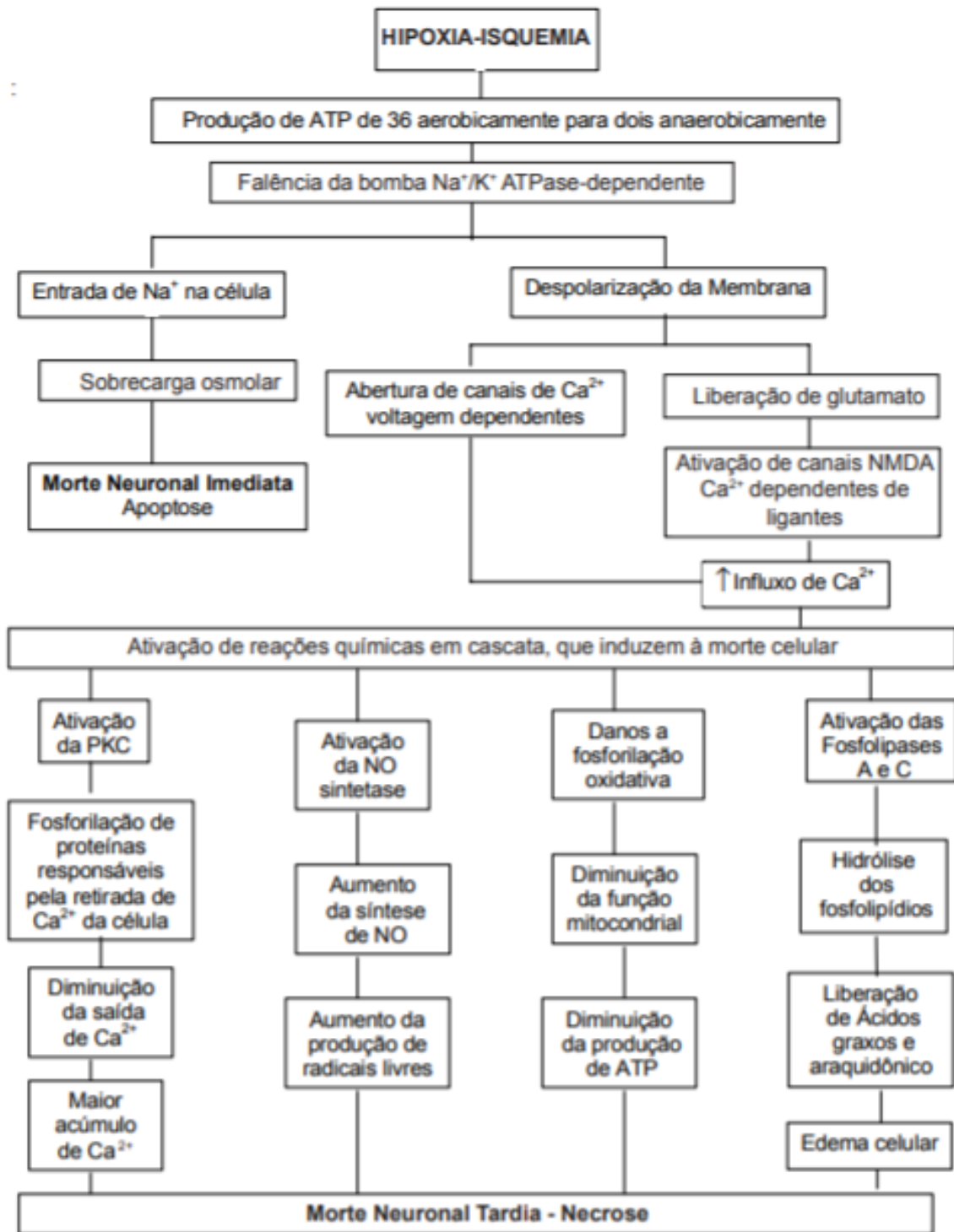
Crianças diagnosticadas com encefalopatia severa possuem danos a estruturas cerebrais, como córtex cerebral, hipocampo, tálamo, núcleos da base, tronco encefálico e substância branca (Berger *et al.*, 1999; Grow *et al.*, 2002; Buwalda *et al.*, 1995), apresentando incapacidades permanentes, implicando em retardo mental, paralisia cerebral, déficit visual e/ou auditivo, epilepsia e dificuldades de aprendizado (Dilenge *et al.*, 2001).

## *Hipóxia-Isquemia Encefálica Neonatal*

O principal evento desencadeador relacionado à encefalopatia hipóxico-isquêmica é a redução do fluxo sanguíneo cerebral (Berger *et al.*, 1999; Perlman *et al.*, 2006). Diversos insultos neurotóxicos ocorrem simultaneamente à lesão, tais como, despolarização da membrana, acúmulo de radicais livres, falência energética, apoptose e liberação de aminoácidos excitatórios, contribuindo para a disfunção celular e morte neuronal (Vexler *et al.*, 2001) (figura 1).

Os dados neuropatológicos da HI apresentam variações conforme a natureza do dano, porém algumas lesões são características, podendo-se citar a necrose focal e multifocal, leucomalácia periventricular, injúria cerebral parassagital e necrose neuronal seletiva (Volpe *et al.*, 1992; Marin-padilla 2000)

Devido ao alto consumo energético, o encéfalo possui grande sensibilidade a reduções no suprimento de oxigênio, que quando reduzido (comprometido), ativa uma cascata de eventos químicos induzindo lesão ou morte celular em regiões mais vulneráveis do sistema nervoso central, como hipocampo, córtex cerebral e núcleos basais. O sistema nervoso imaturo apresenta menor tolerância à eventos hipóxicos (Dell'anna *et al.*, 1993; Nakajima *et al.*, 1996 e 1999; Volpe *et al.*, 1992; Kurinczuk *et al.*, 2010; Johnston *et al.*, 2011;) e há períodos com maior susceptibilidade à HI acarretando em problemas no desenvolvimento neuronal (Nyakas *et al.*, 1996). A reatividade às agressões patológicas está diretamente relacionada às características anatômicas e conforme cada etapa do desenvolvimento (Volpe *et al.*, 1992).



**Figura 1:** Fisiopatologia de lesão encefálica hipóxico-isquêmica

(Araujo SA, Pacheco SS, Oliveira AG, Imaizumi C, Abreu LC, 2008)

É importante salientar que a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é fundamental para a excitabilidade neuronal (Mobasheri *et al.*, 2000; Golden *et al.*, 2001) e a HI reduz a produção de adenosina trifosfato (ATP) nas células, gerando uma deficiência na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, este defeito acarretará a morte celular por necrose devido aos elevados níveis intracelulares de sódio ( $\text{Na}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e água ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

O encéfalo que sofre a HI apresenta mecanismos patológicos como excitotoxicidade por glutamato (EG), estresse oxidativo (EO) e inflamação (Mishra *et al.*, 1999; McLean *et al.*, 2004). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, sendo responsável por 90% das sinapses excitatórias (Mckenna *et al.*, 2007) e regulando vários mecanismos cognitivos e de memórias, participando na formação de redes neurais durante todo o desenvolvimento e atuando nas etapas de proliferação, migração, diferenciação e morte de células (McDonald *et al.*, 1990; Prybylowski *et al.*, 2004). Grande parte do glutamato sintetizado nos neurônios é armazenado nas vesículas dos terminais nervosos. Quando ocorre o impulso nervoso, o glutamato é liberado da célula pré-sináptica, ligando-se a receptores da célula pós-sináptica. No final da neurotransmissão ocorre a recaptação de glutamato, executada pelos astrócitos próximos à sinapse, evitando a sua permanência no espaço extracelular (Hawkins *et al.*, 2009).

A falha energética decorrente da HI impossibilita a recaptação do glutamato, pois os transportadores responsáveis por esta recaptação são dependentes de ATP (Kelmendi *et al.*, 2006). Assim, o glutamato atuará na



fenda sináptica por tempo mais prolongado. Essa atuação por mais tempo na fenda sináptica pode ser dez vezes maior que o normal, gerando uma superexcitação dos receptores glutamatérgicos (N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor metabotrópico de glutamato (m-GLU-r) e ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) e consequente morte neuronal excitotóxica (McLean *et al.*, 2004). A ativação, em maior número dos receptores pós-sinápticos, como o NMDA, acarreta o influxo de grande quantidade dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  e água nos neurônios pós-sinápticos, desencadeando a morte celular por necrose e consequente acréscimo dos níveis de  $\text{Ca}^+$  intracelular. O resultado deste processo é a falência energética e morte neuronal por apoptose (McLean *et al.*, 2004). Além da EG, a inflamação está entre os mecanismos responsáveis pela ocorrência de danos atribuídos à HI (McLean *et al.*, 2004).

Na ocorrência de lesão tecidual, tanto central quanto periférica, ocorre uma reação inflamatória. A inflamação pode ser benéfica ou deletéria e inclui a produção de mediadores que ativam, atraem, estimulam ou inibem as células provenientes do sistema imunológico. Quando o encéfalo é afetado, as células endoteliais, microglia e neurônios são fonte ou alvo de mediadores inflamatórios (Abbas *et al.*, 2000).

A população de macrófagos especializados do SNC é denominada microglia sendo descrita como células do sistema mononuclear fagocitário do SNC e se proliferam na presença de lesões (Boche *et al.*, 2013; Ginhoux *et al.*, 2013). Em condições patológicas, a microglia tem como resposta a liberação

de fatores de crescimento e citocinas, como as interleucinas (ILs) que desempenham funções inflamatórias e imunitárias (Howe *et al.*, 2012; Yi Liang *et al.*, 2011; Zhai *et al.*, 2011). Um dos marcadores mais utilizados para identificar a microglia é o *Ionized calcium-Binding Adaptor molecule-1* (IbA1) (Boche *et al.*, 2013), uma molécula pequena que apresenta cerca de 20 kDa e é formada por 147 aminoácidos, ligadora de cálcio, expressa especificamente na microglia (Ito *et al.*, 1998). Funcionalmente, a IbA1 é uma proteína essencial para a ativação da microglia, durante a proliferação, migração e fagocitose, reorganizando o citoesqueleto de actina, fundamental para estes processos celulares (Imai *et al.*, 2002). A inflamação decorrente da hipóxia-isquemia no SNC é caracterizada pelo influxo de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e ativação microglial (Clark *et al.*, 1997).

O processo isquêmico no sistema nervoso central (SNC) também resulta em inflamação e liberação de polipeptídeos/citocinas (Distefano *et al.*, 2010). A liberação de citocinas, mediadoras da inflamação, pela microglia está relacionada diretamente a uma resposta do sistema imunológico devido à lesão tecidual decorrente da HI, estimulando a liberação de glutamato, óxido nítrico e radicais livres (McLean *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 1995). Estes polipeptídeos exercem um papel de orientação na resposta inflamatória, tanto local como sistemicamente, sendo fundamentais na modulação e reparação do tecido lesado (McLean *et al.*, 2004; Titomanlio *et al.*, 2015) (tabela 1).

<b>Tabela 1 - Ações das citocinas no sistema nervoso central: Neurotoxicidade X Neuroproteção</b>		
<b>Interleucinas</b>	<b>Pró-inflamatórias</b>	<b>Anti-inflamatórias</b>
IL-1 $\beta$	++	+
IL-6	+++	+++
TNF- $\alpha$	++	+
IL-8	+	-
IL-10	-	+++
IL-4	-	++
IL-12	+	-
IL-1RA	-	++
TNF- $\alpha$ p55	-	++
IL-18	+	-

+ = presença de ação  
- = ação não conhecida

As citocinas possuem ações idênticas a hormônios. Este grupo de proteínas solúveis atua através de receptores específicos, apresentam baixo peso molecular e são produzidas e secretadas por uma variedade de células através de estímulos em situações específicas (fisiológicas ou patológicas). A principal ação das citocinas é na resposta inflamatória e imune, podendo atuar também no crescimento e diferenciação celular (Cohen *et al.*, 1996). Sabe-se que as citocinas são produzidas e secretadas dentro do SNC através da microglia e astrócitos. Patologias que geram lesão encefálica, como HI, propiciam a liberação de citocinas, especialmente Interleucina 1-Beta (IL-1  $\beta$ ) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), gerando assim ação citotóxica nos tecidos adjacentes, estimulando a ativação de linfócitos e proliferação astrocitária (Tarkowski *et al.*, 1995).

O TNF- $\alpha$  é um dos principais mediadores da resposta pró-inflamatória. A função imunológica do TNF-  $\alpha$  é recrutar monócitos e neutrófilos para o local da lesão e posteriormente ativá-los a fim de exterminar o microrganismo agressor (Abbas *et al.*, 2005). O TNF-  $\alpha$  no encéfalo é produzido por macrófagos e astrócitos, estimulando a secreção de proteínas e por consequência ocasionando o aumento da infiltração leucocitária (Clark *et al.*, 1997). O TNF- $\alpha$  é a citocina inflamatória mais descrita em relação à leucomalácia periventricular e paralisia cerebral no recém-nascido (Yoon *et al.*, 2000) e parece estar diretamente relacionada nos mecanismos da encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal (Dammann *et al.*, 2000), podendo apresentar efeitos neurotóxicos na isquemia encefálica (Stoll *et al.*, 2000). Ainda, na cascata inflamatória da coagulação, possui ação estimulatória no endotélio, promovendo a aderência leucocitária e atividade pró-coagulante endotelial. Assim, aumenta o fator tecidual e o fator ativador plaquetário, sendo que estas ações quando acionadas conjuntamente, exacerbam o dano isquêmico encefálico. Ao estimular a agregação plaquetária, o TNF- $\alpha$  gera hipotensão e induz a apoptose dos oligodendrócitos e degeneração mielínica estimulando a produção de IL-1 $\beta$  (Kadhim *et al.*, 2001). O TNF- $\alpha$  também é causador de lesão da mielina e oligodendrócitos, gerando maior proliferação de astrócitos, colaborando para a desmielinização e astrogliose reativa, fatores que ocorrem durante a lesão isquêmica encefálica. Além do mais, o TNF-  $\alpha$  tem envolvimento na lesão da BHE, gerando aumento da permeabilidade vascular e perda da seletividade da BHE (Clark *et al.*, 1997; Barone *et al.*, 1997).

A citocina IL-1 $\beta$  já foi descrita como mediador de alterações na morfologia e comportamento do SNC na fase de desenvolvimento. Essas modificações ocorreram em respostas a processos inflamatórios ocorridos na infância ou no período pré-natal. Níveis elevados de IL-1 $\beta$  diminuem a neurogênese hipocampal, porém níveis moderados são necessários para o perfeito funcionamento dos processos cognitivos e de neurogênese no hipocampo (Clark *et al.*, 2006; Garlanda *et al.*, 2013). Sabe-se que a lesão hipóxica-isquêmica gera aumento da expressão de IL-1 $\beta$ , porém o mecanismo ainda é desconhecido (Ziv *et al.*, 2008; Avital *et al.*, 2003; McPherson *et al.*, 2011). As ILs pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  influenciam a síntese e função de outras citocinas por meio de uma rede de múltiplas interações. Presume-se que a cascata de inflamação tenha início com a liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , promovendo então a produção de outras citocinas, ativando a infiltração de leucócitos e de citocinas anti-inflamatórias (Cohen *et al.*, 1996). A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  possuem ligação direta com a resposta inflamatória no encéfalo, podendo gerar um desarranjo na estrutura da BHE (Titomanlio *et al.*, 2001; Rumajogee *et al.*, 2016).

A BHE atua no isolamento do SNC do meio plasmático e possui papel fundamental na sua proteção, auxiliando na proteção das estruturas do encéfalo após eventos como apoptose celular e excitotoxicidade por glutamato. Funcionalmente, possui caráter de proteção e difusão do SNC e isola o espaço extracelular do encéfalo das alterações decorrentes do espaço extracelular corporal (Redzic *et al.*, 2011). O SNC tem permeabilidade seletiva de

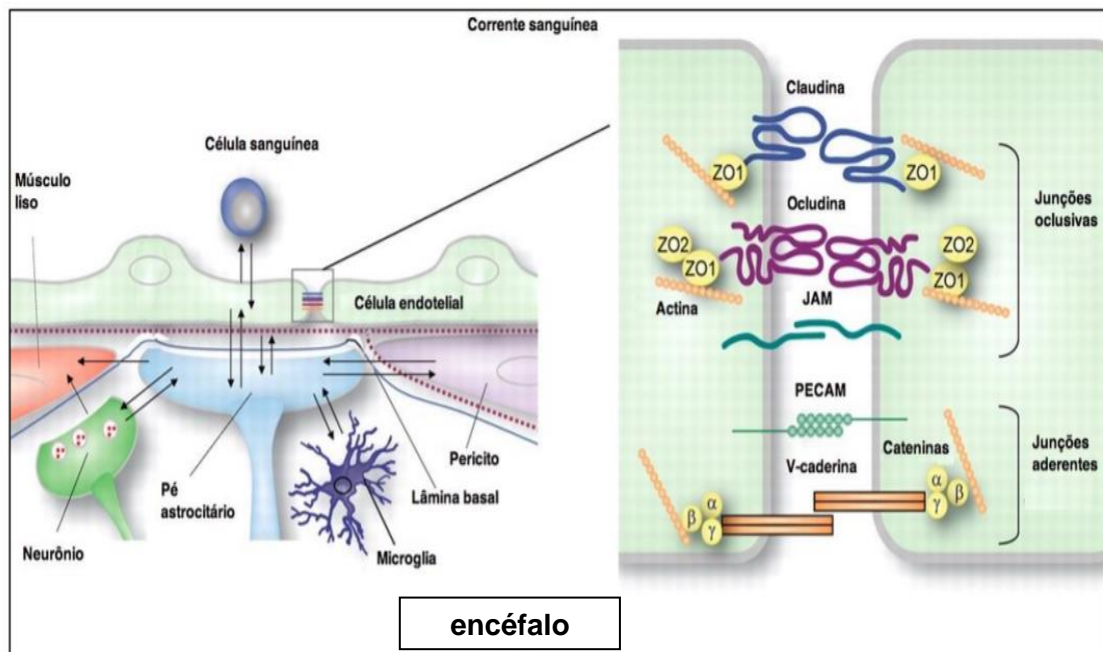
moléculas existentes no sangue, devido à presença da BHE (Engelhardt *et al.*, 2009).

A BHE possui uma unidade estrutural e funcional básica, chamada unidade neurovascular, que é composta por pelo menos quatro tipos celulares: células endoteliais: capilares da vasculatura encefálica, pericitos: situados acima das células endoteliais e compartilham da mesma membrana basal, astrócitos: cercam os capilares através dos pés terminais e neurônios: inervam diretamente a microcirculação;

Conjuntamente, essas estruturas da unidade neurovascular exercem o controle da função da BHE (Obermeier *et al.*, 2013).

Entre as características da BHE, está a falta de fenestrações e baixa atividade pinocítica, limitando a passagem de substâncias do sangue ao tecido encefálico quando comparado aos órgãos periféricos (Shan *et al.*, 2012). Uma das características funcionais da BHE é o transporte permanente, expresso em células do endotélio capilar, garantindo o transporte de nutrientes para o SNC e impedindo a passagem de substâncias prejudiciais ao perfeito funcionamento da transmissão neuronal (Engelhardt *et al.*, 2009). A ausência da integridade da BHE coloca o encéfalo em contato com substâncias potencialmente danosas como aminoácidos, íons e moléculas imunológicas gerando a perturbação na homeostase encefálica e consequente degeneração neuronal (Obermeier *et al.*, 2013; Daneman *et al.*, 2012).

Entre as células endoteliais dos microvasos do SNC há um complexo juncional composto de junções aderentes (JAs) e junções oclusivas/ *tight junctions* (JOs), sendo que nas células epiteliais há apenas junções oclusivas. Por meio deste complexo juncional componente da estrutura da BHE há o impedimento todo movimento paracelular de proteínas, solutos e íons. (figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática das proteínas que formam a BHE. (ZO: zônulas de oclusão; JAM: molécula de adesão juncional; PECAM: molécula de adesão celular plaquetária/endotelial.

Adaptado de <http://www.neurology.org/content/78/16/1268/F1.expansion.html>

As JOs formam um cinturão na célula e compõe a porção mais apical da fenda intercelular da BHE, o que caracteriza uma grande vedação entre as células endoteliais (Sandoval *et al.*, 2008). Dentre as proteínas transmembranas que constituem as JOs estão as claudinas e ocludinas. As ocludinas estão localizadas exclusivamente nas JOs, sendo essenciais para o desenvolvimento normal das junções oclusivas da BHE (Blackburn *et al.*, 1998;

Bonkowski *et al.*, 2011). Sabe-se que a redução na expressão das proteínas de junção danifica a integridade das JOs e conseqüentemente aumenta a permeabilidade paracelular (Correale *et al.*, 2009).

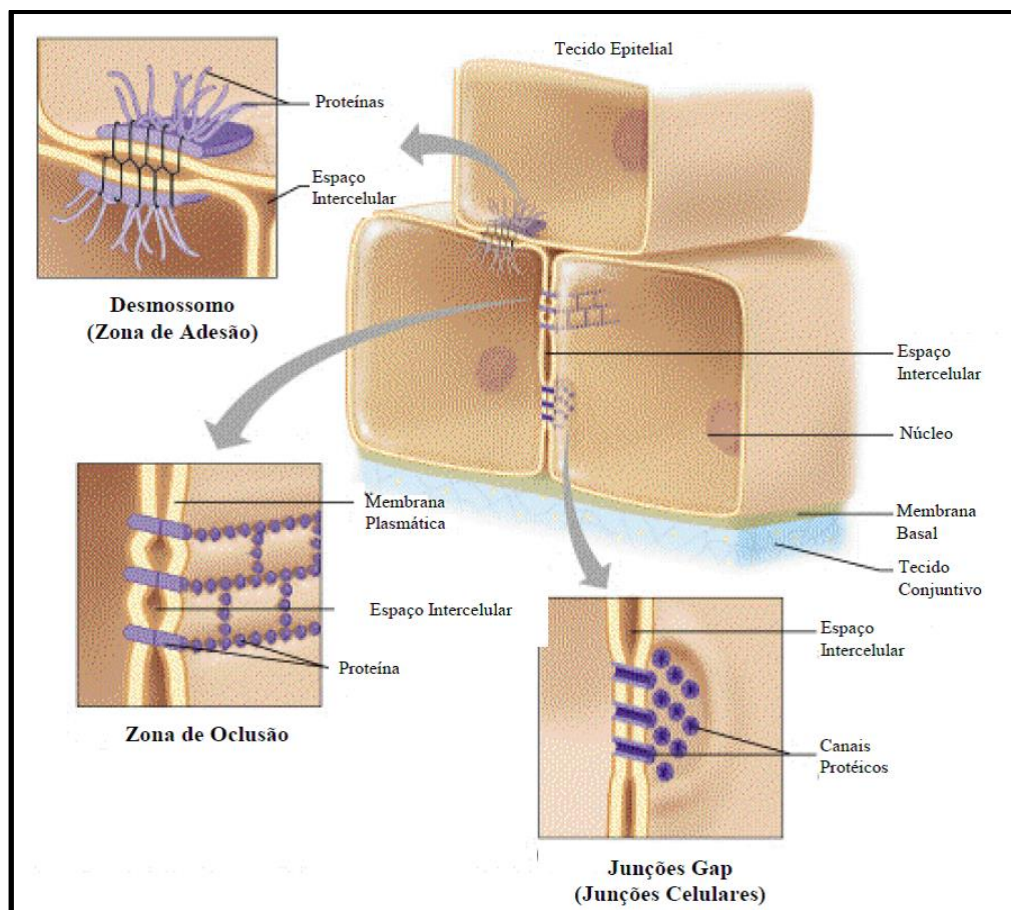
Poucos trabalhos têm estudado a disfunção do complexo juncional da BHE após a HI neonatal. As JOs são os componentes funcionais mais suscetíveis a modificações pós lesão HI (Alvarez-Díaz *et al.*, 2007), e o efeito deletério pode persistir por longo prazo após o evento hipóxico-isquêmico (Mishima *et al.*, 2004). Já foi descrito que o dano às JOs acarreta um edema intersticial-vasogênico decorrente da ruptura da BHE após a HI (Distefano *et al.*, 2010).

As junções de aderência, com localização basolateral às JOs, mantêm as células unidas por ligações entre os domínios extracelulares através de moléculas de caderina, dependentes de cálcio, que transpõe o espaço entre as células vizinhas auxiliando na integridade da BHE. Além do seu papel na manutenção da integridade, participa no controle da permeabilidade leucocitária vascular (Corada *et al.*, 1999 e 2001) a VE (vascular endotelial)-caderina tem expressão exclusiva no endotélio, sendo considerado um marcador endotelial. O domínio citoplasmático é ligado aos filamentos de actina do citoesqueleto, através das proteínas chamadas cateninas. O complexo VE-caderina/cateninas é extremamente dinâmico com alteração da composição de forma rápida, de acordo com o estado funcional da célula. A família destas proteínas possui alguns tipos, incluindo alfa-catenina ( $\alpha$ -cat), beta-catenina ( $\beta$ -cat), delta-catenina ( $\delta$ -cat) e gama-catenina ( $\gamma$ -cat). A  $\beta$ -cat atua como fator de



transcrição, estabelecendo papel fundamental na sobrevivência celular, além disso, atua nas sinapses interneuronal, porém, ela é degradada no encéfalo após lesão cerebral isquêmica (Ozawa *et al.*, 1989; Peyrieras *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 2008; Nusrat *et al.*, 2000).

Além das JOS e das JAS, as células endoteliais possuem também as junções comunicantes/*gap junctions*, (JCs) (Figura 3).



**Figura 3:** Representação esquemática das junções intercelulares.  
Adaptado de: Benjamin Cummings an Imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Estes canais são responsáveis pela comunicação direta entre células vizinhas, sendo fundamentais para a manutenção da homeostase, regulação do crescimento e diferenciação celular, além de agir na resposta vasoativa das

células endoteliais (Goodenough *et al.*, 1996; Hüsler *et al.*, 2016; Polacek *et al.*, 1993; Rozental *et al.*, 2000; Saffitz *et al.*, 2000; Steinberg *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 1999). A conexina 43 (Cx43) é uma das proteínas que compõe as JCs sendo bastante expressa em células do endotélio encefálico fetal em desenvolvimento, tendo relação direta com a angiogênese cortical (Errede *et al.*, 2002). Sabe-se ainda que este tipo de junção está presente entre as células endoteliais e os pés astrocitários, que cobrem 95% da superfície dos capilares da BHE, promovendo a transmissão de sinais importantes para sobrevivência e atividade neuronal, assim como fatores derivados do estresse metabólico. Em situações patológicas como isquemia e inflamação, há alteração na atividade das JCs (Tencé *et al.*, 2012).

Os astrócitos são as células mais numerosas do SNC (Dong *et al.*, 2001) e expressam muitos receptores de neurotransmissão, fatores de crescimento e citocinas, permitindo a estabilidade e modulação da atividade sináptica do SNC.

Quando ativados, adquirem uma morfologia hipertrófica, aumentando a produção do seu filamento intermediário a *Glial Fibrillar Acid Protein* (GFAP) estabelecendo assim, uma cicatrização glial e diminuição da regeneração e plasticidade tecidual (Sullivan *et al.*, 2014; Revuelta *et al.*, 2016; Filous *et al.*, 2016)

Os astrócitos estabelecem uma íntima relação com os neurônios e possui fundamental importância no desenvolvimento e funções do encéfalo (sinaptogênese, homeostase do meio extracelular e microcirculação cerebral)

desempenhando também função no suporte metabólico encefálico (Perea *et al.*, 2005) sendo a forma de estocagem de glicose no SNC (Pellerin *et al.*, 2007).

Ademais de, os astrócitos são imprescindíveis na regulação e manutenção da BHE, fazendo restrição na entrada de moléculas. Em condições de HI há perda da integridade da BHE, exposição do tecido encefálico a concentrações lesivas de substâncias provenientes da periferia, como aminoácidos, neurotransmissores e proteínas, isso acaba gerando danos na sinalização neural e homeostase (Abbott *et al.*, 2010).

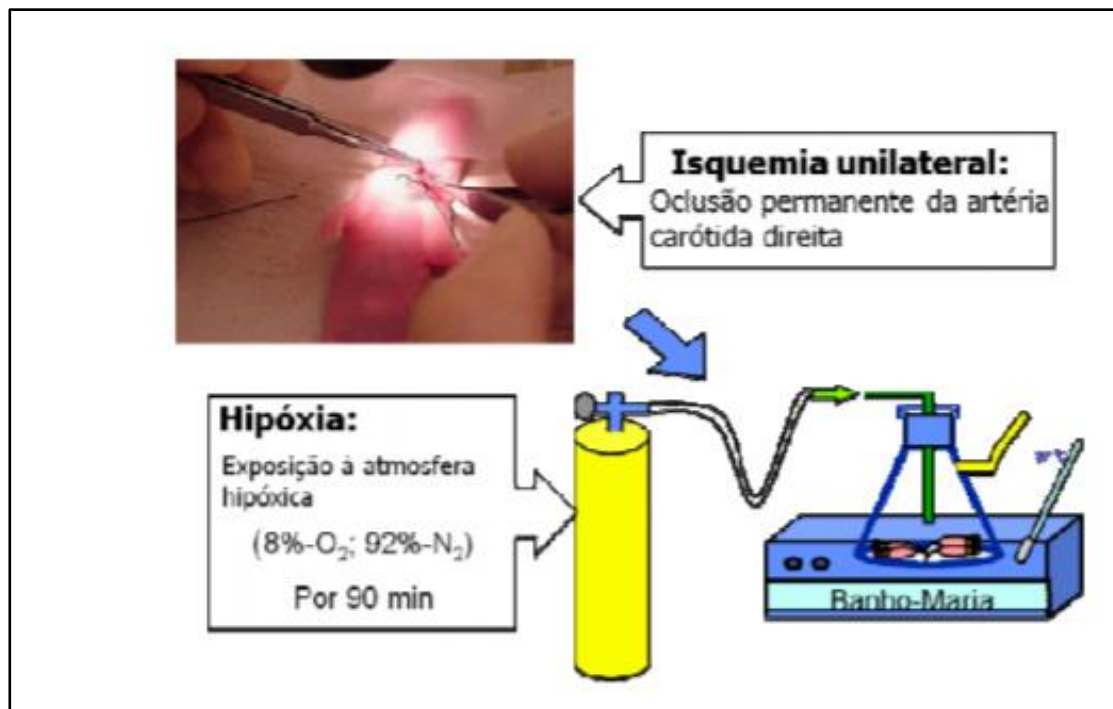
A família de proteínas que transportam glicose (GLUTs) é fundamental para manter a homeostase encefálica. O processo ocorre por difusão facilitada estando o transportador de glicose 1 (GLUT1) presente nas células endoteliais e pés astrocitários, estes, ligados a vasos sanguíneos (Leino *et al.*, 1997). O transporte de glicose consiste de forma significativa da ação de astrócito, componente da BHE (Molofsky *et al.*, 2012). Devido à seletividade da BHE e o reduzido estoque de carboidrato no encéfalo, a função e expressão de GLUTs é essencial no suprimento de nutrientes e solutos no encéfalo. Sendo assim, qualquer problema no mecanismo de expressão e/ou função afeta severamente o metabolismo energético e a homeostase do SNC (Shah *et al.*, 2012).

As proteínas de membrana que funcionam como canais de água são conhecidas como Aquaporinas (AQPs). Existem 6 tipos que são encontradas nos astrócitos (aquaporinas 1,3,4,5,8 e 9), sendo a principal encontrada no

SNC dos mamíferos a proteína aquaporina 4 (AQP-4). Essa proteína possui grande expressão nos pés astrocitários (Barbara *et al.*, 2010; Pardridge *et al.*, 1999). A região 1 do Corno de *Ammon* (CA1), por ser local de grande penetração de vasos sanguíneos no hipocampo, apresenta a maior expressão dos canais de aquaporina 4 (Hsu *et al.*, 2011). A AQP-4 e seus canais de água agem no edema vasogênico, que está associado à lesão hipóxico-isquêmica e a perda da integridade da BHE, removendo a água do parênquima cerebral (Francesca *et al.*, 2010). Em resumo, os dados da literatura demonstram unanimidade ao relatar que o evento de HI rompe a estrutura e prejudica a função da BHE (Chen *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Won *et al.*, 2011).

## *Modelo Animal de Hipóxia-Isquemia Encefálica Neonatal*

Inúmeros modelos experimentais são relatados na literatura para o estudo da HI encefálica neonatal. O mais utilizado é o modelo de Levine (1960) adaptado por Rice e cols (1981). Este modelo reproduz a lesão unilateral no hipocampo, estriado e córtex cerebral, mimetizando a lesão no hemisfério ipsilateral encontrada nos recém-nascidos humanos (Pereira *et al.*, 2007). O modelo de Levine-Rice consiste na oclusão permanente unilateral da artéria carótida comum dos animais, com posterior exposição à um ambiente hipóxico. A lesão ocorre no 7º dia de vida pós-natal, por considerar que o encéfalo dos ratos é histologicamente similar ao de crianças recém-nascidas a termo (Sanders *et al.*, 2005) (figura 4).



**Figura 4:** Modelo Experimental de Hipóxia-Isquemia Encefálica Neonatal (Levine (1960) adaptado por Rice (1981)).

As alterações cognitivas, morfológicas e bioquímicas encontradas em humanos podem ser reproduzidas através deste modelo (Arteni *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2008). Os resultados decorrentes deste modelo são: danos encefálicos e atrofia teciduais importantes no estriado, córtex sensorio motor e principalmente na região de CA1 do hipocampo (Levine 1960; Rice 1981; Pereira *et al.*, 2007; Schuch *et al.*, 2016; Carletti *et al.*, 2016; Miguel *et al.*, 2015).

Estudos recentes do nosso laboratório de pesquisa demonstraram que animais submetidos a este modelo experimental de lesão apresentam déficit de atenção (Miguel *et al.*, 2015) e insuficiência de memória declarativa (Rojas *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2008), espacial (Rojas *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2007 e 2008) e aversiva (Carletti *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2013; Arteni *et al.*, 2003).

Além disso, resultados de nossas pesquisas mostraram que o dano provocado pela lesão induz sequelas cognitivas, sensoriais e modificações moleculares alterando a função da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Arteni *et al.*, 2003; Schuch *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2009; Weis *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2015), declínio na densidade dos espinhos dendríticos (Rojas *et al.*, 2013) e atrofia da região CA1 do hipocampo (Pereira *et al.*, 2007).

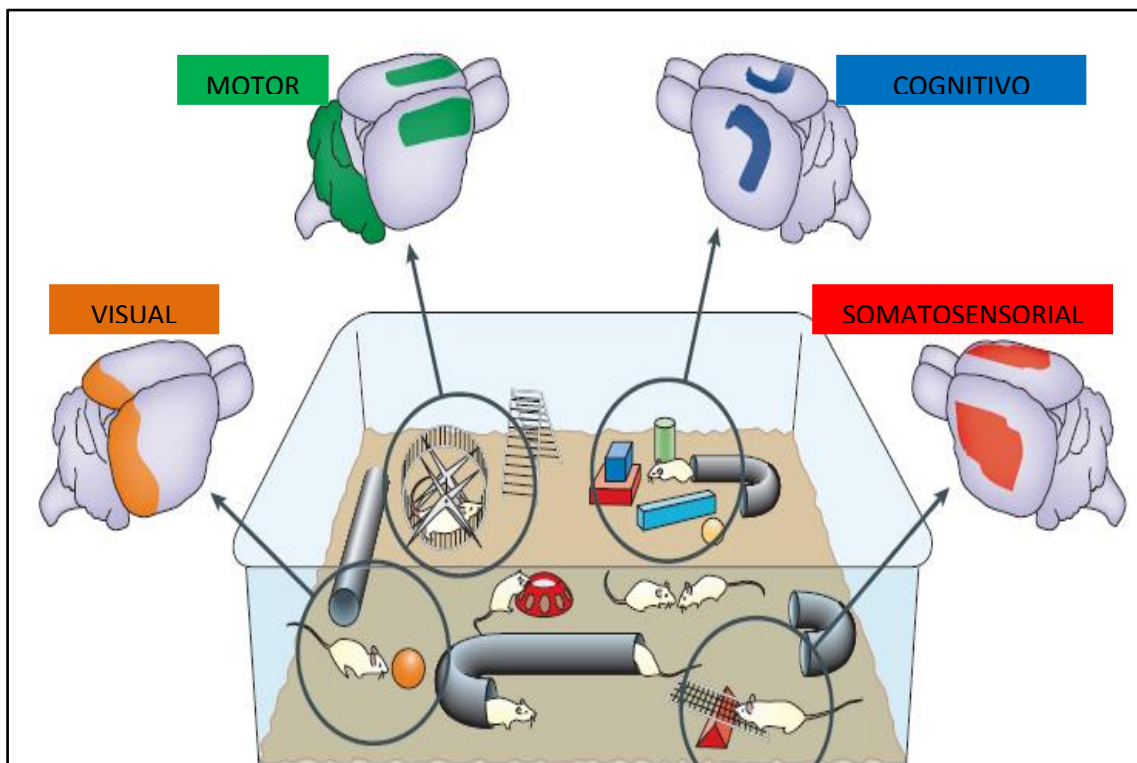
Assim sendo, podemos afirmar que os resultados encontrados no modelo experimental de HI encefálica neonatal proposto por Rice-Levine retratam a injúria encefálica e a deteriorização cognitiva-comportamental de forma correspondente aos achados em crianças com encefalopatia hipóxico-isquêmica.

## *Enriquecimento Ambiental*

Sabe-se que uma das intervenções terapêuticas não farmacológicas bastante utilizada é o enriquecimento ambiental (EA). Hebb em 1947, após observar roedores expostos ao enriquecimento ambiental, concluiu que o EA melhorava o desempenho de aprendizado e memória se comparado aos animais que não eram estimulados. Baseado neste estudo, diversas pesquisas envolvendo o EA vêm demonstrando efeitos na morfologia (Rojas *et al.*, 2013; Leggio *et al.*, 2005; Bruel-Jungerman *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 1999), estrutura molecular (Lambert *et al.*, 2005; Puurunen *et al.*, 2001; Ickes *et al.*, 2000; Faherty *et al.*, 2003) e nos processos cognitivos (Pereira *et al.*, 2007 e

2008; Rojas *et al.*, 2013; Van Praag *et al.*, 2000) em animais após a exposição a um ambiente enriquecido.

O EA é a exposição de animais a estímulos físicos e cognitivos somados a socialização com animais de outras ninhadas (Van Praag *et al.*, 2000; Nithianantharajah *et al.*, 2006; Will *et al.*, 2004) (figura 5).



**Figura 5:** Ilustração do Enriquecimento Ambiental (Nithianantharajah *et al.*,2006)

As gaiolas de EA são maiores que as caixas-padrão de moradia, proporcionando uma grande estimulação e interação social, pois há um número maior de animais. O EA se dá através de uma gama de “brinquedos” com as mais variadas formas e texturas, estimulando a atividade cognitiva. Soma-se a isso o acesso livre às rodas de corrida, rampas e possibilidade de escalada nas paredes laterais e tetos da gaiola, ofertando uma atividade física de forma

voluntária. Em suma, o EA fornece grandes estímulos visuais, auditivos e somatossensoriais através dos “brinquedos”, grande interação social, pois há mais e diferentes animais do qCOue na caixa moradia e a constante mudança de “brinquedos” oportuniza grande estimulação cognitiva (Van Praag *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2007 e 2008; Rojas *et al.*, 2013 e 2015) .

Hoje já se sabe que a exposição de roedores a variados estímulos, logo nos primeiros dias de vida é capaz de provocar modificações nos processos comportamentais e anatomofisiológicos que irão perdurar ao longo da vida (Pham *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2008). Mesmo conhecendo os efeitos benéficos e a função neuroprotetora do EA, a literatura é carente de estudos que relacionem a estimulação no EA com a HI encefálica neonatal. Para nosso conhecimento, os únicos dados publicados são resultados do nosso grupo de pesquisa. Já demonstramos a recuperação do déficit de memória espacial e aversiva pós HI em ratos avaliados na fase adulta (Pereira *et al.*, 2007; Rojas *et al.* 2013 e 2015) e o impedimento da perda de memória de reconhecimento de objetos em animais adolescentes expostos ao EA (Pereira *et al.*, 2008). Outros estudos do nosso laboratório demonstraram a eficácia na reversão do déficit de memória espacial e da diminuição da densidade dos espinhos dendríticos no hipocampo de ratos com HI estimulados em EA (Pereira *et al.*, 2007 e 2008; Rojas 2013).



*Justificativa*

A prática de estimulação tanto em crianças saudáveis bem como naquelas que dispõem de alguma seqüela cognitivo-comportamental é comumente utilizada na prática clínica, influenciando de forma elementar o processo complexo e contínuo que é o desenvolvimento infantil.

Indivíduos acometidos por lesões encefálicas progressivas, tal como HI apresentam elevados índices de incapacidades, gerando repercussões sociais e econômicas, acrescido de uma condição individual que muitas vezes o torna dependente em todas as suas atividades de vida diária.

O EA é uma alternativa de baixo custo para a família e / ou sociedade. A estimulação somatosensorial, cognitiva, motora e visual ocasiona neuroplasticidade destes indivíduos com os mais variados déficits encefálicos, sendo eficaz na retomada de maior e melhor qualidade de vida destes indivíduos.

Em modelos animais já está comprovado o efeito benéfico do EA em encéfalos sadios e na reversão de déficits cognitivos e comportamentais, tal qual, o papel neuroprotetor após o dano em estruturas encefálicas causados pela hipóxia-isquemia encefálica neonatal.

Entretanto, inúmeras indagações relacionadas ao mecanismo da lesão, as reações inflamatórias e respostas estruturais do encéfalo, desencadeados após a hipóxia-isquemia encefálica neonatal, não estão integralmente respondidas.

Do mesmo modo, os efeitos e o funcionamento da estimulação precoce necessitam ser melhor explicados, o que fundamenta a realização desta tese.

## Objetivos

## OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos comportamentais de ansiedade e memória aversiva, analisar parâmetros neuroinflamatórios na região CA1 do hipocampo e investigar a estrutura da barreira hematoencefálica após a exposição precoce ao enriquecimento ambiental em ratos Wistar submetidos à hipóxia-isquemia encefálica neonatal.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em animais de 8DPN / 22DPN / 60DPN submetidos à HI e EA precoce:

Avaliar a integralidade da BHE quantificando as proteínas Ocludina,  $\beta$ -Catenina, Conexina-43, Aquaporina-4, GLUT-1 e GFAP.

Analisar a permeabilidade da BHE através da coloração por corante azul de Evans;

Estudar as alterações de densidade astrocitária – GFAP (22 e 60 DPN).

Em animais de 60 DPN submetidos à HI e EA precoce:

Verificar a resposta inflamatória no hipocampo mensurando IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ;

Aferir as alterações de densidade da microglia – Iba-1 no hipocampo;

Observar comportamentos relacionados a ansiedade.

# *Capítulo 1*

## **ENVIRONMENTAL ENRICHMENT ATTENUATES THE BLOOD BRAIN BARRIER DYSFUNCTION INDUCED BY THE NEONATAL HYPOXIA-ISCHEMIA**

Ramiro Diaz, Patrícia Maidana Miguel, Bruna Ferrary Deniz, Heloísa Deola Confortim, Silvia Barbosa, Monique Culturato Padilha Mendonça, Maria Alice da Cruz-Höfling, Lenir Orlandi Pereira.

Artigo publicado na International Journal of Developmental Neuroscience



## Environmental enrichment attenuates the blood brain barrier dysfunction induced by the neonatal hypoxia-ischemia



Ramiro Diaz<sup>a</sup>, Patrícia Maidana Miguel<sup>a</sup>, Bruna Ferrary Deniz<sup>a</sup>, Heloísa Deola Confortim<sup>a</sup>, Sílvia Barbosa<sup>a,b</sup>, Monique Culturato Padilha Mendonça<sup>c,d</sup>, Maria Alice da Cruz-Höfling<sup>c,d</sup>, Lenir Orlandi Pereira<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 March 2016

Received in revised form 8 June 2016

Accepted 16 June 2016

Available online 17 June 2016

#### Keywords:

Neonatal asphyxia

Enriched environment

Endothelial junctions

Brain

Perinatal brain damage

Neuroprotection

### ABSTRACT

Environmental enrichment (EE) is considered an efficient neuroprotector against neonatal hypoxia-ischemia (HI). Nevertheless, the mechanisms involved are not yet clear. In this context, the aim of this study was to investigate the effects of neonatal HI and environmental stimulation in the hippocampus of rats at 3 different time points (PND 8, 22 and 60), evaluating some aspects of BBB structure and function. Seven-day-old Wistar rats were divided into four groups: a control group maintained in a standard environment (CTSE), a control group maintained in an enrichment environment (CTEE), an HI group maintained in a standard environment (HISE) and an HI group maintained in an enrichment environment (HIEE). At the 7th postnatal day (PND), rats were submitted to the Levine-Rice model of neonatal HI. This method consists of permanent occlusion of the right common carotid artery with subsequent exposure to hypoxia. Rats from CTEE and HIEE were stimulated with environmental enrichment. The EE protocol started 24 h after HI, in which pup rats with their dams were stimulated in a maintained EE (PND 8–22). Subsequently, animals were submitted to daily EE (1 h/day, PND 23–60). The expression of some proteins involved in BBB structure ( $\beta$ -catenin, occludin, connexin-43, aquaporin-4, glut-1 and GFAP) were quantified by western blotting in the hippocampi of rats in three periods, at PND 8, 22 and 60. The BBB permeability and integrity was assessed by Evans blue staining and the immunohistochemistry for GFAP in the CA1 region of the hippocampus were also performed. The results showed an HI-induced decreased occludin expression at PND 22 and low levels of occludin,  $\beta$ -catenin and GFAP at PND 60 in the hippocampus of the hypoxic-ischemic rats. Interestingly, in young and adult rats, EE reversed these effects. Evans blue extravasation into the brain parenchyma confirmed the BBB dysfunction brought on by HI. No differences were observed at PND 8, probably due to the immaturity of the BBB at this age. The present study makes an important contribution to understanding the mechanism of the hypoxic-ischemic brain damage and also to presents, for the first time, the recovery of BBB dysfunction as a possible pathway for the protective effect of EE.

© 2016 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** AJs, adherens junctions; ANOVA, analysis of variance; BBB, blood-brain barrier; CTEE, control exposed to environmental enrichment; CTSE, control maintained in standard environment; EE, environmental enrichment; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GLUT1, glucose transporter 1; HI, hypoxia-ischemia; HIEE, hypoxia-ischemia exposed to environmental enrichment; HISE, hypoxia-ischemia maintained in standard environment; PND, postnatal day; TJs, tight junctions.

\* Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 107, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

**E-mail addresses:** [rdfsioterapia@gmail.com](mailto:rdfsioterapia@gmail.com) (R. Diaz), [patymiguel@msn.com](mailto:patymiguel@msn.com) (P.M. Miguel), [bruninhaferrary@hotmail.com](mailto:bruninhaferrary@hotmail.com) (B.F. Deniz), [heloisadconfortim@gmail.com](mailto:heloisadconfortim@gmail.com) (H.D. Confortim), [silvia.barbosa@ufrgs.br](mailto:silvia.barbosa@ufrgs.br) (S. Barbosa), [mo.padilha@hotmail.com](mailto:mo.padilha@hotmail.com) (M.C.P. Mendonça), [hofling@unicamp.br](mailto:hofling@unicamp.br) (M.A. da Cruz-Höfling), [lenir.orlandi@ufrgs.br](mailto:lenir.orlandi@ufrgs.br) (L.O. Pereira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.06.006>

0736-5748/© 2016 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Neonatal encephalopathy has an incidence rate around 1.5 per 1000 live births. It is estimated that 30% of cases occur in developed countries and 60% of cases occur in developing countries, associated with intrapartum hypoxia-ischemia (HI) (Kurinczuk et al., 2010). The resulting brain damage is frequently associated with cognitive and motor deficits, which are maintained throughout life (Chan et al., 2010, 2015; Johnston et al., 2001; Van de Looij et al., 2015; Yang et al., 2009). The main mechanisms from hypoxia involve cell death and energy depletion, followed by reperfusion, oxidative stress and glutamatergic excitotoxicity. In the sequence, a process of persistent inflammation and epigenetic changes can cause a delay in glial cell maturation, impaired neurogenesis and synaptogenesis with delayed cell death, primarily affecting the hippocampus and other cortical brain structures (Fleiss and Gressens, 2012; Juul and Ferriero 2014).

There is consensus that brain ischemic events disrupt blood-brain barrier (BBB) structure and function (Chen et al., 2015; Li et al., 2015; Won et al., 2011). The existence of this functional barrier in the cerebrovascular system is crucial for regulating the exchange of molecules between the blood and the brain (Boulay et al., 2015). It is also important to preserve the homeostasis of the neural microenvironment necessary for proper neural communication and survival (Abbott et al., 2006). The BBB is constituted by a physical barrier formed by a unique endothelial junctional complex (with adherens junctions and tight junctions) and a functional molecular barrier composed of membrane receptors and transporters and vesicular trafficking mechanisms (Abbott et al., 2010). The tight junctions (TJs) comprise the proteins occludin and claudin and are responsible for controlling paracellular transport, while the adherens junctions (AJs) have the role of supporting TJs by providing structural integrity and attachment between endothelial cells (Abbott et al., 2010). In the formation of AJs, transmembrane cadherin proteins are linked to the cell cytoplasm by catenin proteins (Wolburg and Lippoldt, 2002). Additionally, perivascular astrocytic end feet processes establish strong association with the endothelium of brain capillaries, being such association fundamental for the regulation and maintenance of the BBB functionality. Such association allows the astrocytic perivascular processes to distribute the glucose that is taken by the barrier-type endothelium that lines the brain capillaries from peripheral circulation to be delivered into neuropile. The distribution of glucose by means of the astroglial network is mediated by gap junction channels whose main former protein in astrocytes is connexin 43 (Persidsky et al., 2006; Rouach et al., 2008). Astrocytes also contribute to barrier function under physiological conditions and support the main components of the barrier in cases of breakdown (Wolburg et al., 2009). Astrocytes also contribute to depositing the perivascular extracellular matrix, i.e., the basal lamina (Menezes et al., 2014), which is directly connected to the functional barrier endothelium. Illustrating this connection, it was demonstrated that disruption of the basal lamina results in an altered distribution of aquaporin 4 (AQP4), a water channel present at the adluminal glial end feet membrane that controls the flux of water between the blood and the brain and is responsible for edema formation and resolution in the brain (Nagelhus and Ottersen, 2013). Although it is frequently cited that the BBB is altered after neonatal HI, only a small number of studies have explored this idea. It has been shown that damage to the structure and function of the BBB occurs early, starting 2 h after HI, with extravasation of immunoglobulin G (Lee et al., 2012). Wu et al. (2013) and Muramatsu et al. (1997) also identified extravascular immunoglobulin G in hypoxic-ischemic rats, indicating increased BBB permeability. BBB leakage was also evaluated by albumin extravasation in rats submitted to neonatal HI at PND 12 (Brochu et al., 2011). Additionally, Vannucci et al. (1998) identified

increased levels of GLUT-1 as an acute response to neonatal HI. It is important to note that none of these studies had the BBB as the main focus. This is a contradictory finding, given the crucial importance of this barrier for brain function and preservation, particularly under disease conditions.

We have investigated the impact of the environmental enrichment (EE) on the consequences of neonatal HI in rats. It was demonstrated that cognitive dysfunction, including spatial and aversive memory, was recovered in adult rats submitted to EE after HI (Pereira et al., 2007; Rojas et al., 2013, 2015); also, in adolescent rats, a brief period of environmental stimulus prevented object recognition memory impairment (Pereira et al., 2008). These neuroprotective functional effects were associated with dendritic spine density preservation and the recovery of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity (Rojas et al., 2013, 2015). Taken together, these findings give further support for the use of environmental stimulation after neonatal brain damage. However, the mechanisms of this effect are poorly understood.

The present study is founded on the following statements. First, it is notable that hypoxic-ischemic events are clinically relevant and it is crucial investigate therapeutic strategies, their advantages and the mechanisms involved. Second, our previous studies strongly suggest that EE is a good opportunity for the prevention and/or treatment for neonatal brain damage. Finally, there is poor comprehension about the effects of neonatal HI on the BBB during development, and there are no reports on the effects of EE. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of neonatal HI and environmental stimulation in the hippocampus of rats at 3 time points (PND 8, 22 and 60), evaluating some aspects of BBB endothelium structure and function, such as the expression of junctional proteins occludin and  $\beta$ -catenin, and GLUT-1 transporter (also present in astrocytes) and factors related to astrocytes and their functions-expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), 43 (Cx43) and AQP4. Although a few studies have assessed the functionality of the barrier following hypoxic-ischemic injury, we focused on the analysis of alterations to BBB components to understand its function and/or dysfunction. We hypothesized that HI will result in BBB disruption, which can be reversed and/or alleviated by environmental stimulation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male and female Wistar rats were obtained from the Central Animal House of the Institute of Basic Health Sciences of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. They were maintained in a temperature-controlled room (21 ± 2 °C), on a 12/12 h light/dark cycle, with food and water available *ad libitum*. On the 7th postnatal day (PND), the animals were randomly assigned to four experimental groups: (1) control, maintained in a standard environment (CTSE); (2) control submitted to EE (CTEE); (3) hypoxia-ischemia and maintained in standard environment (HISE); and (4) hypoxia-ischemia submitted to EE (HIEE). Rats were euthanized at 3 time points (PND 8, 22 and 60) for western blotting and Blue Evans analyses and for immunohistochemistry at PND 22 and 60. For each time point were used 3 female and 3 male rats per group. A pool of two samples was used for western blotting analyses due to small size of hippocampus (atrophy consequent to HI).

All procedures were performed in accordance with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by National Institute of Health (USA). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal Rio Grande do Sul, Brazil (n.19863).

## 2.2. Hypoxia-ischemia

The Levine method (1960), as modified by Rice et al. (1981), was utilized to produce unilateral brain injury in neonatal rats. At PND 7, animals were anesthetized with halothane and the right common carotid artery was identified through a longitudinal neck incision, isolated and permanently occluded. Animals were then allowed to recover for 15 min under a heating lamp and returned to their dams. After 3 h, they were exposed for 90 min to a hypoxic atmosphere (8% oxygen and 92% nitrogen) in a chamber partially immersed in a 37 °C water bath (Arteni et al., 2003; Pereira et al., 2009). Immediately after the HI procedure, animals were returned to their home cages. Controls were sham-operated, *i.e.*, they were submitted to anesthesia and the neck incision, but did not receive arterial occlusion or hypoxia.

## 2.3. Environmental enrichment

The environmental enrichment paradigm is a combination of physical exercise, social interaction and continuous exposure to learning tasks (van Praag et al., 2000). In this study, we applied an association of early maintained stimulation (from PND 8 to PND 22) and also a daily enriched environment (from PND 23 to PND 60) based on our previous studies (Pereira et al., 2008; Pereira et al., 2009; Rojas et al., 2013). The first EE protocol is early stimulation (PND 8–22), where the animals with their dams were kept continuously in enriched cages (30 × 20 × 20 cm). After this period, daily enrichment was conducted (PND 23–60, 6 days/week, 1 h/day, in groups of 7–10 animals). The cage for daily enrichment was a large home cage (40 × 60 × 90 cm) with three different floors connected by ramps. Rats from the non-enriched groups were removed from their home cages and moved to another standard cage during the other animals' enrichment period. At the end of each EE period (at PND 22 and 60) and also 24 h after the HI procedure (PND 8), collections for morphological analysis and the quantification of proteins were performed.

## 2.4. Western blotting

Six animals per group were anesthetized and killed by decapitation at three time points: 24 h after HI (PND 8), after a short period (14 days) of maintained EE (PND 22) and after a long period (37 days) of EE (PND 60). For the western blotting analysis, the right and left hippocampi were isolated and homogenized in an extraction cocktail (10 mM EDTA, 2 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NaVO<sub>4</sub>, 10 Ag of aprotinin/ml and 100 mM Tris, pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 3000g for 10 min and the supernatants were collected and stored at –70 °C until used for immunoblotting. Protein was extracted from the hippocampus as previously described (Mendonça et al., 2013). After electrotransfer, the membranes were incubated with 5% skimmed milk to block non-specific sites, followed by washing with TBS-T (0.1% Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20, pH 7.4). Subsequently, the membranes were incubated with primary antibodies against  $\beta$ -catenin (1:500; sc-7963, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), occludin (1:500; sc-5562, Santa Cruz), connexin 43 (1:500; sc-9059, Santa Cruz), GLUT-1 (1:500; sc-7903, Santa Cruz), GFAP (1:500; zo334, Dako Cytomation, CA, USA) and aquaporin 4 (1:1000; sc-20812, Santa Cruz), followed by washing with TBS-T and incubation with an HRP-labeled anti-mouse (for anti- $\beta$ -catenin and anti- $\beta$ -actin) or anti-rabbit (anti-occludin, Cx43, GLUT-1, GFAP) secondary antibody (1:1000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Immunoreactive bands were visualized using a chemiluminescence kit (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). The blots were subsequently stripped and probed with anti- $\beta$ -actin (1:1000;

A2228, Sigma Aldrich);  $\beta$ -actin was used as an internal control to monitor protein loading, the efficiency of blot transfer and non-specific changes in protein levels. The luminescent signal of each band was captured with a G:BoxiChemi camera (Syngene, Cambridge, UK) and band intensity was quantified using ImageJ 1.45s software (NIH, Bethesda, MD, USA). Data are presented as a percentage of control values.

## 2.5. Evans blue staining

BBB function was examined by assessing Evans blue dye extravasation (Nag, 2003). Briefly, 10 min prior the end of each time course, Evans blue solution was infused (10 mg/kg of 2% dye in 0.9% NaCl) intravenously through the tail vein. Animals were killed with an overdose of anesthetic and the brains were rapidly removed and photographed. Images were observed to assess dye extravasation from the peripheral circulation into the brain parenchyma, which is considered indicative of BBB disruption.

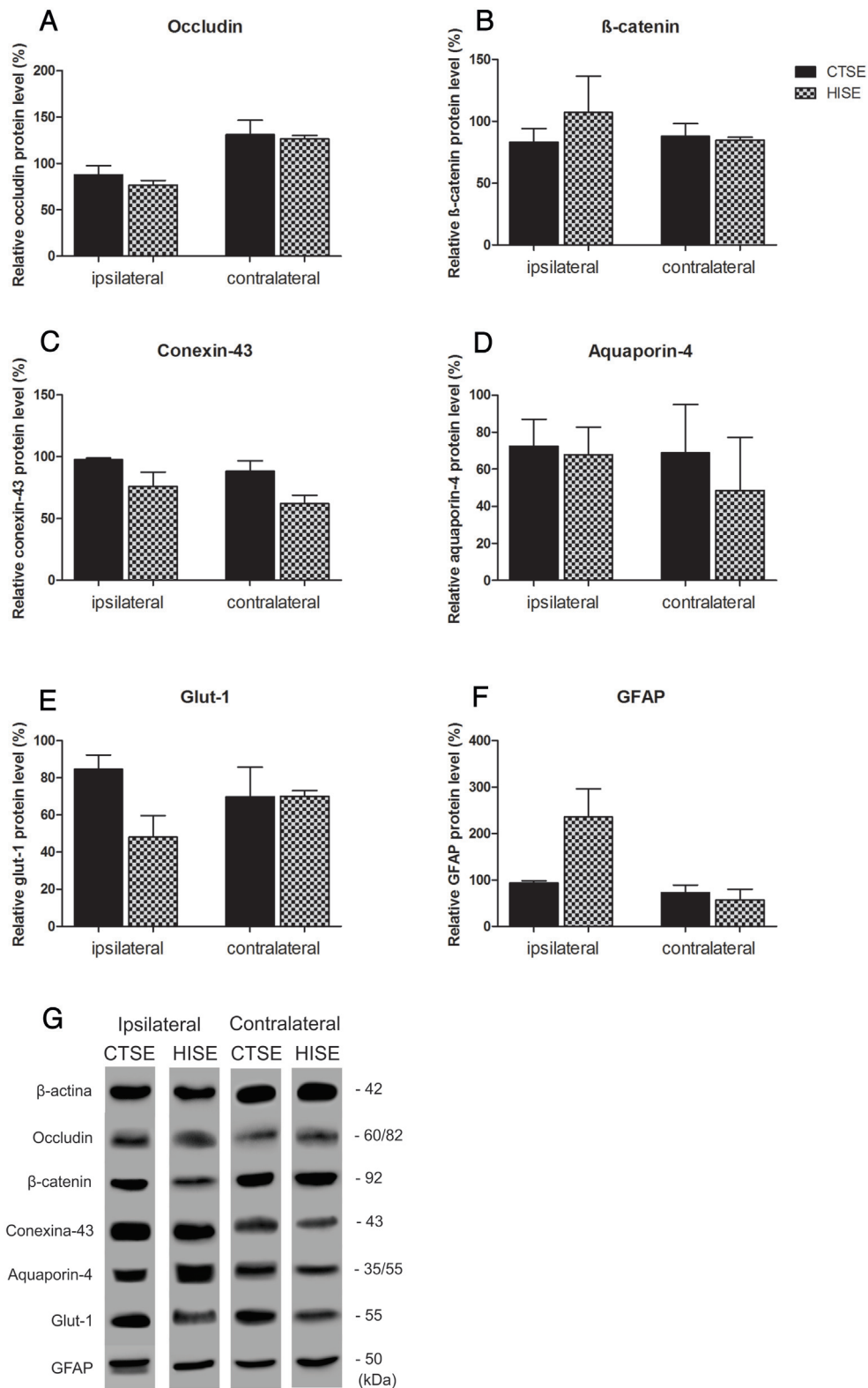
## 2.6. Immunohistochemistry for GFAP

Animals were euthanized using ketamine hydrochloride (Cetamin<sup>®</sup>) and xylazine hydrochloride (Xilazin<sup>®</sup>), then transcardially perfused with 0.9% saline solution followed by a fixative solution containing 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4). Then, the brains were cryoprotected in 30% sucrose solution and consecutive coronal sections of the dorsal hippocampus (40  $\mu$ m) were cut at –18 °C with a Leica 1900 cryostat (Heidelberg, Germany). For immunohistochemical investigation, sections were rinsed in PBS and endogenous peroxidase was inactivated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluted in PBS, then washed with PBS-Tx. Sections were then incubated with monoclonal rabbit anti-GFAP antibody (DAKO,UK) diluted 1:1000 in 3% PBS-Tx at 4 °C overnight. Sections were incubated with a rabbit anti-mouse IgG secondary antibody conjugated with peroxidase (Sigma Aldrich) diluted 1:500 in PBS-Tx at room temperature for 2 h. To visualize immunoreactivity, a 0.06% solution of 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma Aldrich) in PBS and 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was employed for 5 min. Finally, the sections were washed in PBS, dehydrated in ethanol series, cleared with xylene and covered in synthetic Canada Balsam (Chemical Reaction, Brazil) and then coverslipped. The primary antibody was omitted in the negative control. All samples were processed at the same time and incubated for the same period. All conditions and magnifications were kept constant during the capture process. For each rat, 32 images (200x) of the CA1 hippocampus on both hemispheres were obtained with a Nikon E600 light microscope coupled to a USB 2.0 Digital Camera Eyepiece. Images were processed and analyzed with Image-Pro Plus 6.0 software (Wayne Rasband, NIH, USA). Briefly, RGB (24-bits) color images (640 × 480 pixels) were converted to 8-bit grayscale images (0–255 Gy levels). Three square areas of interest (AOI) were set for the images of the CA1 hippocampus (7041.711  $\mu$ m<sup>2</sup>). The optical density (OD) of each AOI was automatically calculated by the software.

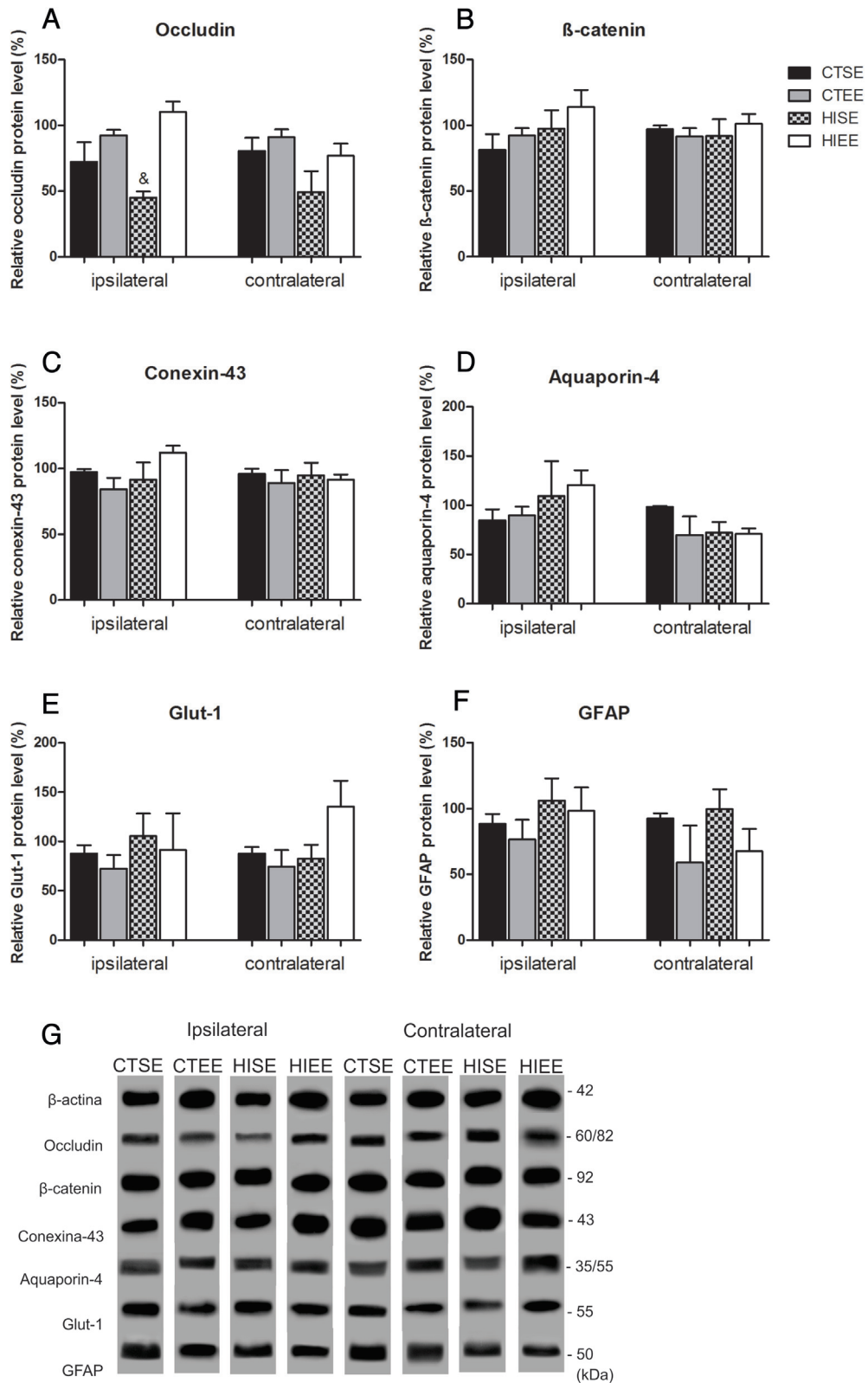
## 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis of the results on PND 8 was performed using Student's *t*-test and on PND 22 and 60 analyses was conducted using two-way analysis of variance (ANOVA) with lesion and environment as the independent variables. The analysis was followed by *post-hoc* Tukey's test for multiple comparisons, when necessary. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Probability values less than 5% were considered significant. All statistical analyses were performed using the Statistica<sup>®</sup> software package.

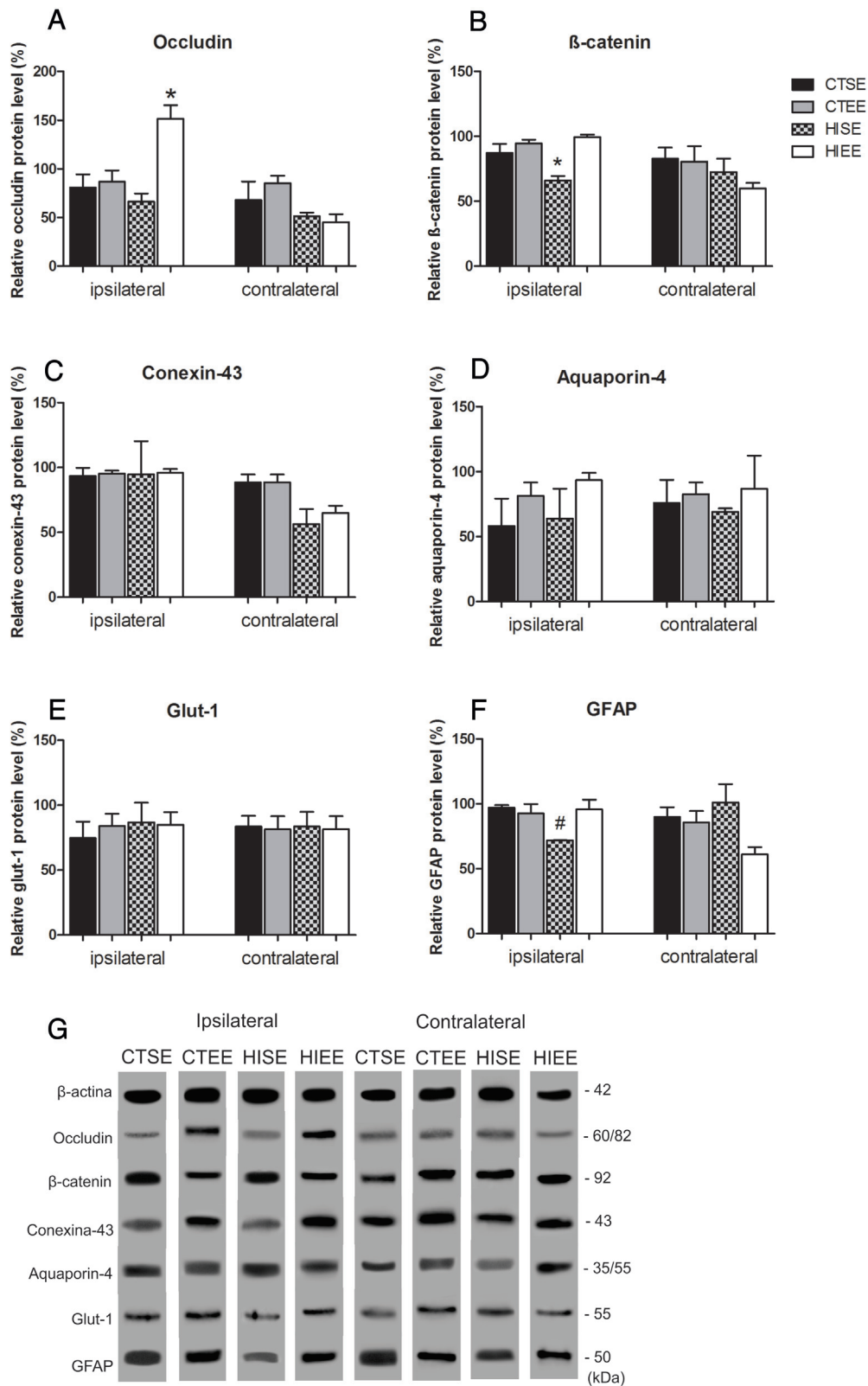




**Fig. 1.** Expression of proteins of the BBB at PND 8 in the left and right hippocampus. Data are means  $\pm$  S.E.M (A–F) and representative bands of each protein (G). No significant difference was identified. Student's *t*-test,  $p > 0.05$ .  $n = 3$  female and 3 male rats per group.



**Fig. 2.** Expression of proteins of the BBB the PND 22 in the left and right hippocampus. Data are means ± S.E.M (A-F) and representative bands of each protein (G). A: & difference of the occludin expression between HISE and the CTEE and HIEE groups, in the ipsilateral hippocampus. ANOVA followed by the Tukey's test,  $p < 0.05$ .  $n = 3$  female and 3 male rats per group.



**Fig. 3.** Expression of proteins of the BBB at PND 60 in the left and right hippocampus. Data are means  $\pm$  S.E.M (A–F) and representative bands of each protein (G). A: \* occludin expression in the HIEE group is different from all other groups in the right hippocampus; B:  $\beta$ -Catenin expression in the HISE group is different from all other groups in the right hippocampus; F: # GFAP expression in the HISE group is different from CTSE group in the right hippocampus. ANOVA followed by the Tukey's test,  $p < 0.05$ .  $n = 3$  female and 3 male rats per group.

### 3. Results

#### 3.1. BBB structure at PND 8 – western blotting analysis

Student's *t*-test revealed that none of the studied proteins, either in the ipsilateral or in the contralateral hippocampus, were different between groups (sham vs. HI) at PND 8 (Fig. 1). This result likely illustrates BBB immaturity at this stage of development. Only a tendency for decreased levels of GLUT-1 ( $t=2.64$ ,  $p=0.06$ ) and increased of GFAP ( $t=2.33$ ,  $p=0.08$ ) was identified in the right hippocampus (ipsilateral) and of Cx43 ( $t=2.42$ ,  $p=0.07$ ) in the left hippocampus in the HI group compared with the controls.

#### 3.2. BBB structure at PND 22 – western blotting analysis

Two-way ANOVA demonstrated that environment ( $F(1,8)=22.64$ ,  $p=0.001$ ) and lesion  $\times$  environment interaction ( $F(1,8)=6.3$ ,  $p=0.04$ ) reached significance for occludin expression in the ipsilateral hippocampus (Fig. 2A). The Tukey test revealed that the HISE group had lower occludin levels compared to the CTEE ( $p=0.023$ ) and HIEE ( $p=0.004$ ) groups. In this analysis, the HIEE group had the highest levels of occludin, i.e. the protein expression decrease, consequent to HI, was significantly reversed by a short period of environmental stimulation. No effect was identified on occludin levels in the left hippocampus. Moreover, no differences were found when  $\beta$ -catenin, Cx43, AQP4, GLUT-1 and GFAP levels were evaluated, in both hemispheres (Fig. 2B–F).

#### 3.3. BBB structure at PND 60 – western blotting analysis

Considering occludin expression in the right hippocampus at PND 60, the main significant effects were observed for environment ( $F(1,8)=14.24$ ,  $p=0.005$ ), the lesion  $\times$  environment interaction ( $F(1,8)=10.66$ ,  $p=0.01$ ) and a trend of lesion effect was also identified ( $F(1,8)=0.07$ ,  $p=0.07$ ). The *post-hoc* test demonstrated a decrease in occludin expression in the HISE group compared to the HIEE group ( $p=0.004$ ). We observed a compensatory effect: the HIEE group had higher levels of occludin, compared to all other groups (Fig. 3A;  $p<0.05$ ). Evaluating the left hippocampus, a significant effect was observed considering the lesion factor ( $F(1,8)=6.54$ ,  $p=0.03$ ) with decreased occludin levels in both HI groups. In harmony with this effect, the two-way ANOVA followed by the Tukey test indicated that the HISE group had decreased expression of  $\beta$ -catenin in the right hippocampus, compared to all other groups.  $\beta$ -catenin resulted in significant effect on environment ( $F(1,8)=23.44$ ,  $p=0.001$ ) and on lesion  $\times$  environment interaction ( $F(1,8)=9.8$ ,  $p=0.01$ ). Interestingly, the HIEE group had a similar  $\beta$ -catenin level, compared to the controls (Fig. 3B). This result reinforces the idea that HI causes a disruption in BBB structure and EE is effective at reversing this damage. In accordance with this statement, data analysis on GFAP expression indicated a significant effect of the lesion  $\times$  environment interaction ( $F(1,8)=7.05$ ,  $p=0.03$ ) and a tendency for lesion ( $F(1,8)=4.29$ ,  $p=0.07$ ) and environment ( $F(1,8)=3.27$ ,  $p=0.10$ ) in the right hippocampus. The hypoxic-ischemic event resulted in low expression of GFAP, which was reversed by the enriched environment (Fig. 3F). No effect was observed in the left hippocampus and, in the same way, Cx43, AQP4 and GLUT-1 levels were not altered by the HI or EE procedures (Fig. 3C–E).

#### 3.4. Evans blue staining

Evans Blue was systemically injected into the PND 8, 22 and 60 and brain images were captured for illustration of the permeability through the BBB and for the assessment of BBB integrity (Fig. 4).

At PND 8, Evans blue extravasation was identified in both CT and HI groups. This fact indicates the immaturity of BBB structure and function at this age. In addition, it was possible identify that the HI group seemed to have more expressive BBB dysfunction, since this group visually had greater staining of the brain by Evans blue, compared to the CT group (Fig. 4A).

At PND 22, the control group (CTSE) was found to have little stain extravasation, indicating that the BBB function although in great extension preserved remains to a certain degree permeable; in both HI groups, slight Evans blue leakage was observed throughout the brain parenchyma (Fig. 4B).

At PND 60, it was possible to note three different patterns of BBB function: control with the typical clear aspect of brain tissue, HISE rats with apparent Evans blue extravasation and HIEE animals demonstrating a more preserved BBB function, similar to control (Fig. 4C).

#### 3.5. Immunohistochemistry for GFAP

For a better understanding of astrocyte response to injury/hypoxia and environment enrichment, immunohistochemistry for GFAP was performed. Given the significant hippocampal atrophy and/or absence of the CA1 region on the side ipsilateral to the ischemia, only the contralateral hippocampus was evaluated at PND 22 and PND 60.

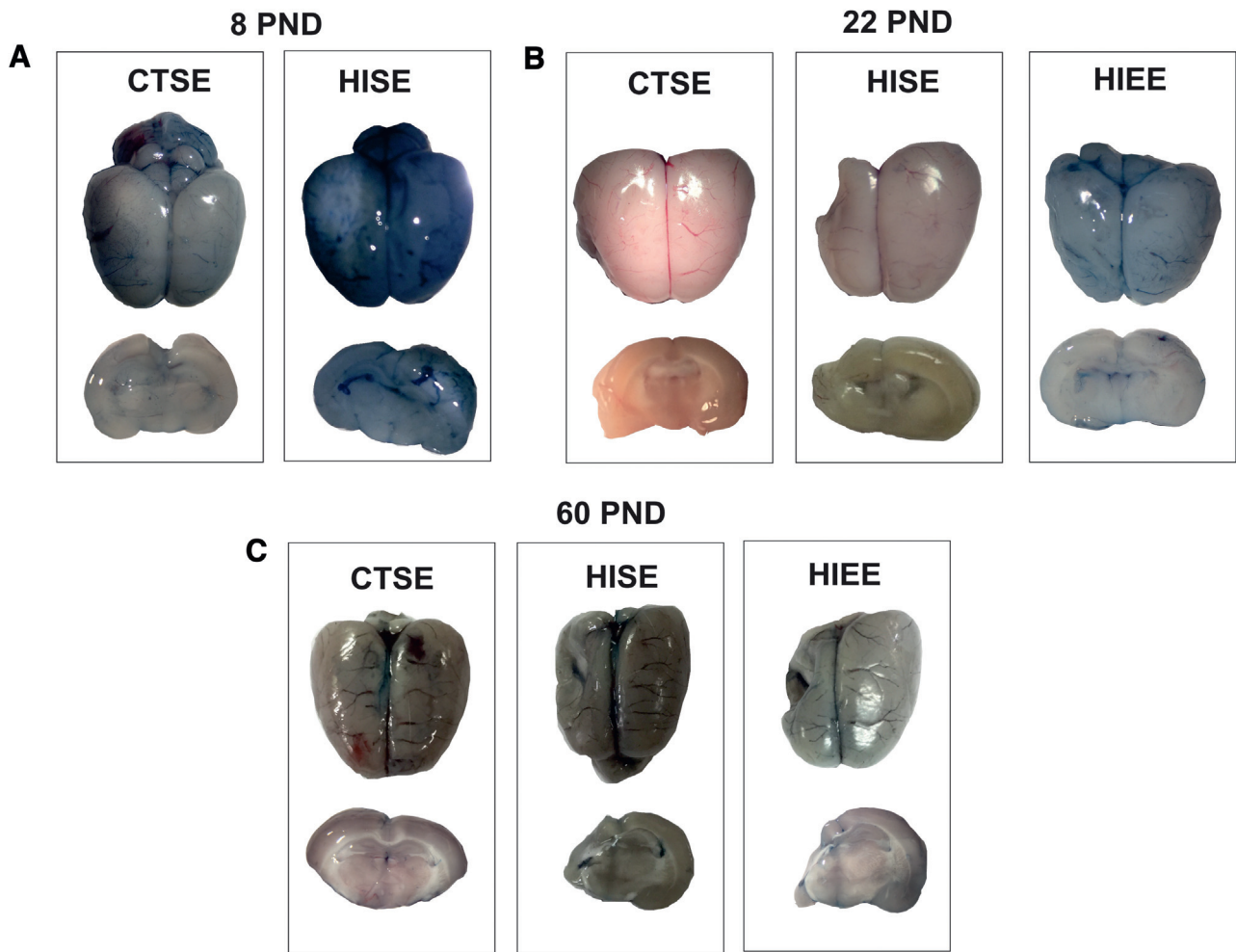
Evaluating the hippocampus of rats euthanatized at PND 22 (Fig. 5A), two-way ANOVA indicated that neither lesion ( $F(1,20)=0.04$ ,  $p=0.83$ ) nor environment ( $F(1,20)=0.95$ ,  $p=0.34$ ) resulted in significant differences between groups. Likewise, immunohistochemistry for GFAP in the contralateral hippocampus was not changed by HI ( $F(1,20)=1.19$ ,  $p=0.29$ ) or EE ( $F(1,20)=0.02$ ,  $p=0.87$ ) in rats at the PND 60 (Fig. 5B).

### 4. Discussion

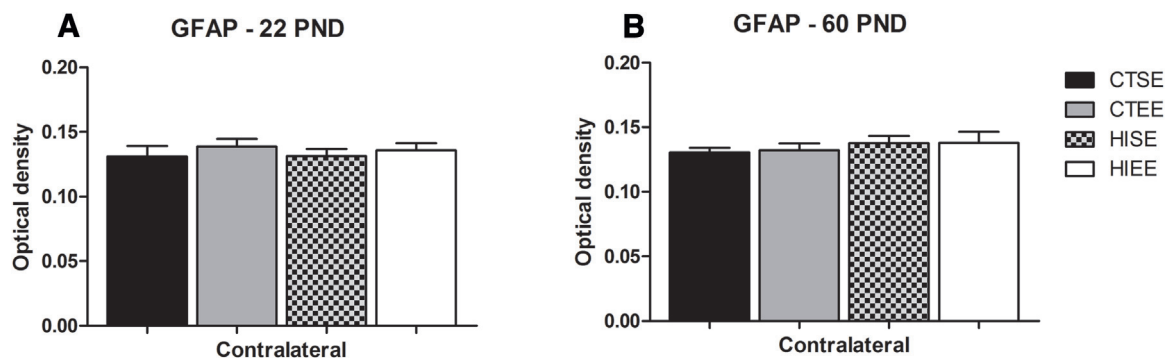
This study was designed to investigate the hippocampal BBB structure in rats that had suffered neonatal HI and were stimulated in an enriched environment. Twenty-four hours after HI, at PND 8, no substantial effects were identified in the evaluated proteins or Evans blue staining. Following the investigation, in young animals, at PND 22, a decrease in occludin expression was identified consequent to HI, which was reversed by EE. In adult rats, at PND 60, occludin expression was maintained, with a decrease in the hippocampus ipsilateral to the arterial occlusion. Decreased  $\beta$ -catenin and GFAP expression was also identified in HI rats. Confirming our hypothesis, environmental stimulation reversed BBB dysfunction. This is the first study showing a wide spectrum of structural changes to the BBB after neonatal HI, with an evaluation of several proteins at different ages and demonstrating the protective effects of EE.

### 5. BBB dysfunction in the neonatal HI

The importance of the BBB has been well-documented in physiological and pathological conditions such as brain ischemia, dementia and Parkinson's disease (Abbott, 2013; Cardoso et al., 2010; Hay et al., 2015; Krueger et al., 2015; Lee and Pienaar, 2014). Such dysfunction has a strong relationship with damage to the neuropil and disturbed brain function (Wolburg and Lippoldt, 2002). Surprisingly few studies have investigated the role of BBB dysfunction in the pathogenesis of neonatal HI (Brochu et al., 2011; Lee et al., 2012; Wu et al., 2013), and none of them has specifically focused on the BBB structure after HI, considering endothelial and astrocyte components. This is the first study reporting on this subject with observations of the structural aspects of the BBB in dif-



**Fig. 4.** View of the whole brain after infusion with Evans blue dye at PND 8 (A), PND 22 (B) and PND 60 (C). In A, it is possible to observe an Evans blue extravasation in both CT and HI groups at PND 8. In B, we can note that control group has little stain extravasation but in both HI groups, slight Evans blue leakage was observed throughout the brain at PND 22. Image C shows that, at PND 60, there were three different patterns of BBB function: control with the typical clear aspect of brain tissue, HISE rats with apparent Evans blue extravasation and HIEE animals demonstrating a more preserved BBB function, similar to control. Illustrative images; 2 rats per group were used.



**Fig. 5.** Immunohistochemistry for GFAP at PND 22 (A) and 60 (B) in the left hippocampal CA1 region. Data are means  $\pm$  S.E.M. ANOVA followed by the Tukey's test,  $p > 0.05$ .  $n = 3$  female and 3 male rats per group.

ferent phases in the development of rats submitted to a neonatal HI event.

We studied the proteins of the junctional complex of endothelial cells, some proteins involved in transport functions, and GFAP in the hippocampus. We also assessed Evans blue extravasation into the brain parenchyma 24 h after the HI event, at PND 8. The hippocampus is commonly investigated because of its vulnerability to ischemic events (Pereira et al., 2007; Rojas et al., 2013).

The protein expression of occludin,  $\beta$ -catenin, connexin 43, GLUT 1, aquaporin 4 and GFAP was not significantly different between control and HI rats. Interestingly, the Evans blue staining revealed that dye extravasation occurred into the brain, in both groups. At first, we thought that HI did not change early BBB function and structure, which could be intact. However, the Evans blue results were contrary to this statement. Considering that, our interpretation of the present data considers the immaturity of the BBB in the



brain of neonates. It is likely that strong differences were not found because, in both groups, brain structures were not yet protected by this barrier. The concept of immaturity is frequently adopted and literature supports this idea. Lam et al. (2015) demonstrated that, in humans, the immaturity of the BBB after birth is related to low levels of permeability glycoprotein (P-glycoprotein) in post-mortem cortex samples. Corroborating this, it was also found that, in rodents, the immaturity of blood vessels is probably the result of incomplete pericyte coverage or junctional organization (Moretti et al., 2015). In mice, progressive BBB maturation after birth (PND 1–7) was confirmed by immature angiogenesis and the endothelial Wnt/wingless pathway acting via  $\beta$ -catenin stabilization, an important pathway regulating brain development (Liebner et al., 2008). Based on these reports, we can infer that both control and HI rats had similar immature BBB function, which is a typical characteristic of neonates (McLean and Ferriero, 2004). Similar results were found by Fernández-López et al. (2012). In neonate rats 24 h after transient middle cerebral artery occlusion, no effect was identified on the expression of basal lamina and tight junction proteins as well as a pericyte marker. Curiously, even though the Levine-Rice (also called the Vannucci model) model is one of the main HI models and has been widely adopted (Weis et al., 2014; Carletti et al., 2016; Miguel et al., 2015; Rojas et al., 2015; Tsuji et al., 2010), there have been no studies evaluating the early effects of this experimental model on the BBB. Saunders et al. (2008) published a study with an interesting title, “Barriers in the brain: a renaissance?”, in which they defend the idea that studies on barriers have declined in recent years, but this reality needs to change due to the current understanding that barrier mechanisms play vital roles in the pathophysiology of several neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. We share this idea, particularly considering the importance of BBB in brain development, function and dysfunction.

Additionally, in the present study, we evaluated BBB structure and function at later time points, 2 weeks (PND 22) and 8 weeks (PND 60) after the HI event. Such injury resulted in decreased occludin expression in the ipsilateral hippocampus at PND 22. Interestingly, it seems that there was a progressive effect of HI: a decrease in occludin in both hippocampi and decreased  $\beta$ -catenin and GFAP expression were identified on the side ipsilateral to the ischemia at PND 60 but not in the contralateral. Immunohistochemistry confirmed that GFAP was not altered in the contralateral hippocampus. Illustrating BBB function, it was observed that Evans blue extravasation occurred in the brain parenchyma of HI rats at the two time points. While interactions with adjacent cells are important for complete barrier function, it is well-accepted that the BBB proper is formed by the junctional complexes of endothelial cells and those TJs are the key functional components, responsible for the paracellular tightness (Coisne and Engelhardt, 2011). Complementing this idea, Alvarez-Díaz et al. (2007) affirmed that TJs seem to be the most susceptible and readily BBB components modified after an HI event. Based on the present findings, we can infer that HI-induced leakage of the BBB occurs, which seems to be persistent at time points long after the initiation of injury. Other studies have shown late effects of neonatal HI indicating, the existence of progressive brain damage, which is also associated with continuous cognitive impairment (Mishima et al., 2004). Our previous results showed impaired aversive (Carletti et al., 2012), spatial (Pereira et al., 2009; Carletti et al., 2016) and recognition memories (Pereira et al., 2009) in adolescent hypoxic-ischemic rats and, in adults, spatial (Pereira et al., 2007; Rojas et al., 2015) and aversive memory impairment (Rojas et al., 2013) were observed, as well as attention deficit (Miguel et al., 2015). Thus, we can propose that, probably, the extent of insult to the BBB is strictly related to neuronal susceptibility to HI, which is the substrate of the functional impairment in different ages. These data provide important insight to understand the importance of the BBB in brain damage in neonatal

rats. At this moment, it is impossible to determine whether BBB breakdown is a mechanism or a consequence of brain damage after HI but, undoubtedly, we can conclude that there is a strong relationship between them.

## 6. Effects of the EE on the BBB

Another purpose of this study was to investigate the influence of a period of environmental stimulation, starting at PND 8. Our previous data demonstrated neuroprotective effects observed on functional tasks and on brain damage in rats submitted to neonatal HI (Pereira et al., 2007; Pereira et al., 2008; Rojas et al., 2013; Rojas et al., 2015). Here, we found that EE reversed and/or prevented the decreased levels of occludin (PND 20 and PND 60),  $\beta$ -catenin and GFAP (PND 60). This is an interesting result, particularly because it gives us useful information about a possible mechanism underlying the previously identified protective effects of EE.

A recent review by Alwis and Rajan (2014) presented a summary of EE mechanisms, categorizing them into morphological and molecular effects, which occur primarily in the hippocampus. The first include increased neuronal density, dendritic branching and increased dendritic spine density, as well as enhanced neurogenesis and cell survival. The molecular effects of EE-induced changes involve increased neurotrophic factor expression and neurotransmitter levels and hippocampal long-term potentiation (LTP). Considering the importance of the BBB in providing a stable environment for neural function, it is reasonable to propose that the effects of EE on this barrier, in neonatal HI, are directly involved in the functional results (Pereira et al., 2007; Pereira et al., 2009; Rojas et al., 2013; Rojas et al., 2015). It has been reported that EE is an advantageous strategy to protect brain tissue in cases of neurological insults such as brain trauma (Bondi et al., 2014) and ischemic events in adult rodents (Saucier et al., 2010; Cechetti et al., 2012). However, no data have demonstrated the role of BBB structure and function on these protective effects. We found that only a few studies have indicated that stimulation by physical exercise has effects on the BBB in animals submitted to brain ischemia. Zhang et al. (2013) observed that treadmill training, beginning 24 h after ischemia induced by middle cerebral artery occlusion, inhibited the reduction in occludin, thus attenuating BBB disruption. Using the same ischemia model, it was demonstrated that pre-conditioning exercise enhanced collagen IV expression, the major component of the basal lamina of endothelial tissue (Davis et al., 2007). In concurrence with these previous results, the present findings provide further insight into the critical role of the BBB in nervous system disease. In particular, our data contribute to the comprehension of the neuropathology of HI and provide a new approach to investigate the mechanism of environmental stimulation.

Astrocyte function was also investigated using immunohistochemistry for GFAP, with the purpose of evaluating the presence of astrogliosis, a typical response to a brain insult. GFAP is an integral component of astrocyte intermediate filaments and is also considered a predictor of brain damage due to excessive reactive astrogliosis (Sofroniew, 2009; Zilles et al., 1991). A contrasting view is presented by Sofroniew and Vinters (2010), stating that there is a normal process of reactive astrogliosis that results in beneficial functions. Even though there are controversies on this issue, it is unquestionable that astrocyte dysfunction is harmful, including in the BBB, particularly at the end feet processes. Such structures contain gap junctions and desmosome-like junctions as well as the water channel protein aquaporin 4 and the glucose transporter GLUT 1 (Kimelberg and Nedergaard, 2010). These components indicate the crucial role of astrocytes in maintaining metabolic support to brain tissue. In this study, we used only the contralateral hippocampus due to the extensive atrophy present in

the hippocampus ipsilateral to arterial occlusion. No difference was detected in GFAP expression, either at PND 22 or at PND 60. Thus, we can conclude that excessive astrogliosis is not a long-term effect of neonatal HI nor of EE, possibly due to spontaneous recovery or to cell death of astrocytes consequent to the insult (Zhao et al., 2003). Salmaso et al. (2012), using a model of perinatal chronic hypoxia in mice, began at postnatal day 3 for 8 days, showed that hypoxic injury increased GFAP+ astroglial cells and that EE resulted in additive effect on astrocytes. Considering that there are scarce studies evaluating GFAP expression in rats submitted to the neonatal model of HI and EE, it is important that more studies be conducted to better understand the role of astrocyte function on these conditions.

## 7. Conclusion

In conclusion, the present study revealed that neonatal HI resulted in BBB disruption, which was maintained until adulthood, with decreased occludin,  $\beta$ -catenin and GFAP expression in the ipsilateral hippocampus. Interestingly, EE prevented and/or enhanced recovery from this injury. These findings expand our understanding of the neuropathology of HI, indicating that BBB dysfunction may be related to HI brain damage. Additionally, it was shown here for the first time that the protective effect of EE involves the preservation of the BBB structure in the hippocampus of rats that have suffered from a neonatal hypoxic-ischemic event.

## Acknowledgements

We would like to thanks to Edilene Siqueira Soares and Maria Helena Rodrigues Mesquita Brito for helping with the assays and support. This work was supported in part by grants from CNPq, CAPES and FAPERGS.

## References

- Abbott, N.J., Rönnebeck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25.
- Abbott, N.J., 2013. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J. Inher. Metab. Dis.* 36, 437–449.
- Alvarez-Díaz, A., Hilario, E., de Cerio, F.G., Valls-i-Soler, A., Alvarez-Díaz, F.J., 2007. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain—key vascular and cellular players. *Neonatology* 92, 227–235.
- Alwis, D.S., Rajan, R., 2014. Environmental enrichment and the sensory brain: the role of enrichment in remediating brain injury. *Front. Syst. Neurosci.* 8, 1–20.
- Arteni, N.S., Salgueiro, J., Torres, I., Achaval, M., Netto, C.A., 2003. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res.* 973, 171–178.
- Bondi, C.O., Klitsch, K.C., Leary, J.B., Kline, A.E., 2014. Environmental enrichment as a viable neurorehabilitation strategy for experimental traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 31, 873–888.
- Boulay, A.C., Cisternino, S., Cohen-Salmon, M., 2015. Immunoregulation at the gliovascular unit in the healthy brain: a focus on Connexin 43. *Brain Behav. Immun.* (in press).
- Brochu, M.E., Girard, S., Lavoie, K., Sébire, G., 2011. Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: an experimental study. *J. Neuroinflammation* 20, 8–55.
- Cardoso, F.L., Brites, D., Brito, M.A., 2010. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res. Rev.* 64, 328–363.
- Carletti, J.V., Deniz, B.F., Miguel, P.M., Rojas, J.J., Kolling, J., Scherer, E.B., de Souza Wyse, A.T., Netto, C.A., Pereira, L.O., 2012. Folic acid prevents behavioral impairment and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochem. Res.* 37, 1624–1630.
- Carletti, J.V., Deniz, B.F., Rojas, J.J., Miguel, P.M., Kolling, J., Scherer, E.B., de Souza Wyse, A.T., Netto, C.A., Pereira, L.O., 2016. Folic acid can contribute to memory deficit and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase failure in the hippocampus of adolescent rats submitted to hypoxia-ischemia. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets* 15, 64–72.
- Cechetti, F., Worm, P.V., Lovatel, G., Moysés, F., Siqueira, I.R., Netto, C.A., 2012. Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sci.* 91, 29–36.
- Chan, K.C., Xing, K.K., Cheung, M.M., Zhou, I.Y., Wu, E.X., 2010. Functional MRI of postnatal visual development in normal and hypoxic-ischemic-injured superior colliculi. *Neuroimage* 49, 2013–2020.
- Chan, K.C., Kancherla, S., Fan, S.J., Wu, E.X., 2015. Long-term effects of neonatal hypoxia-ischemia on structural and physiological integrity of the eye and visual pathway by multimodal MRI. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 1–9.
- Chen, X., Sadowska, G.B., Zhang, J., Kim, J.E., Cummings, E.E., Bodge, C.A., Lim, Y.P., Makeyev, O., Besio, W.G., Gaitanis, J., Threlkeld, S.W., Banks, W.A., Stonestreet, B.S., 2015. Neutralizing anti-interleukin-1 $\beta$  antibodies modulate fetal blood-brain barrier function after ischemia. *Neurobiol. Dis.* 7, 118–129.
- Coisne, C., Engelhardt, B., 2011. Tight junctions in brain barriers during central nervous system inflammation. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1285–1303.
- Davis, W., Mahale, S., Carranza, A., Cox, B., Hayes, K., Jimenez, D., Ding, Y., 2007. Exercise pre-conditioning ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke by enhancing basal lamina. *Neurol. Res.* 29, 382–387.
- Fernández-López, D., Faustino, J., Daneman, R., Zhou, L., Lee, S.Y., Derugin, N., Wendland, M.F., Vexler, Z.S., 2012. Blood-brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat. *J. Neurosci.* 32 (July(28)), 9588–9600.
- Fleiss, B., Gressens, P., 2012. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? *Lancet Neurol.* 11, 556–566.
- Hay, J.R., Johnson, V.E., Young, A.M., Smith, D.H., Stewart, W., 2015. Blood-brain barrier disruption is an early event that may persist for many years after traumatic brain injury in humans. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74, 1147–1157.
- Johnston, M.V., Trescher, W.H., Ishida, A., Nakajima, W., 2001. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr. Res.* 49, 735–741.
- Juul, S.E., Ferriero, D.M., 2014. Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clin. Perinatol.* 41, 119–131.
- Kimelberg, K.H., Nedergaard, M., 2010. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7, 338–353.
- Krueger, M., Bechmann, I., Immig, K., Reichenbach, A., Härtig, W., Michalski, D., 2015. Blood-brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 292–303.
- Kurinczuk, J.J., White-Koning, M., Badawi, N., 2010. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum. Dev.* 86, 329–338.
- Lam, J., Baello, S., Iqbal, M., Kelly, L.E., Shannon, P.T., Chitayat, D., Matthews, S.G., Koren, G., 2015. The ontogeny of P-glycoprotein in the developing human blood-brain barrier: implication for opioid toxicity in neonates. *Pediatr. Res.* 78, 417–421.
- Lee, H., Pienaar, I.S., 2014. Disruption of the blood-brain barrier in Parkinson's disease: curse or route to a cure? *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 19, 272–280.
- Lee, B.F., Wang, L.W., Lin, S.H., Jhuo, T.J., Chiu, N.T., Huang, C.C., Hsia, C.C., Shen, L.H., 2012. Tc-99m-HL91 imaging in the early detection of neuronal injury in a neonatal rat model of hypoxic ischemia. *Crit. Care Med.* 40, 1930–1938.
- Levine, S., 1960. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol.* 36, 1–17.
- Li, L., McBride, D.W., Doycheva, D., Dixon, B.J., Krafft, P.R., Zhang, J.H., Tang, J., 2015. G-CSF attenuates neuroinflammation and stabilizes the blood-brain barrier via the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 272, 135–144.
- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C.J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., Taketo, M.M., von Melchner, H., Plate, K.H., Gerhardt, H., Dejana, E., 2008. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 183, 409–417.
- McLean, C., Ferriero, D., 2004. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin. Perinatol.* 28, 425–432.
- Mendonça, M.C., Soares, E.S., Stávale, L.M., Rapôso, C., Coope, A., Kalapothakis, E., 2013. Expression of VEGF and Flk-1 and Flt-1 receptors during blood-brain barrier (BBB) impairment following Phlebotomus nigriventer spider venom exposure. *Toxins (Basel)* 5, 2572–2588.
- Menezes, M.J., McClenahan, F.K., Leiton, C.V., Aranmolate, A., Shan, X., Colognato, H., 2014. The extracellular matrix protein laminin alpha2 regulates the maturation and function of the blood-brain barrier. *J. Neurosci.* 34, 15260–15280.
- Miguel, P.M., Schuch, C.P., Rojas, J.J., Carletti, J.V., Deckmann, I., Martinato, L.H., Pires, A.V., Bizarro, L., Pereira, L.O., 2015. Neonatal hypoxia-ischemia induces attention-deficit hyperactivity disorder-like behavior in rats. *Behav. Neurosci.* 129, 309–320.
- Mishima, K., Ikeda, T., Aoo, N., Takai, N., Takahashi, S., Egashira, N., Ikenoue, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2004. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neurosci. Lett.* 376, 194–199.
- Moretti, R., Pansiot, J., Bettati, D., Strazielle, N., Ghersi-Egea, J.F., Damante, G., Fleiss, B., Titomanlio, L., Gressens, P., 2015. Blood-brain barrier dysfunction in disorders of the developing brain. *Front. Neurosci.* 17, 9–40.
- Muramatsu, K., Fukuda, A., Togari, H., Wada, Y., Nishino, H., 1997. Vulnerability to cerebral hypoxic-ischemic insult in neonatal but not in adult rats is in parallel with disruption of the blood-brain barrier. *Stroke* 28, 2281–2288.
- Nag, S., 2003. Blood-brain barrier permeability using tracers and immunohistochemistry. *Methods Mol. Med.* 89, 133–144.
- Nagelhus, E.A., Ottersen, O.P., 2013. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol. Rev.* 93, 1543–1562.
- Pereira, L.O., Arteni, N.S., Petersen, R.C., da Rocha, A.P., Achaval, M., Netto, C.A., 2007. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain

- injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87, 101–108.
- Pereira, L.O., Strapasson, A.C.P., Nabinger, P.M., Achaval, M., Netto, C.A., 2008. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 1218, 257–266.
- Pereira, L.O., Nabinger, P.M., Strapasson, A.C., Nardin, P., Gonçalves, C.A., Siqueira, I.R., Netto, C.A., 2009. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia-ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. *Brain Res.* 1247, 188–195.
- Persidsky, Y., Ramirez, S.H., Haorah, J., Kanmogne, G.D., 2006. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmunopharmacol.* 1, 223–236.
- Rice, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9, 131–141.
- Rojas, J.J., Deniz, B.F., Miguel, P.M., Diaz, R., Hermel, E., do, E., Achaval, M., Netto, C.A., Pereira, L.O., 2013. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Exp. Neurol.* 241, 25–33.
- Rojas, J.J., Deniz, B.F., Schuch, C.P., Carletti, J.V., Deckmann, I., Diaz, R., Matté, C., dos Santos, T.M., Wyse, A.T., Netto, C.A., Pereira, L.O., 2015. Environmental stimulation improves performance in the ox-maze task and recovers Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus of hypoxic-ischemic rats. *Neuroscience* 291, 118–127.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., Giaume, C., 2008. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322, 1551–1555.
- Salmaso, N., Silbereis, J., Komitova, M., Mitchell, P., Chapman, K., Ment, L.R., Schwartz, M.L., Vaccarino, F.M., 2012. *J. Neurosci.* 27, 8930–8939.
- Saucier, D.M., Yager, J.Y., Armstrong, E.A., 2010. Housing environment and sex affect behavioral recovery from ischemic brain damage. *Behav. Brain Res.* 214, 48–54.
- Saunders, N.R., Ek, C.J., Habgood, M.D., Dziegielewska, K.M., 2008. Barriers in the brain: a renaissance? *Trends Neurosci.* 31, 279–286.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.
- Sofroniew, M.V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647.
- Tsuji, M., Aoo, N., Harada, K., Sakamoto, Y., Akitake, Y., Irie, K., Mishima, K., Ikeda, T., Fujiwara, M., 2010. Sex differences in the benefits of rehabilitative training during adolescence following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 226, 285–292.
- Van de Looij, Y., Dean, J.M., Gunn, A.J., Hüppi, P.S., Sizonenko, S.V., 2015. Advanced magnetic resonance spectroscopy and imaging techniques applied to brain development and animal models of perinatal injury. *Int. J. Dev. Neurosci.* 45, 29–38.
- Vannucci, S.J., Reinhart, R., Maher, F., Bondy, C.A., Lee, W.H., Vannucci, R.C., Simpson, I.A., 1998. Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 15, 255–264.
- Weis, S.N., Toniazio, A.P., Ander, B.P., Zhan, X., Careaga, M., Ashwood, P., Wyse, A.T., Netto, C.A., Sharp, F.R., 2014. Autophagy in the brain of neonates following hypoxia-ischemia shows sex- and region-specific effects. *Neuroscience* 256, 201–209.
- Wolburg, H., Lippoldt, A., 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* 38, 323–337.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., 2009. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 335, 75–96.
- Won, S.M., Lee, J.H., Park, U.J., Gwag, J., Gwag, B.J., Lee, Y.B., 2011. Iron mediates endothelial cell damage and blood-brain barrier opening in the hippocampus after transient forebrain ischemia in rats. *Exp. Mol. Med.* 43, 121–128.
- Wu, C.C., Chen, Y.C., Chang, Y.C., Wang, L.W., Lin, Y.C., Chiang, Y.L., Ho, C.J., Huang, C.C., 2013. Human umbilical vein endothelial cells protect against hypoxic-ischemic damage in neonatal brain via stromal cell-derived factor 1/C-X-C chemokine receptor type 4. *Stroke* 44, 1402–1409.
- Yang, J., Liu, J., Niu, G., Chan, K.C., Wang, R., Liu, Y., Wu, E.X., 2009. In vivo MRI of endogenous stem/progenitor cell migration from subventricular zone in normal and injured developing brains. *Neuroimage* 48, 319–328.
- Zhang, Y., Zhang, P., Shen, X., Tian, S., Wu, Y., Zhu, Y., Jia, J., Wu, J., Hu, Y., 2013. Early exercise protects the blood-brain barrier from ischemic brain injury via the regulation of MMP-9 and occludin in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11096–11112.
- Zhao, X., Ahram, A., Berman, R.F., Muizelaar, J.P., Lyeth, B.G., 2003. Early loss of astrocytes after experimental traumatic brain injury. *Glia* 44, 140–152.
- Zilles, K., Hajós, F., Kálmán, M., Schleicher, A., 1991. Mapping of glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in the rat forebrain and mesencephalon by computerized image analysis. *J. Comp. Neurol.* 308, 340–355.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191–198.



## *Capítulo 2*

O enriquecimento ambiental altera o perfil neuroinflamatório e modula o comportamento de risco em roedores submetidos à hipóxia-isquemia neonatal

Ramiro Diaz, Patrícia Maidana Miguel, Bruna Ferrary Deniz, Heloísa Deola Confortim, Sílvia Barbosa, Carla Basso, Ionara Rodrigues Siqueira, Lenir Orlandi Pereira

(artigo será submetido para publicação em revista científica após sugestões da banca examinadora)

## **O enriquecimento ambiental altera o perfil neuroinflamatório e modula o comportamento de risco no labirinto em cruz elevado em roedores submetidos à hipóxia-isquemia neonatal**

**Autores:** Ramiro Diaz<sup>a</sup>, Patrícia Maidana Miguel<sup>a</sup>, Bruna Ferrary Deniz<sup>a</sup>, Heloísa Deola Confortim<sup>a</sup>, Sílvia Barbosa<sup>a,b</sup>, Carla Basso<sup>c</sup>, Ionara Rodrigues Siqueira<sup>c,d</sup>, Lenir Orlandi Pereira<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>d</sup> Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

### **RESUMO**

A hipóxia-isquemia (HI) encefálica neonatal é a maior causa de mortalidade e morbidade neurológica em crianças. Usualmente, a exposição precoce ao enriquecimento ambiental (EA), ou estimulação precoce, é considerada uma estratégia eficaz no sentido de prevenir e/ou reverter alterações funcionais, ainda que os mecanismos relacionados a esses benefícios não estejam esclarecidos. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do EA no hipocampo de ratos adultos (60<sup>o</sup> DPN), submetidos a HI neonatal, avaliando a ativação microglial, o perfil bioquímico de citocinas neuroinflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e o comportamento relacionado à ansiedade. Ratos Wistar machos e fêmeas, no 7<sup>o</sup> DPN, foram submetidos ao modelo de Levine-Rice de HI neonatal, no qual a artéria carótida comum direita foi ocluída permanentemente. Após, os animais foram mantidos em uma atmosfera

hipóxica (90 min, 8%O<sub>2</sub>-92%N<sub>2</sub>). Os animais foram divididos em quatro grupos: CTAP (controle ambiente padrão), CTAE (controle ambiente enriquecido), HIAP (hipóxia-isquemia ambiente padrão) e HIAE (hipóxia-isquemia ambiente enriquecido). Os animais dos grupos EA permaneceram alojados no enriquecimento ambiental desde o 8º DPN. Após o desmame os animais foram divididos em grupos e expostos ao protocolo diário de EA (1 h/dia por 5 semanas) e alojados em caixas padrão. A expressão da proteína Iba-1 foi quantificada por meio de imuno-histoquímica. Os perfis bioquímicos de IL-1β e TNF-α foram detectados através de colorimetria com uso de kits de ensaio ELISA. O comportamento relacionado à ansiedade foi avaliado por meio do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e do teste claro/escuro (TCE). Os dados mostram que o EA eleva a expressão das citocinas IL-1β e TNF-α exercendo efeitos benéficos em características relacionadas à ansiedade e que a HI causa ativação da microglia. O presente estudo mostrou-se importante para identificar mecanismos neuroinflamatórios e comportamentais relacionados com a HI e EA.

## ABSTRACT

Neonatal hypoxic ischemia (HI) is the major cause of neurological mortality and morbidity in children. Usually, early exposure to environmental enrichment (EE), or early stimulation, is considered an effective strategy in order to prevent and/or reverse functional alterations, although the related mechanisms have not been clarified. The aim of this study was to investigate the effects of the neonatal HI and the environmental stimulation in the hippocampus of adult adults (PND 60) by evaluating the microglial activation, the biochemical profile of neuroinflammatory cytokines and the anxiety-related behavior. Male and

female Wistar rats, PND 7, were submitted to the Levine-Rice model of neonatal HI, in which the right common carotid artery was permanently occluded. Afterwards, the animals were kept in a hypoxic atmosphere (90 min, 8%O<sub>2</sub>-92%N<sub>2</sub>). The animals were divided into four groups: CTSE (control - standard environment), CTEE (control - enriched environment), HISE (hypoxic ischemia - standard environment) and HIEE (hypoxic ischemia - enriched environment). The animals of the EE groups were kept in the environmental enrichment since PND 8. After weaning, the animals were divided into groups and exposed to the EE (1h a day for 5 weeks). The expression of the Iba-1 protein was quantified by immunohistochemistry. The IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  biochemical profiles were detected by colorimetry using ELISA kits. Anxiety-related behavior was assessed using the elevated plus maze test (EPM) and the light-dark box test (LDB). The results demonstrate that the HI causes microglial activation and the exposure to the EE after HI increases the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  cytokines. The behavioral data show that the EE has beneficial effects on anxiety-related traits. The results of this study are important to identify neuroinflammatory and behavioral mechanisms related to the HI and the EE.

## INTRODUÇÃO

Os danos encefálicos resultantes da hipóxia-isquemia (HI) neonatal são a maior causa de mortalidade e geradores de importantes acometimentos neurológicos transitórios ou permanentes em crianças. A HI no recém-nascido repercute em sequelas neurológicas, como déficit de memória, de atenção, hiperatividade, distúrbios emocionais e atraso cognitivo caracterizado por dificuldades no aprendizado durante toda vida (Vannucci e Perlman, 1997;

Glass *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2010, 2015; Johnston *et al.*, 2001; Van de Looijet *al.*, 2015; Yang *et al.*, 2009; Juul e Ferriero, 2014; Ahearne *et al.*, 2016; Placha *et al.*, 2016).

A principal característica da HI é a redução da oferta de oxigênio e a inadequada perfusão sanguínea do encéfalo. A exigência do alto consumo de oxigênio e baixa reserva energética, somado à diminuição do aporte sanguíneo causado pela HI, reduz drasticamente o metabolismo energético afetando diversas funções encefálicas. A carência energética gera uma diminuição do aporte de ATP celular ocasionando falha na atividade enzimática da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase acarretando edema, lise e morte celular por necrose (Perlman, 2007). Outra consequência é a excitotoxicidade glutamatérgica, que causa desequilíbrio no fluxo de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> gerando morte celular por necrose e apoptose (Mclean e Ferriero, 2004). Há também perda da função mitocondrial e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, depleção dos níveis de enzimas antioxidantes, ruptura da BHE e aumento da produção de mediadores inflamatórios (Mclean e Ferriero, 2004; Distefano e Praticò, 2010; Chen *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Won *et al.*, 2011).

Ainda que se tenham dúvidas a respeito da sequência dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório após a HI, a ativação da microglia parece ser o desencadeador dos primeiros sinais desta resposta do sistema nervoso central (Hagberg *et al.*, 2005). A ativação imunológica durante o desenvolvimento neonatal tem mostrado afetar tanto a função microglial encefálica (Williamson *et al.*, 2011) como a ansiedade em animais na fase adulta (Sominsky *et al.*, 2012), aumentando a suscetibilidade a doenças e a reatividade ao estresse (Bilbo & Schwarz, 2009; Karrow, 2006; Mouihate *et al.*,

2010; Schwarz & Bilbo, 2012 ; Spencer *et al.*, 2006; Williamson & Bilbo, 2013; Williamson *et al.*, 2011). Em consonância, estudos têm demonstrado o envolvimento da resposta microglial em muitos distúrbios neuropsiquiátricos (Rico *et al.*, 2010; Zorrilla *et al.*, 2001; Frommberger *et al.*, 1997; Kaestner *et al.*, 2005; Pace *et al.* 2006; Thomas *et al.*, 2005; Brambilla *et al.*, 2004). Esta cascata de inflamação inicia com a liberação de interleucinas pró-inflamatórias, interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), promovendo a ativação e infiltração de leucócitos. Além disso também ocorre a produção de citocinas anti-inflamatórias (Cohen *et al.*,1996; D'Angelo *et al.*, 2016; Falahati *et al.*, 2013).

A IL-1 $\beta$  é uma proteína pró-inflamatória que está envolvida em processos neurogênicos durante eventos patológicos e inflamatórios e possui grande importância na manutenção do funcionamento encefálico regulando a proliferação astrocitária nas lesões do SNC (Yamasaki *et al.*, 1995; Cibelli *et al.*, 2010; Goshen *et al.*, 2007 e 2009; RachalPugh *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2011; Yirmiya & Goshen, 2011). Estudos mostraram que a IL-1 $\beta$  tem papel importante na neurogênese (Ben Menachem-Zidon *et al.*, 2007; Goshen *et al.*, 2007; Kaneko *et al.*, 2006; Koo e Duman, 2008; Spulber *et al.*, 2008) gerando impacto na aprendizagem e nos processos cognitivos dependentes do hipocampo (Bruehl-Jungerman *et al.*, 2005; Drapeau *et al.*,2003; Saxe *et al.*, 2007; Shors *et al.*, 2002).

Diversos estudos têm reafirmado relação entre TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e distúrbios cognitivos tais como depressão maior e demência (Pollmacher *et al.*, 2002; Reichenberg *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2006) sugerindo que estas citocinas contribuem na fisiopatologia dessas doenças (Capuron & Dantzer,

2003; Gahtan & Overmier, 1999). Ainda, estudos demonstraram relação entre TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e a doença de Alzheimer (Bruunsgaard *et al.*, 1999; Dik *et al.*, 2005; Holmes *et al.*, 2003; Van Exel *et al.*, 2003). Evidências indicam que a cognição está associada com as citocinas e são demonstradas em diversos estudos que mostram elevados níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  associado ao declínio cognitivo (Bruunsgaard *et al.*, 1999; Holmes *et al.*, 2003; van Exel *et al.*, 2003; Dik *et al.*, 2005). Em contraponto, considera-se que a presença de células imunitárias circulantes e as proteínas (por exemplo, células T e citocinas) mantêm a homeostase encefálica (Ron-Harelet *et al.*, 2011) formando uma via neuro imune bi-direcional que pode afetar positivamente o comportamento, o humor e a cognição (Maier and Watkins, 1998). Em consonância, a presença contínua de TNF-  $\alpha$  no processo inflamatório é considerada necessária para a preservação das sinapses excitatórias (Beattie *et al.*, 2002), para o metabolismo de neurotransmissores e os processos de neurodesenvolvimento (Stellwagen and Malenka, 2006). Assim, as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  são constituintes moduladores de atividades neuronais e ambas estão envolvidas em mecanismos relacionados à cognição e comportamento (Vitkovic *et al.*, 2000).

Nosso grupo de estudos vem investigando a eficácia neuroprotetora do enriquecimento ambiental (EA) nos déficits causados pela HI. Para isso temos utilizado o modelo experimental de Levine (1960) modificado por Rice e cols. (1981). Em ratos adolescentes reportamos a prevenção da perda da memória de reconhecimento de objetos em animais HI expostos ao EA (Pereira *et al.*, 2008). Identificamos também a recuperação do déficit de memória espacial e aversiva na fase adulta (Pereira *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2013 e 2015) e a

eficácia na reversão do déficit de memória espacial e da diminuição da densidade dos espinhos dendríticos no hipocampo de ratos com HI estimulados em EA (Pereira *et al.*, 2007 e 2008; Rojas *et al.*, 2013). Também revelamos que o EA tem efeito neuroprotetor recuperando a ruptura da BHE causada pela lesão HI neonatal e que se mantinha na fase adulta (Diaz *et al.*, 2016).

Na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos nos benefícios funcionais do EA após a lesão hipóxico-isquêmica, este estudo se propõe a analisar o efeito terapêutico do EA pós HI na fase adulta, sob aspectos relacionados à ansiedade e compreender alguns parâmetros dos mecanismos neuroinflamatórios envolvidos, por meio da avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e a ativação da microglia no hipocampo de ratos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### ANIMAIS

Ratos Wistar machos e fêmeas foram obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL/UFRGS). Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo claro/escuro 12/12h, com água e ração disponível *ad libitum*. No 7º dia pós-natal (DPN), os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: (1) controle, mantido em ambiente padrão (CTAP); (2) controle, submetido ao AE (CTAE); (3) hipóxia-isquemia, mantido em ambiente padrão (HIAP); (4) hipóxia-isquemia, submetido ao AE (HIAE). No 61º, 62º DPN os animais foram expostos ao teste



comportamental do labirinto em cruz elevado (LCE) e no 63<sup>o</sup> DPN ao teste claro-escuro (TCE). Os animais foram submetidos à eutanásia aos 63<sup>o</sup> DPN para análise bioquímica e imuno-histoquímica. Para cada análise foram utilizados um 'n' mínimo de 5 ratos por grupo (filhotes machos e fêmeas compuseram os grupos experimentais). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Federação das Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental e do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório adaptado do Instituto Nacional de Saúde (EUA). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil (n<sup>o</sup>:24090).

### HIPÓXIA-ISQUEMIA

O método de Levine (1960), modificado por Rice e cols (1981), foi utilizado para produzir a lesão cerebral unilateral nos ratos neonatais. No 7<sup>o</sup> DPN, os animais foram anestesiados com halotano e através de uma incisão longitudinal no pescoço, a artéria carótida direita foi identificada, isolada e permanentemente ocluída. Os animais foram então, mantidos durante 15 minutos sob uma lâmpada de aquecimento, para recuperação pós-cirúrgica e retornaram às caixas moradia para cuidado materno. Após 3h, foram expostos durante 90 min a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio e 92% de nitrogênio) numa câmara parcialmente imersa em água, com temperatura controlada de 37°C (Arteni e cols., 2003). Imediatamente após o procedimento de HI, os animais foram devolvidos às suas gaiolas. Os animais do grupo controle foram submetidos à anestesia e à incisão do pescoço, mas não foi realizada oclusão arterial nem exposição à atmosfera hipóxica.

## ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

O protocolo enriquecimento ambiental deste estudo seguiu o de estudos prévios (Pereira *et al.*, 2008, Pereira *et al.*, 2009, Rojas *et al.*, 2013). Iniciou-se com estimulação precoce (alojamento do 8º DPN ao 22º DPN) associado ao enriquecimento ambiental pós desmame com exposição de 1h diária ao EA (23º DPN ao 60º DPN). A estimulação precoce (8º DPN ao 22º DPN) é o EA constante, 24h com presença das mães, em gaiolas enriquecidas (30 x 20 x 20 cm). Após este período, realizou-se o desmame e iniciou-se o enriquecimento ambiental diário (23º DPN ao 60 DPN, 6 dias / semana, 1 h / dia, em grupos de 7-10 animais). A gaiola de enriquecimento diário foi uma gaiola com dimensões maiores (40 x 60 x 90 cm) com três andares. Os animais dos grupos não enriquecidos foram removidos de suas caixas moradia e transferidos para outra de igual dimensão e estrutura, durante o período de enriquecimento dos outros animais.

## TESTES COMPORTAMENTAIS

### LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O LCE é um aparato em forma de cruz com dois braços em oposição, formando quatro braços, dois deles protegidos por paredes laterais e os outros dois abertos. No ponto de intersecção dos dois braços opostos é determinado um quadrante central. Os animais foram colocados no quadrante central com o focinho voltado para um dos braços fechados e permaneciam no LCE pelo tempo de cinco minutos. Durante este período o roedor era observado sempre pelo mesmo pesquisador, que considerava as seguintes variáveis: número de entradas nos braços abertos, percentual de entradas nos braços abertos,

tempo de permanência nos braços abertos, percentual de tempo de permanência nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados, número de avaliações de risco e número de *rearings*.

## TESTE CLARO E ESCURO

O aparato para o teste, apresenta um compartimento claro, que é bastante iluminado com intensidade luminosa alta, além de paredes e piso brancos. Também é constituído por um compartimento escuro, com pouca ou nenhuma luminosidade composto por paredes e piso preto e uma abertura que permite a passagem de um ambiente ao outro.

O procedimento adotado neste estudo foi o mesmo utilizado por Horii (2008). Os animais foram colocados no ambiente escuro e liberados para movimentarem-se livremente entre os dois ambientes durante o intervalo de 10 minutos, sendo avaliados: o tempo de latência para exposição do lado claro, o tempo de exploração do lado claro, o número de entradas no ambiente iluminado e o número de entradas no lado escuro.

## ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Para realização da análise de marcadores inflamatórios, os animais foram decapitados no 63º DPN, o hipocampo foi dissecado rapidamente, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80º C. Posteriormente, os hipocampos foram homogeneizados com tampão (1 g de tecido / 10 ml), centrifugados durante 10 000 rpm, 5 min, e o sobrenadante foi recolhido para análises. Os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  foram medidos pelos kits de ensaio ELISA (detecção colorimétrica, número de catálogo DY510, DY501, R & D Systems®

respectivamente) de acordo com as instruções do fabricante. As placas de 96 poços foram revestidas com anticorpo monoclonal específico. As placas foram então bloqueadas para ligação não específica utilizando diluentes de ensaio. As estruturas foram homogeneizadas com kit específico de tampão. Os lisados foram centrifugados e o sobrenadante e a curva de padrões foram incubados com o anticorpo de captura seguido pelo anticorpo de detecção. As placas foram incubadas com a enzima de detecção avidina-HRP e a absorbância foi medida num leitor de microplacas (450 nm). A concentração de proteína de cada amostra foi medida pelo método de Lowry (Peterson, 1977). Os níveis de citocinas foram expressos como pg / mL.

#### IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA Iba 1

Os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p., Cristália, Brasil), injetado 100 UI de heparina (Cristália, Brasil) e submetidos à eutanásia por meio de perfusão transcardíaca, utilizando uma bomba peristáltica (30 mL / min), com 200 mL de solução salina, seguido de 200 mL de uma solução de 4% de paraformaldeído, diluída em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4, Synth, Brasil) à temperatura ambiente. Os encéfalos foram dissecados, pós-fixados na mesma solução fixadora à temperatura ambiente durante 4h. Após os encéfalos foram imersos em solução de sacarose a 15% e 30%, respectivamente, então, foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos num congelador (-80 ° C). Secções coronais de 40 µm de espessura (ponto de origem aproximadamente 2,30 a 4,52 mm posterior ao bregma - Paxinos e Watson, 1982), da região CA1 do hipocampo foram obtidas utilizando um criostato (CM1850, Leica, Alemanha) a -20 ° C, as fatias foram recolhidas e colocadas em lâminas revestidas com gelatina.

As secções foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, e a recuperação de antígeno foi realizada por aquecimento de secções em tampão de citrato de sódio 0,01 M (pH 6,0) num banho a 92 ° C durante 20 min. Os tecidos foram então lavados em PBS e a peroxidase endógena foi inativada com peróxido de hidrogênio a 3% (Synth, Brasil) dissolvida em PBS durante 30 min, lavada novamente em PBS, depois em PBS contendo Triton X-100 a 0,4% (PBS-Tx) 15 min e pré-incubadas com albumina de soro bovino a 3% (BSA, Sigma Aldrich, EUA) em PBS-Tx durante 30 min. Em seguida, as amostras foram incubadas separadamente com anti-Iba1 policlonal de cabra (1:500, Abcam, EUA) a 4° C, durante 48 h, para detectar a microglia ativada. As secções foram lavadas em PBS-Tx e incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase (1:500, Sigma Aldrich, EUA) à temperatura ambiente durante 2 h. A reação imuno-histoquímica foi revelada utilizando uma solução de 0,03% de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich, EUA) e peróxido de hidrogênio a 10% durante 5 min. Por fim, as secções foram lavadas em PBS, desidratadas em etanol, diafanizadas com xilol e cobertas com bálsamo do Canadá (ChemicalReaction, Brasil) e cobertas por lamínulas. O controle negativo foi preparado por omissão do anticorpo primário e sua substituição por PBS. A fim de minimizar as diferenças na coloração e no fundo, todos os procedimentos histológicos foram realizados ao mesmo tempo e utilizando as mesmas soluções (Xavier *et al.*, 2005). A densidade de Iba1/microglia foi calculada como o número de células / mm<sup>2</sup>. A partir de cada animal foram analisadas 10 imagens (5 secções por animal, lado esquerdo e lado direito), 'n' mínimo de 5 animais por grupo.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, com lesão e ambiente como variáveis independentes. A análise foi seguida pelo teste *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas, quando necessário. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Valores de probabilidade inferiores a 5% foram considerados significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de software Statistica<sup>®</sup>.

## RESULTADOS

### TESTES COMPORTAMENTAIS

#### LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Ao analisarmos o número de entradas e porcentagem de entradas nos braços abertos no primeiro dia de exposição ao LCE, a ANOVA de duas vias mostrou efeito da lesão nas EBA1 ( $F_{(1,30)}=5,60;p=0,02$ ) e %EBA1 ( $F_{(1,30)}=4,28;p=0,04$ ) e apresentando maiores médias nos grupos HI, em relação aos CTs. (figura 1A e 1B)

Considerando a segunda exposição ao LCE, os animais dos quatro grupos estudados não apresentaram diferenças entre si no número de EBA2 ( $F_{(1,30)}=51,31;p=0,73$ ) e na porcentagem de entrada nos braços abertos %EBA2 ( $F_{(1,30)}=91,61;p=0,73$ ) (tabela 1).

A avaliação do tempo de permanência nos braços abertos no primeiro dia do LCE mostrou diferenças significativas para o fator ambiente ( $F_{(1,30)}=82,76;p=0,028$ ) e houve uma tendência ao efeito da lesão ( $F_{(1,30)}=3,92;p=0,056$ ). O teste *post hoc* de Tukey apontou um aumento no

tempo de permanência nos braços abertos para o grupo HIAP ( $p=0,038$ ) quando comparado ao CTAE (figura 1C).

Em relação ao percentual de tempo de permanência nos braços abertos no LCE o resultado apresenta diferença para o fator ambiente ( $F_{(1,30)}=82,76;p=0,028$ ) e tendência para o fator lesão ( $F_{(1,30)}=3,92;p=0,056$ ). O teste *post hoc* de Tukey mostrou maior porcentagem de tempo de exposição aos braços abertos no grupo HIAP ( $p=0,038$ ) em comparação ao animais do grupo CTAE no primeiro dia de exposição (figura 1D).

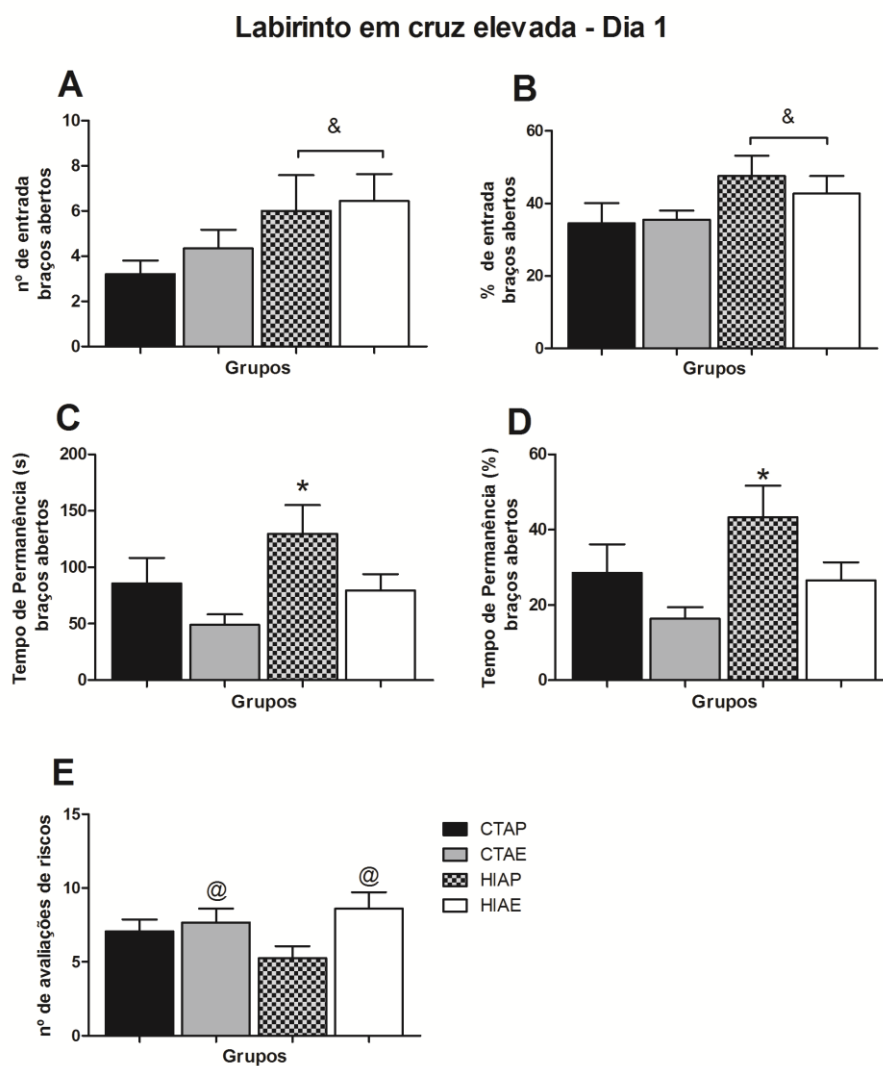
Ao avaliar o tempo e o percentual de tempo de permanência nos braços abertos durante a segunda exposição, os grupos CTAP, HIAP, CTAE e HIAE não demonstraram diferenças entre eles. TBA2 ( $F_{(1,30)}=46,61;p=0,918$ ); %TBA2 ( $F_{(1,30)}=46,61;p=0,918$ ) (tabela 1).

Ao analisarmos o número de entradas nos braços fechados do LCE, a ANOVA não mostrou um efeito significativo no primeiro dia de exposição ao LCE ( $F_{(1,30)}=275,22; p=0,934$ ). Igualmente no segundo dia nenhum dos quatro grupos estudados apresentou diferença significativa no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(1,30)}=224,08;p=0,785$ ) (tabela 1).

Em relação ao resultado do número de avaliações de risco no primeiro dia, a ANOVA mostrou haver efeito do ambiente ( $F_{(1,30)}=5,14; p=0,30$ ), com maior número de AR nos grupos AE, em relação aos AP. Porém o teste *post hoc* de Tukey não apresentou diferença significativa entre os grupos (figura 1E). No segundo dia os grupos CTAP, HIAP, CTAE e HIAE não demonstraram diferenças entre eles. AR1 ( $F_{(1,30)}=206,16;p=0,528$ ) (tabela 1).

Os resultados das variáveis TBA1 e %TBA1 acima apresentados, demonstram maior tempo de exposição nos braços abertos (espaço mais

aversivo do aparato) no LCE nos animais do grupo HIAP quando comparados aos animais do grupo CTAE. Esse dado representa que animais submetidos à hipóxia-isquemia encefálica neonatal mostram indicativos claro da diminuição da esquia a ambientes potencialmente arriscados e redução de comportamento ansiogênico. Tais comportamentos não são adaptativos e podem ser indicativos de um transtorno funcional o qual foi revertido pelo enriquecimento ambiental (dados dos grupos AE).



**Figura 1:** A) número de entradas nos braços abertos (&diferença entre os grupos HIs e CTs) ; B) Porcentagem do número de entradas nos braços abertos (&diferença entre os grupos HI e CT); C) Tempo de permanência (segundos) nos braços abertos (\* diferença entre os grupos HIAP e CTAE); D) Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos(\* diferença entre os grupos HIAP e CTAE); E) Número de avaliações de risco (@ diferença entre os grupos AE e AP). Dados representados por média±erro padrão.



## Labirinto em Cruz Elevada – Dia 2

Tabela 1: Dados representados por média±erro padrão.

	CTAP	CTAE	HIAP	HIAE
Nº de Entradas nos Braços Fechados – Dia 1	5,70 ± 0,49	7,33 ± 1,05	6,16 ± 1,13	7,66 ± 0,52
Nº de Entradas nos Braços Fechados – Dia 2	9,20 ± 0,67	10,22 ± 1,26	7,00 ± 1,67	8,66 ± 1,15
Nº de Entradas nos Braços Abertos – Dia 2	4,80 ± 1,05	5,11 ± 1,42	4,50 ± 1,83	5,77 ± 1,39
% Nº de Entradas nos Braços Abertos – Dia 2	31,81 ± 4,02	26,57 ± 6,44	34,67 ± 10,07	33,99 ± 6,79
Tempo de Entradas nos Braços Abertos – Dia 2	47,70 ± 8,91	46,33 ± 13,81	70,50 ± 36,05	65,66 ± 11,69
% Tempo de Entradas nos Braços Abertos – Dia 2	15,90 ± 2,97	15,44 ± 4,60	23,50 ± 12,01	21,88 ± 3,89
Nº de Avaliações de Risco – Dia 2	17,00 ± 1,40	18,66 ± 2,30	14,16 ± 3,37	18,88 ± 2,64

### TESTE CLARO-ESCURO

Ao avaliar o tempo de latência para exposição ao lado claro, os animais dos grupos CTAP, HIAP, CTAE e HIAE não demonstraram diferenças significativas entre eles ( $F(1,34)=38,65;p=0,77$ ) (tabela 2).

Ao analisarmos o tempo de exposição ao ambiente claro, a ANOVA não mostrou efeito significativo nos grupos estudados ( $F(1,34)=73,23;p=0,69$ ) (tabela 2).

Na avaliação do número de entradas no ambiente claro, os resultados não mostram diferença significativa ( $F(1,34)=85,80;p=0,86$ ) (tabela 2).

Em relação ao número de entradas no ambiente escuro, não há diferença com significado estatístico, na ANOVA, entre os quatro grupos estudados ( $F(1,34)=88,20;p=0,70$ ) (tabela 2).

### Teste Claro e Escuro

Tabela 2: Dados representados por média±erro padrão.

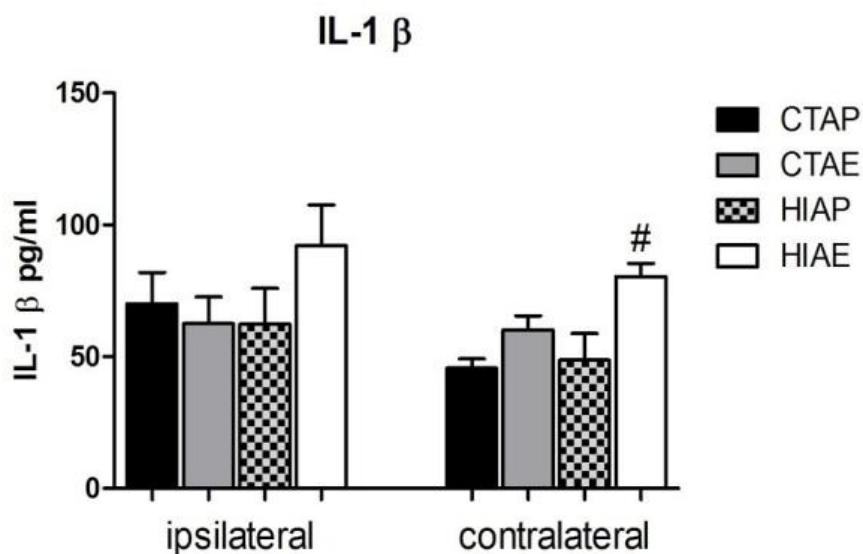
	CTAP	CTAE	HIAP	HIAE
Latência para exposição ao lado claro	12,08 ± 3,41	9,55 ± 3,06	10,00 ± 4,05	9,33 ± 2,00
Tempo de exposição no lado claro	110,91 ± 22,27	119,44 ± 29,46	125,75 ± 32,86	112,88 ± 26,00
Nº de entradas no lado claro	6,83 ± 1,10	7,88 ± 1,75	6,00 ± 1,59	6,55 ± 1,48
Nº de entradas no lado escuro	6,58 ± 1,08	7,77 ± 1,68	6,25 ± 1,48	6,33 ± 1,52

## BIOQUÍMICA

### INTERLEUCINA 1 – $\beta$

As análises dos ensaios bioquímicos para IL-1 $\beta$  mostram diferença significativa no fator ambiente ( $F(1,19)=12,04;p=0,002$ ). O teste *post hoc* de Tukey demonstra aumento significativo da expressão da proteína IL-1 $\beta$  no grupo HIAE quando comparado ao grupo CTAP ( $p=0,009$ ) e HIAP (0,0187) no lado contralateral à lesão (figura 2A).

No lado ipsilateral à lesão os grupos CTAP, HIAP, CTAE e HIAE não houve diferenças na expressão da IL-1 $\beta$  (figura 2A).

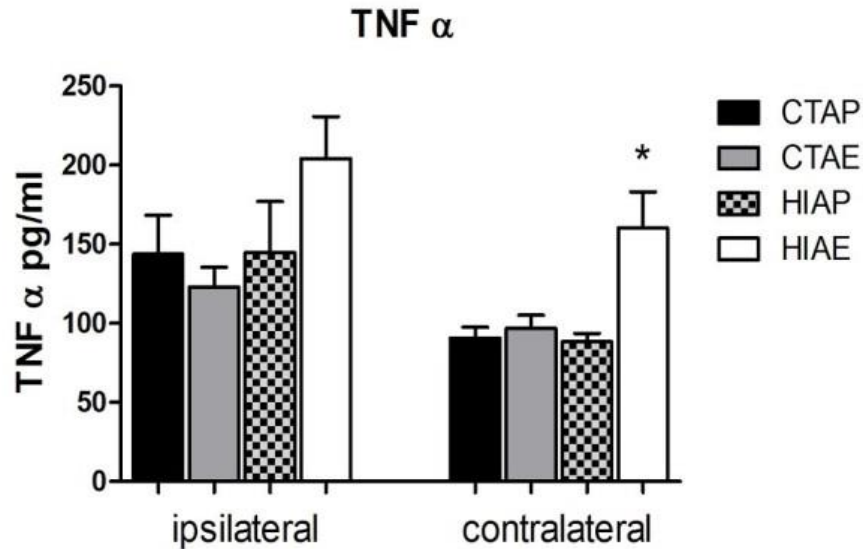


**Figura 2A:** Níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo. Dados representados por médias e erro padrão. (#diferença do grupo HIAE em relação aos grupos CTAP,CTAE e HIAP no hipocampo contralateral)

### FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA – TNF- $\alpha$

A avaliação da expressão do TNF- $\alpha$  identificou diferenças significativas tanto no fator lesão ( $F_{(1,19)}=6,87;p=0,016$ ), quanto no ambiente ( $F_{(1,19)}=11,27;p=0,003$ ) e na interação entre lesão e ambiente ( $F_{(1,19)}=7,88;p=0,011$ ) no hemisfério contralateral à lesão. O teste *post hoc* de Tukey demonstrou diferença significativa, com maior expressão de TNF- $\alpha$  no hemisfério esquerdo no grupo HIAE quando comparado aos outros grupos CTAP (0,003), CTAE (0,006) e HIAP (0,002) (figura 2B).

No hemisfério direito, não houve diferença significativa na expressão do fator de necrose tumoral alfa, entre os 4 grupos estudados (figura 2B).



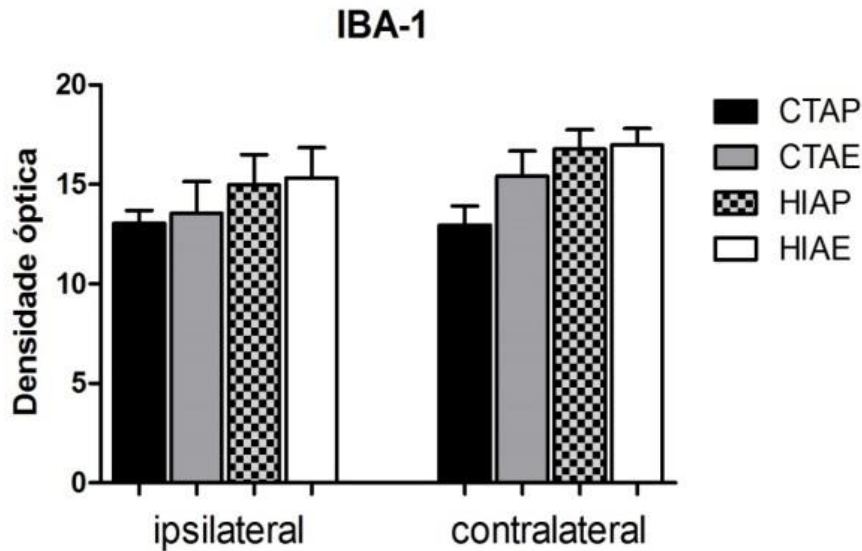
**Figura 2B:** Níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo de. Dados representados por médias e erro padrão. (#diferença do grupo HIAE em relação aos grupos CTAP, CTAE e HIAP no hipocampo contralateral)

## IMUNO-HISTOQUÍMICA

### DENSIDADE

Na contagem do número de microglias ativada por  $\mu\text{m}^2$  há diferença significativa no fator lesão ( $F_{(1,14)}=6,40; p=0,023$ ) no lado contralateral à lesão. O teste *post hoc* de Tukey não mostrou as diferenças entre os grupos, apenas uma tendência no aumento de ativação microglial nos grupos HIAP ( $p=0,096$ ) e HIAE ( $p=0,076$ ) quando comparados ao CTAP do mesmo lado (figura 3A).

No hemisfério ipsilateral à lesão, os resultados não apresentam alteração significativa na contagem de microglia ativada nos quatro grupos estudados (figura 3A).



**Figura 6A:** Imuno-histoquímica da expressão da microglia. Dados representados por médias e erro padrão.

## DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para pesquisar a ação microglial e a expressão de citocinas no hipocampo assim como a ansiedade de ratos expostos a um ambiente enriquecido após sofrerem HI encefálica neonatal. Sessenta dias após a lesão, parece haver uma maior ativação da microglia no hemisfério contralateral dos animais que sofreram a lesão comparados aos animais do grupo controle. O estudo também demonstrou que no 60 DPN, ocorreu um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , no hemisfério contralateral à lesão especificamente no grupo hipóxico-isquêmico estimulado. Na avaliação comportamental, os animais do grupo CT expostos ao EA mostraram comportamento de menor risco, em contraponto após a hipóxia-isquemia há um aumento do comportamento exploratório em espaços abertos nos animais mantidos em ambiente sem estimulação. Este comportamento de risco dos animais hipóxico-isquêmicos pareceu ser controlado pela estimulação ambiental.

## HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL E ATIVAÇÃO MICROGLIAL

A resposta imune possui como importante característica a ativação da microglia, células imunes inatas do encéfalo, conjuntamente com a migração de macrófagos periféricos, neutrófilos e monócitos para o local da lesão (Hedtjarn *et al.*, 2002; Wixey *et al.*, 2011). As células da microglia distribuem-se por todo o encéfalo adquirindo o papel de imuno-vigilância (Butovsky *et al.*, 2014; Parakalan *et al.*, 2012). A microglia exibe uma resposta complexa em condições de agravo ao tecido nervoso, sendo capaz de liberar mediadores citotóxicos que podem acentuar a lesão (Biran *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010; Vexler *et al.*, 2009), da mesma maneira que expressa imunomoduladores e fatores neurotróficos que podem contribuir na recuperação do dano encefálico (Lalancette *et al.*, 2007). A ativação da microglia é responsável pela fagocitose dos detritos celulares resultantes do desenvolvimento encefálico e sinaptogênese na fase fetal (Graeber *et al.*, 2010) além de possuir um papel funcional na proliferação astrocitária, diferenciação neuronal (Czeh *et al.*, 2011; Marin-Teva *et al.*, 2004; Paolicelli *et al.*, 2011; Walton *et al.*, 2006) e na resolução da inflamação (Colton *et al.*, 2009).

O presente estudo mostrou que a hipóxia-isquemia encefálica neonatal mantém a ativação microglial no hemisfério contralateral da lesão até a idade adulta. O fato de haver um significativo aumento de microglia ativada no hipocampo no 60º DPN é sugestivo das consequências tardias da inflamação, estabelecendo relação com os resultados de Geddes e colaboradores (2001) que mostraram dano progressivo e tardio ao tecido encefálico pós HI neonatal. A maior expressão quantitativa de Iba-1 em uma fase avançada da lesão de HI corroboram com o estudo de Bona e colaboradores (1999) que demonstrou

que a resposta inflamatória inicia imediatamente após a lesão de HI no sétimo dia pós-natal estendendo-se até o 35º DPN caracterizando como estado crônico de inflamação. A proteína Iba-1 é fundamental na reorganização do citoesqueleto de actina, migração, fagocitose e ativação microglial, os resultados do presente estudo corroboram com Lin e cols (2007) que mostraram aumento da proliferação de microglia ativada, através da imunohistoquímica para Iba-1, após HI na região de CA1 de hipocampus de rato juvenis quando comparados a ratos imaturos. Estudos como os de Ferrazzano e colaboradores (2013 e 2015) que demonstram maior ativação da microglia, proliferação e expressão de mediadores pró-inflamatórios em diversas estruturas encefálicas de ratos em sucessivas idades, certificam haver respostas da microglia, ante a inflamação, no período mais tardio da lesão. Assim, a hipóxia-isquemia gera uma resposta inflamatória que se mantém por dias ou até semanas após o insulto inicial (Hedtjarn *et al.*, 2004; Winerdal *et al.*, 2012; Hagberg *et al.*, 2015).

### HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL E TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Os resultados deste estudo demonstram que os animais com lesão hipóxico-isquêmica apresentam maior número e porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Há também aumento na porcentagem e tempo de permanência em braços abertos nos animais hipóxico-isquêmicos mantidos em ambiente padrão quando comparados aos animais saudáveis estimulados em ambiente enriquecido e avaliados no LCE.

A avaliação no LCE é baseada no conflito entre o comportamento de exploração espontânea dos roedores e a aversão aos potenciais perigos encontrados nas exposições dos braços abertos (Hogg *et al.*, 1996). O nosso

achado descrito acima indicando maior exposição aos braços abertos dos animais hipóxicos-isquêmicos evidencia que a lesão favorece o comportamento de risco, sendo notória que a aquisição da esquiva aos braços abertos não está presente nos animais HI. Estudos envolvendo ansiedade no modelo de HI neonatal como o de Fan e cols (2005) demonstraram aumento na porcentagem e no tempo de permanência nos braços abertos em animais hipóxicos-isquêmicos e o de Tang e cols (2014) mostrou uma diminuição do grau de ansiedade em animais lesionados avaliados no LCE. Tais resultados indicam que a HI causa um efeito prejudicial nos animais corroborando os dados do presente estudo. Porém, o efeito ansiolítico neste caso deve ser avaliado com cautela, visto que em roedores níveis adequados de ansiedade são inerentes para a manutenção da sobrevivência nestes animais. Alguns autores têm usado o termo “aprendizagem emocional” para o comportamento de aquisição da esquiva aos braços abertos no LCE (Elvander *et al.*, 2006; Le Maitre *et al.*, 2011; Da Cunha *et al.*, 2005), sendo este comportamento um processo de aprendizagem dependente do hipocampo (Pereira M. *et al.*, 2012; Mishima *et al.*, 2005). Nossos dados referentes ao comportamento no TCE não indicaram diferenças entre os grupos experimentais sendo que, todos apresentam clara preferência pelo ambiente escuro. Parece que o período de 10 minutos ao aparato mais facilmente induz uma aprendizagem emocional, que é caracterizada pelo comportamento adaptativo de permanecer no espaço protegido (Chaouloff *et al.*, 1997; Bourin & Hascoet, 2002). Esta preferência foi também expressa nos grupos HIs, independente da estimulação. Recentemente, um interessante estudo do nosso grupo mostrou que a HI está relacionada ao transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH),



revelando um aumento de respostas impulsivas em animais submetidos ao teste do 5-CSRTT na fase adulta (Miguel *et al.*, 2015). O comportamento impulsivo pode também justificar a maior porcentagem e número de entradas nos braços abertos e o maior percentual e tempo de permanência nos braços abertos encontradas no LCE do presente estudo.

Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que animais adolescentes hipóxico-isquêmicos apresentam déficit na memória de reconhecimento (Pereira *et al.*, 2009), memória aversiva (Carletti *et al.*, 2012) e memória espacial (Pereira *et al.*, 2009, Carletti *et al.*, 2016). Em animais adultos, já identificamos déficit de memória espacial (Pereira *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2015), de memória aversiva (Rojas *et al.*, 2013) e déficit de atenção (Miguel *et al.*, 2015) decorrentes da HI. Porém, existem poucos achados relacionados à HI e transtornos de ansiedade, impulsividade. O atual estudo demonstra que a hipóxia-isquemia encefálica neonatal ativa a microglia, alterando a relação exploração *versus* medo inato existente nos roedores. Evidências já demonstraram que a ativação microglial no hipocampo está relacionada a alterações no comportamento emocional em roedores, corroborando os nossos achados (Gonzalez-Perez *et al.*, 2001; Bilang-Bleuel *et al.*, 2005).

#### ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL, CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E ANSIEDADE

Sabe-se que uma das principais alterações causadas após lesões encefálicas no período perinatal é o grande aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias causadas pela ativação microglial (Colton *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2011).

Uma destas citocinas é a Interleucina-1 $\beta$ , que estimula reações inflamatórias, aumento de radicais livres e gera toxicidade por excesso de aminoácidos excitatórios (Wang *et al.*, 2015). Estudos clínicos demonstram relação entre o aumento de IL-1 $\beta$  e transtornos neurológicos aos 6 e 12 meses após a HI neonatal, mostrando que esta citocina está presente no progresso da lesão encefálica (Liu *et al.*, 2010; Aly *et al.*, 2006). A alta expressão de IL-1 $\beta$  no hipocampo mostra relação com grande perda de células neuronais e a presença de convulsão em crianças após lesão de HI (Schiering *et al.*, 2014), demonstrando que a expressão aumentada de IL-1 $\beta$  ocasiona também mudanças neurocomportamentais (Aronica *et al.*, 2012; Vezzani *et al.*, 2012 e 2013).

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é outra citocina pró-inflamatória liberada pela ativação da microglia acarretando efeito neurodegenerativo (Perry *et al.*, 2001). Sob outra perspectiva, diversos estudos tem demonstrado o papel neuroprotetor do TNF- $\alpha$  no sistema nervoso central (Gemma *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 1994; Aloe *et al.*, 1999). Baune e colaboradores (2008) mostraram que em condições fisiológicas normais o TNF- $\alpha$  é essencial para funções como memória e aprendizado bem como o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  está relacionado com alterações na plasticidade sináptica (Fiore *et al.*, 1996 e 2000; Small *et al.*, 2008; Tobinick *et al.*, 2008a).

Os dados do presente estudo mostraram um aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em animais hipóxico-isquêmicos submetidos ao enriquecimento ambiental. Dados da literatura revelam que há grande número de receptores de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no hipocampo de roedores, sugerindo ação nesta estrutura encefálica (Hopkins *et al.*, 1995; Rothwell *et al.*,

1995; Schobitz *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1997). Especificamente, pesquisas demonstram que a IL-1 $\beta$  tem sido relacionada com o condicionamento contextual de roedores, sugerindo exercer papel específico no hipocampo, estrutura fundamental na regulação dos mecanismos envolvidos no comportamento de medo (Kim *et al.*, 1992; Phillips *et al.*, 1992). Além disso, a interleucina-1 beta parece estar envolvida em desordens emocionais como a ansiedade (Anisman *et al.*, 1999; Clement *et al.*, 1998) resultando em aumento do comportamento ansioso no LCE (Cragolini *et al.*, 2006; Swiergiel *et al.*, 2007). O estudo de Koo e Doman (2009) demonstrou uma significativa redução no número de entradas nos braços abertos no LCE em animais com superexpressão de IL-1 $\beta$  assim como Connor e colaboradores (1998) constatou no LCE a redução do tempo e do número de entradas nos braços abertos de animais com níveis IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  aumentados. Estes resultados corroboram os do presente estudo, onde encontramos maior expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no hipocampo e o maior número de avaliações de risco e a menor porcentagem e tempo de permanência expostos aos braços abertos no LCE dos animais após a exposição ao EA. Logo, os dados bioquímicos e comportamentais encontrados no corrente estudo sugerem que animais expostos ao EA adquirem um comportamento mais ansiogênico, que seria um comportamento adequado dos roedores.

Em relação aos efeitos do EA, achados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram recuperação da perda de diferentes tipos de memória após HI em ratos avaliados na fase adulta (Pereira *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2013 e 2015), em animais adolescentes (Pereira *et al.*, 2008) associada à eficácia na reversão da diminuição da densidade dos espinhos dendríticos no

hipocampo (Pereira *et al.*, 2007 e 2008; Rojas *et al.*, 2013; ). Somado a isso, o estudo de Fernández-Teruel e colaboradores (1997) demonstrou que o EA tem efeitos benéficos em transtornos de ansiedade. Avaliando-se a literatura vigente, observam-se resultados divergentes sobre os efeitos do EA sobre o comportamento de roedores no LCE (Li *et al.*, 2016; Bahi *et al.*, 2017). Talvez a resolução do conflito entre esquivar-se do ambiente ameaçador e explorar este novo ambiente seja uma decisão complexa, envolvendo diferentes padrões de resposta, daí os diferentes achados na literatura.

Concluindo, o presente estudo mostrou que o enriquecimento ambiental, causa a superexpressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no hipocampo após HI encefálica neonatal, tal resultado foi associado a uma melhor resposta de aquisição da esquiva dos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Mostramos que a hipóxia-isquemia encefálica neonatal gera ativação microglial crônica, vista na fase adulta e que animais hipóxicos-isquêmicos não tratados com EA mostraram comportamento impulsivo no LCE. Esses achados ampliam nosso entendimento a respeito da neuroproteção causada pelo EA. O enriquecimento ambiental é eficaz na plasticidade encefálica, proporcionando mudanças morfológicas, bioquímicas e funcionais, atenuando as repercussões geradas pela lesão hipóxico-isquêmica encefálica neonatal.

## BIBLIOGRAFIA

Aloe, L., Properzi, F., 1999. Learning abilities, NGF and BDNF brain levels in twolines of TNF-alpha transgenic mice one characterized by neurological disorders the other phenotypically normal. *Brain Res.* 840,125–137.

Aly H, Khashaba MT., El-Ayouty M., 2006. IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev.* 28,178–82

Anisman, Z., Merali.,1999. Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 461,199–233.

- Aronica E., Ravizza T., Zurolo E., 2012. Astrocyte immune responses in epilepsy. *Glia*. 60,1258-68
- Bahi A., 2017. Environmental enrichment reduces chronic psychosocial stress-induced anxiety and ethanol-related behaviors in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*. 77,65-74.
- Baune, B.T., Ponath, G., 2008b. Association between genetic variants of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha cytokines and cognitive performance in the elderly general population of the MEMO-study. *Psychoneuroendocrinology*. 33, 68–76.
- Bilang-Bleuel, AS., Ulbricht, S., Chandramohan, Y., De Carli, S., Droste, SK., Reul, JM.H., 2005. Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioral response. *Eur. J. Neuroscience*. 22,1691–700.
- Biran, V., Joly, L.M., Heron, A., Vernet, A., Vega, C., Mariani, J., Renolleau, S., Charriaut-Marlangue, C., 2006. Glial activation in white matter following ischemia in the neonatal P7 rat brain. *Exp. Neurol*. 199, 103–112.
- Bona, A.L., Andersson, K., Blomgren et al.,1999. Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. *Pediatric Research*. 45,500–509.
- Bourin, M., Hascoet, M., 2003. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*. 463, 55-65.
- Brambilla, F., Monteleone, P., Maj, M., 2004. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in children with major depressive disorder or dysthymia. *J. Affect Disord*. 78,273-7.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P.M., Doykan, C.E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J.D., Ransohoff, R.M., Gygi, S.P., Antel, J.P., Weiner, H.L., 2014. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci*. 17, 131–143.
- Campbell, I.L., Stalder, A.K., *et al.*, 1997. Transgenic models to assess the pathogenic actions of cytokines in the central nervous system. *Mol. Psychiatry* 2,125–129
- Carletti, J.V., Deniz, B.F., Miguel, P.M., Rojas, J.J., Kolling, J., Scherer, E.B., de Souza Wyse, A.T., Netto, C.A., Pereira, L.O., 2012. Folic acid prevents behavioral impairment and Na(+), K(+) -ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochem. Res*. 37, 1624–1630.
- Carletti, J.V., Deniz, B.F., Rojas, J.J., Miguel, P.M., Kolling, J., Scherer, E.B., de Souza Wyse, A.T., Netto, C.A., Pereira, L.O., 2016. Folic acid can contribute to memory deficit and Na+, K+-ATPase failure in the hippocampus of adolescent rats submitted to hypoxia-ischemia. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets* 15, 64–72.

Chaouloff, F., Durand, M., Mormede, P., 1997. Anxiety and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behavioural Brain Research*. 85,27-35.

Cheng, B., Christakos, S., 1994. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12, 139–153.

Clement, G., Chapouthier., 1998. Biological bases of anxiety, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 623–633

Colton, C.A., 2009. Heterogeneity of microglial activation in the innate immuneresponse in the brain. *J. NeuroimmunePharmacol.* 4, 399–418.

Cragolini, H.B., Schiöth, T.N., Scimonelli., 2006. Anxiety-like behavior induced by IL-1 is modulated by MSH through central melanocortin-4 receptors, *Peptides*. 27,1451–1456.

Czeh, M., Gressens, P., Kaindl, A.M., 2011. The yin and yang of microglia. *Dev. Neurosci.* 33,199–209.

Da Cunha, IC., José, RF., Orlandi Pereira, L., Pimenta, JA., Oliveira de Souza, IA., Reiser, R., Moreno, H, Jr., Marino Neto, J., Paschoalini, MA., Faria, MS., 2005. The role of nitric oxide in the emotional learning of rats in the plus-maze. *Physiol Behav.* 16,351-8.

Deng, W., 2010. Neurobiology of injury to the developing brain. *Nat. Rev. Neurol.* 6,328–336.

Diaz, R., Miguel, PM., Deniz, BF., Confortim, HD., Barbosa, S., Mendonça, MC., da Cruz-Höfling, MA., Pereira, LO., 2016. Environmental enrichment attenuates the blood brain barrier dysfunction induced by the neonatal hypoxia-ischemia. *Int. J. Dev. Neurosci.* 53,35-45.

Elvander-Tottie, E., Eriksson, TM., Sandin, J., Ogren, SO., 2006. N-methyl-D-aspartate receptors in the medial septal area have a role in spatial and emotional learning in the rat. *Neuroscience.* 142,963-78.

Fan, L.W., Tien, L.T., Zheng, B., Pang, Y., Lin, R.C., Simpson, K.L., Ma, T., Rhodes, P.G., Cai, Z., 2011. Dopaminergic neuronal injury in the adult rat brain following neonatal exposure to lipopolysaccharide and the silent neurotoxicity. *BrainBehav. Immun.* 25, 286–297.

Fiore, M., Angelucci, F., *et al.*, 2000. Learning performances, brain NGF distribution and NPY levels in transgenic mice expressing TNF-alpha. *Behav. Brain Res.* 112(1–2), 165–175.

Fiore, M., Probert, L., *et al.*, 1996. Neurobehavioral alterations in developing transgenic mice expressing TNF-alpha in the brain. *Brain Behav Immun.* 10,126-38.

Frommberger, UH., Bauer, J., Haselbauer, P., Fraulin, A., Riemann, D., Berger, M., 1997. Interleukin-6-(IL-6) plasma levels in depression and schizophrenia:

comparison between the acute state and after remission. *Eur Arch Psychiatry Clin. Neurosci.* 247, 228-33.

Geddes, R. C., Vannucci, S. J., Vannucci, S. J., 2001. "Delayed cerebral atrophy following moderate hypoxia-ischemia in the immature rat," *Developmental Neuroscience.* 23, 180–185.

Gemma, C., Catlow, B., *et al.*, 2007. Early inhibition of TNF $\alpha$  increases 6-hydroxydopamine-induced striatal degeneration. *Brain Res.* 1147, 240–247.

Gonzalez-Perez, O., Ramos-Remus, C., Garcia-Estrada, J., Luquin, S., 2001. Prednisone induces anxiety and glial cerebral changes in rats. *J Rheumatol* 28, 2529–34.

Graeber, M.B., Streit, W.J., 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 89–105.

Hagberg, H., Gressens, P., Mallard, C., 2012. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann. Neurol.* 71, 444–457.

Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Levison, S.W., Vexler, Z.S., Gressens, P., 2015. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 192–208.

Hedtjarn, A.L., Leverin, K., Eriksson, K., Blomgren, C., Mallard, H., Hagberg, H., 2002. "Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury," *The Journal of Neuroscience.* 22, 5910–5919.

Hedtjarn, C., Mallard, H., Hagberg, H., 2004. "Inflammatory gene profiling in the developing mouse brain after hypoxia ischemia". *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 24, 1333–135.

Hogg, A., 1996. Review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54, 21–30.

Hopkins, S.J., Rothwell, N.J., 1995. Cytokines in the nervous system I: Expression and recognition. *Trends Neurosci.* 18, 83–88

Horii, Y., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Shiosaka, S., 2008. Increased anxiety-like behavior in neuropsin (kallikrein-related peptidase 8) gene-deficient mice. *Behav Neurosci.* 122, 498-504.

Jansen, E.M., 1996. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behavioural Brain Research.* 78, 189-94.

Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, Northington F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol.* 2011;10(4):372-382.

Kaestner, F., Hettich, M., Peters, M., Sibrowski, W., Hetzel, G., Ponath, G., Arolt, V., Cassens, U., Rothermundt, M., 2005. Different activation patterns of

proinflammatory cytokines in melancholic and non-melancholic major depression are associated with HPA axis activity. *J Affect Disord.* 87,305-11.

Kenney, J. W., Raybuck, J. D., Gould, T. J., 2012. Nicotinic receptors in the dorsal and ventral hippocampus differentially modulate contextual fear conditioning. *Hippocampus.* 22,1681-90.

Kim, M.S., Fanselow., 1992. Modality specific retrograde amnesia of fear. *Science.* 256,675–677.

Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A.,Weng, Y.C., Kriz, J., 2007. Selective ablationof proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J. Neurosci.* 27, 2596–2605.

Le Maître, TW., Xia, S., Le Maitre, E., Dun, XP., Lu, J., Theodorsson, E., Ogren, SO., Hökfelt, T., Xu, ZQ., 2011. Galanin receptor 2 overexpressing mice display an antidepressive-like phenotype: possible involvement of the subiculum. *Neuroscience.* 8,270-88.

Li, KA., Lund, ET., Voigt, JP., 2016. The impact of early postnatal environmental enrichment on maternal care and offspring behaviour following weaning. *Behav Processes.* 122,51-8.

Liu,J., and Feng,Z.C., 2010. Increased umbilical cord plasma interleukin-1 beta levels was correlated with adverse outcomes of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J.Trop.Pediatr.* 56,178–182.

Marin-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N.,Mallat, M., 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41, 535–547.

Miguel, P.M., Schuch, C.P., Rojas, J.J., Carletti, J.V., Deckmann, I., Martinato, L.H.,Pires, A.V., Bizarro, L., Pereira, L.O., 2015. Neonatal hypoxia-ischemia inducesattention-deficit hyperactivity disorder-like behavior in rats.*Behav. Neurosci.*129, 309–320.

Mishima, K., Ikeda, T., Aoo, N., Takai, N., Takahashi, S., Egashira, N., et al. 2005. Hypoxia–ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neurosci Lett.* 376,194–199.

Pace, TW., Mletzko, TC., Alagbe, O., Musselman, DL., Nemeroff, CB., Miller, AH., Heim, CM., 2006. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *Am J Psychiatry.* 163,1630-3.

Pan, W., Kastin, A., 2001. Upregulation of the transport system for TNF $\alpha$  at theblood–brain barrier. *Arch. Physiol. Biochem.* 109, 350–353.

Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto,M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2011. Synapticpruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science.* 333,1456–1458.



- Parakalan, R., Jiang, B., Nimmi, B., Janani, M., Jayapal, M., Lu, J., Tay, S.S., Ling, E.A., Dheen, S.T., 2012. Transcriptome analysis of amoeboid and ramified microglia isolated from the corpus callosum of rat brain. *BMC Neurosci.* 13, 64-72.
- Pereira, M., Martynhak, B.J., Andreatini, R., Svenningsson, P., 2015. 5-HT6 receptor agonism facilitates emotional learning. *Front Pharmacol.* 16, 6-200.
- Pereira, L.O., Arteni, N.S., Petersen, R.C., da Rocha, A.P., Achaval, M., Netto, C.A., 2007. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87, 101-108.
- Pereira, L.O., Nabinger, P.M., Strapasson, A.C., Nardin, P., Gonçalves, C.A., Siqueira, I.R., Netto, C.A., 2009. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia-ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. *Brain Res.* 1247, 188-195.
- Perry, R.T., Collins, J.S., *et al.*, 2001. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 22, 873-883.
- Phillips, J.E., LeDoux, 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106, 274-285.
- Rojas, J.J., Deniz, B.F., Miguel, P.M., Diaz, R., Hermel, E., do, E., Achaval, M., Netto, C.A., Pereira, L.O., 2013. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Exp. Neurol.* 241, 25-33.
- Rojas, J.J., Deniz, B.F., Schuch, C.P., Carletti, J.V., Deckmann, I., Diaz, R., Matté, C., dos Santos, T.M., Wyse, A.T., Netto, C.A., Pereira, L.O., 2015. Environmental stimulation improves performance in the ox-maze task and recovers Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus of hypoxic-ischemic rats. *Neuroscience* 291, 118-127.
- Rothwell, N.J. and Hopkins, S.J. 1995. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 18, 130-136.
- Schiering, I.A., de Haan, T.R., Niermeijer, J.M., Koelman, J.H., Majoie, C.B., Reneman, L., *et al.*, 2014. Correlation between clinical and histologic findings in the human neonatal hippocampus after perinatal asphyxia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 324-334.
- Schobitz, B., De Kloet, E.R., Sutanto, W., and Holsboer, F., 1993. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1426-1435.
- Schwartz, M., Sivron, T., *et al.*, 1994. Cytokines and cytokine-related substances regulating glial cell response to injury of the central nervous system. *Prog. Brain Res.* 103, 331-341
- Small, D.H., 2008. Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic caling drive disease progression? *Trends Mol. Med.* 14, 103-108.

- Swiergiel, A.J., Dunn., 2007. Effects of interleukin-1 and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 651–659.
- Tang, Q1., Liu, F.R., Luo, Y.L., Hei, M.Y., 2014. Effect of IGF-1 on long-term anxiety-like behavior in rats after hypoxic-ischemic brain damage. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 16,295-300.
- Thomas, A.J., Davis, S., Morris, C., Jackson, E., Harrison, R., O'Brien, J.T., 2005. Increase in interleukin-1beta in late-life depression. *Am J Psychiatry.* 162,175-7.
- Tobinick, E.L., Gross, H., 2008a. Rapid cognitive improvement in Alzheimer's disease following perispinal etanercept administration. *J. Neuroinflamm.* 9,5-12 2.
- Vexler, Z.S., Yenari, M.A., 2009. Does inflammation after stroke affect the developing brain differently than adult brain? *Dev. Neurosci.* 31, 378–393.
- Vezzani, A., Aronica, E., Mazarati, A., 2013. Epilepsy and brain inflammation. *Exp. Neurol.* 244,11-21.
- Vezzani, A., Auvin, S., Ravizza, T., 2012. Glia-neuronal interactions in ictogenesis and epileptogenesis: Role of inflammatory mediators. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, eds. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4th ed. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information.
- Walton, N.M., Sutter, B.M., Laywell, E.D., Levkoff, L.H., Kearns, S.M., Marshall 2nd, G.P., Scheffler, B., Steindler, D.A., 2006. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54, 815–825.
- Wang, Q., Wu, S., Yang, L., Ren, P., Yang, Y., et al., 2015. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebro spinal fluid. *Clin. Chim. Acta* 450,282–297.
- Williamson, L.L., Sholar, P.W., Mistry, R.S., Smith, S.H., Bilbo, S.D., 2011. Microglia and memory: modulation by early-life infection. *J. Neurosci.* 31, 15511–15521
- Winerdal, M.E., Winerdal, J., Kinn, V., Urmaliya, O., Winqvist., 2012. "Long lasting local and systemic inflammation after cerebral hypoxic ischemia in Newborn Mice," *PLoS ONE.* 5,36-46.
- Wixey, H. E., Reinebrant, S. J., Spencer, and K. M. Buller., 2011. "Efficacy of post-insult minocycline administration to alter long-term hypoxia-ischemia-induced damage to the serotonergic system in the immature rat brain," *Neuroscience.* 182,184–192.
- Zorrilla, E.P., Luborsky, L., McKay, JR., Rosenthal, R., Houldin, A., Tax, A., McCorkle, R., Seligman, DA., Schmidt, K., 2001. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun.* 15,199-226.

## Discussão

Os objetivos desta tese foram estudar os efeitos da exposição precoce ao ambiente enriquecido sobre a estrutura da barreira hematoencefálica, a neuroinflamação e os transtornos cognitivo-comportamentais relacionados à ansiedade de animais submetidos à hipóxia-isquemia encefálica neonatal.

Os dados apresentados nesta tese pretendem esclarecer o papel do enriquecimento ambiental como uma alternativa de neuroproteção, minimizando e/ou revertendo os danos ao SNC causado pela HI neonatal. A estimulação na prática clínica vem sendo frequentemente utilizada e os resultados aqui demonstrados podem servir de suporte para fundamentação científica destas condutas.

Estratégias neuroprotetoras, como o enriquecimento ambiental, que reduzam os efeitos deletérios após a encefalopatia hipóxico-isquêmica são necessárias. Sabe-se que a exposição ao EA promove contínuas mudanças na morfologia (Rojas *et al.*, 2013; Leggio *et al.*, 2005; Bruel-Jungerman *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 1999) e também, em aspectos moleculares (Lambert *et al.*, 2005; Puurunen *et al.*, 2001; Ickes *et al.*, 2000) e cognitivos (Pereira *et al.*, 2007, 2008; Rojas *et al.*, 2013; Van Praag *et al.*, 2000) encefálicos de roedores. O aumento de células da glia (oligodendrócitos), da arborização dendrítica, da densidade das vesículas sinápticas e da densidade de espinhos dendríticos assim como o maior número de sinapses e estimulação da neurogênese são alterações causadas pelo EA (Ip *et al.*, 2002; Rosenzweig e Bennett 1996; Nakamura *et al.*, 1999; Kolb *et al.*, 1998). Inúmeros protocolos de enriquecimento ambiental são adotados, dentre as diferenças encontradas entre eles, podemos citar: tamanho das caixas, duração da exposição ao EA e a frequência na troca de objetos. Estudos empregam o EA permanente após

evento isquêmico, de outra forma há protocolos de EA prévio à isquemia e protocolos de estimulação durante determinado período do dia (Biernaskie *et al.*, 2001; Belayev *et al.*, 2003; Rampon *et al.*, 2000; Frick *et al.*, 2003; Gobbo *et al.*, 2004). Dados existentes sobre os efeitos do EA após lesão hipóxico-isquêmica encefálica neonatal são reservados apenas aos resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa (Pereira *et al.*, 2007, 2008 e 2009; Rojas *et al.*, 2013 e 2015). A estimulação precoce, como conduta escolhida para a realização do presente estudo, demonstra efeito benéfico na recuperação do déficit de memória (Pereira *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2004) e modifica os níveis de neurotrofina (Branchi *et al.*, 2005). Expor os animais desde cedo a estímulos, conjuntamente com a mãe por meio do enriquecimento ambiental precoce, proporciona maiores alternativas de modulação e adaptação à lesão HI, podendo alterar o comportamento social, minimizar danos morfológicos e contribuir para a plasticidade encefálica.

A HI encefálica neonatal é a condição patológica estabelecida quando o suprimento de oxigênio ao tecido cerebral é insuficiente para a demanda metabólica. Em síntese, com a insuficiência no fornecimento de O<sub>2</sub>, os mecanismos celulares que dependem de energia como a manutenção do gradiente iônico da membrana celular e a recaptção de neurotransmissores sofrem uma interrupção. Conseqüentemente a isso, a grande concentração de neurotransmissores acarreta a excitotoxicidade, aumento de cálcio livre intracelular, ativação de enzimas (proteases, lipases, endonucleases) e a geração de radicais livres gerando morte celular por necrose ou por apoptose (Kaur&Ling, 2009; Volpe, 2008).

A hipóxia é um evento com repercussões agudas de inflamação na região afetada conforme descrito por Dammann e colaboradores (2008), induzindo o acúmulo de radicais livres (Row *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2005) e de mediadores inflamatórios (Tam *et al.*, 2007; Savransky *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2006). Estudos demonstram a liberação de citocinas após um insulto hipóxico-isquêmico (Arvin *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 2012; Chalak *et al.*, 2014), tendo o pico nas primeiras 24h após o insulto encefálico.

As citocinas pró-inflamatórias têm importância fundamental para mediar as vias de inflamação associadas à lesão causada pelo insulto hipóxico-isquêmico (Leviton *et al.*, 2011; McAdams, 2012). O TNF- $\alpha$  e a IL1-B são citocinas que possuem características pró-inflamatórias, sendo essenciais para o desenvolvimento encefálico. Ademais, possuem fatores que contribuem para o início e desenvolvimento de sinais inflamatórios decorrentes do evento hipóxico-isquêmico (Pantoni *et al.*, 1998; Ferriero, 2004).

O TNF- $\alpha$  é conhecido como potente ativador de apoptose e seus níveis permanecem elevados no tecido encefálico 7 dias após o insulto isquêmico (Liu *et al.*, 1994; Bullock *et al.*, 1995; Mountz *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 2000;). Já a IL-1B é uma citocina pró-inflamatória que apresenta aumento da expressão após a HI (Sadowska *et al.*, 2012) e atua como mediador de cascatas inflamatórias resultando em apoptose e ativação de caspases (Rothwell, 1999; Thornton *et al.*, 2006; Brough e Rothwell, 2007).

As citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são reconhecidas por mediar a disfunção da BHE pós HI (Ballabah *et al.*, 2004). Tais alterações na barreira incluem a descontinuidade das junções de oclusão, em particular da

proteína ocludina, causando o aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica. Porém, existem poucos estudos demonstrando a função da BHE após a encefalopatia hipóxico isquêmica (Brochu *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013).

No presente estudo, os animais com 8DPN, não demonstraram diferenças na expressão das proteínas ocludina,  $\beta$ -catenina, conexina-43, GLUT1, aquaporina 4 e GFAP entre o grupo controle e o grupo HI. Quando avaliado o extravasamento do corante azul de Evans no encéfalo destes animais ficou evidente igual coloração no tecido encefálico de ambos os grupos. Tais resultados, 24h após a HI, corroboram os dados do tradicional estudo de Mclean e Ferriero (2004) que afirma haver características de imaturidade da BHE em neonatos. O estudo de Lam e colaboradores (2015) demonstrou baixos níveis da glicoproteína P (proteína constituinte da BHE) em encéfalos de humanos recém-nascidos, fazendo uma relação translacional com os achados em roedores. A imaturidade da barreira hematoencefálica também foi definida por Fernández-López (2012) ao não encontrar diferença na expressão de marcadores de lâmina basal e junções de oclusão em neonatos 24h após ocluir transitoriamente a artéria carótida e comparar com animais do grupo controle. Ainda, para certificar os dados encontrados neste estudo e corroborar com a definição de imaturidade da BHE, os dados recentes de Moretti e colaboradores (2015) demonstram uma cobertura incompleta de pericitos nos vasos sanguíneos encefálicos de roedores na fase de desenvolvimento.

A complexidade envolvida na patogenia da lesão encefálica tem envolvimento de inúmeras vias e mecanismos (Damman *et al.*, 2011) e os

eventos ligados à lesão hipóxico-isquêmicas ocorrem de forma simultânea acarretando múltiplas disfunções (Vexler e Ferriero, 2001; Hossain, 2005; Chen *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2013). Diversos estudos demonstram que a hipóxia-isquemia encefálica neonatal causa dano progressivo ao tecido nervoso (Mclean e Ferriero, 2004; Hossain, 2008; Carloni *et al.*, 2007) especialmente no hipocampo (Pereira *et al.*, 2007 e 2008).

Atestando os achados citados acima referentes à progressão da lesão, nossos resultados demonstram redução da proteína ocludina expressa no hipocampo de animais HI com 22DPN mantidos em ambiente padrão e o maior extravasamento do corante azul de Evans no mesmo grupo, demonstrando a uma maior permeabilidade da BHE 14 dias após o evento lesivo. Essa modificação na quantidade de ocludina pode estar associada ao processo inflamatório latente e acaba por alterar as junções de oclusão da BHE, liberando assim o transporte paracelular (Coisne & Engelhardt, 2011). É sabido também que as citocinas pró-inflamatórias influenciam diretamente no aumento da permeabilidade da BHE, degradando as JOs (Rosenberg, 2009) e permitindo a invasão de patógenos (Labus *et al.*, 2014).

É de consenso na literatura vigente, que a estimulação precoce através do enriquecimento ambiental produz inúmeros benefícios após a lesão hipóxico-isquêmica, (Pereira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2013; Rojas *et al.*, 2015) e desempenhando papel neuroprotetor (Rojas *et al.*, 2013; Schuch *et al.*, 2016; Urakawa *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2013). No presente estudo, os animais expostos ao EA de forma precoce, apresentaram preservação nos níveis da proteína ocludina, prevenindo o quadro de ruptura da BHE demonstrado em animais do grupo HI mantidos em ambiente padrão.



Um estudo recente de Zhang e colaboradores (2017) demonstrou que o EA aumenta a área de superfície vascular de animais isquêmicos, justificando os nossos achados. Tal efeito pode vir acompanhado de um aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o qual está associado à elevada densidade vascular, angiogênese e o crescimento e diferenciação de células endoteliais (Zhang *et al.*, 2002a; Bengoetxa 2008; Takahashi & Shibuya, 2005; Hermann & Zacarias, 2009). Esta hipótese é fundamentada pelos estudos que demonstram que o EA aumenta a expressão de VEGF no hipocampo (Bengoetxa 2008; During & Cao, 2006; Huang & Hsu, 2012). Assim sendo, é possível propor que a formação de novos vasos acarreta no aumento de células endoteliais, das JOs e, conseqüentemente, da proteína ocludina. Ainda, a maior angiogênese pode ser interpretado como um mecanismo de defesa, ajudando a restaurar o fornecimento de oxigênio e nutrientes ao tecido encefálico isquêmico (Risau, 1997; Beck & Plate, 2009). Outra informação importante a ser considerada é que ocorre um aumento nos níveis de VEGF após um evento hipóxico, como uma resposta espontânea de proteção tecidual (Ferrara *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2013). Esse mecanismo pode ter sido potencializado pelo EA sendo eficaz e viabilizando a recuperação funcional da BHE.

Este estudo observou que a HI foi acompanhada de uma resposta inflamatória tardia, apresentando ativação microglial e maior expressão de citocinas pró-inflamaórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) no 60DPN no hipocampo (contralateral à isquemia) de animais submetidos ao EA. De acordo com os nossos dados, Lalancette e cols (2007) demonstraram que a microglia exacerbada, expressa fatores neurotróficos que irão regenerar o tecido

encefálico após o evento isquêmico. Ainda, o estudo de Vezzani e colaboradores (2013) demonstra que maior expressão de IL-1 $\beta$  é capaz de causar alterações comportamentais assim como Tobinick e colaboradores (2008a) demonstraram que maior expressão de TNF- $\alpha$  altera a plasticidade sináptica. No presente estudo, destaca-se a melhora cognitiva dos animais estimulados quando avaliados no labirinto em cruz elevado, os animais HI enriquecidos apresentam melhor resposta ao conflito no aparato. No LCE, espera-se uma resposta adaptativa indicando a preferência pelos espaços fechados, em detrimento da intenção de explorar a novidade. O enriquecimento parece favorecer a decisão deste conflito, viabilizando a observação da aprendizagem emocional no aparato nos animais hipóxico-isquêmicos estimulados.

Ainda, nossos resultados demonstram que o enriquecimento ambiental se mostra eficaz no reestabelecimento da BHE a longo prazo, uma vez que animais submetidos ao EA, apresentaram aumento da expressão de ocludina,  $\beta$ -catenina e GFAP no 60 DPN, sugerindo que a estimulação precoce contribui para minimizar os danos causados pela HI. O enriquecimento ambiental tem sido bastante difundido como uma estratégia neuroprotetora eficaz, ocasionando recuperação funcional e de danos encefálicos causados pelo modelo de HI neonatal (Pereira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2013; Rojas *et al.*, 2015).

Nesta tese mostramos que o EA tem potencial neuroprotetor, sendo eficaz na recuperação de alterações estruturais e funcionais da BHE na região CA1 do hipocampo. No mesmo sentido, avaliando-se os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , o EA parece alterar o perfil inflamatório, revertendo os déficits

cognitivos relacionados à aquisição da esquiva ao perigo. A estimulação precoce, com início no período neonatal afeta o comportamento, estimula a neurogênese hipocampal e protege o hipocampo de perdas neuronais importantes. A interação social, a atividade física e a exposição constante ao aprendizado, proporcionadas pelo enriquecimento ambiental, altera a estrutura e função encefálica de roedores, dados estes que ficaram evidentes nesta tese.

Finalizando, os resultados demonstrados nesta tese podem ser adicionados aos já publicados em estudos do nosso laboratório que apontam a estimulação precoce através do EA como uma importante ferramenta no processo de reabilitação neurofuncional sendo aplicável como base científica para estudos translacionais voltados para condutas clínicas em seres humanos.

## *Conclusões*

Os resultados apresentados nesta tese nos permitem concluir que:

- A barreira hematoencefálica se mostra imatura no 8DPN apresentando extravasamento do corante azul de Evans nos animais do grupo HI e do grupo controle;

- O EA aumentou quantidade de ocludina expressa em animais submetidos à HI nos 22 DPN;

- Animais HI submetidos ao EA apresentaram elevada expressão ocludina,  $\beta$ -catenina e GFAP no 60DPN preservando a estrutura da BHE;

- O enriquecimento ambiental ocasionou melhora cognitiva relacionada à ansiedade no LCE em animais submetidos à HI;

- O EA em animais HI elevou a expressão de Interleucina 1- $\beta$  e fator de necrose tumoral em animais com 60DPN.

- A HI neonatal resultou em alteração na estrutura e função da barreira hematoencefálica avaliada no 22DPN observado na reduzida expressão da proteína ocludina.

- A HI neonatal no 60DPN apresentou perfil de lesão progressiva, com a redução das proteínas ocludina,  $\beta$ -catenina e GFAP;

## *Perspectivas*

Partindo dos resultados alcançados nesta tese outros aspectos devem ser investigados:

- a expressão e perfil inflamatório de citocinas pró-inflamatórias na amígdala devido ao seu envolvimento no comportamento de ansiedade / medo;
- a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias na fase aguda da lesão, em animais com 8DPN;
- os parâmetros bioquímicos de citocinas anti-inflamatórias como IL-6 e IL-10 para traçar a evolução inflamatória da lesão HI, em diferentes momentos do desenvolvimento;
- os diferentes protocolos de EA e avaliar alterações morfológicas, bioquímicas e comportamentais estudadas neste trabalho.
- as contribuições do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em animais expostos ao EA.
- as associações do BDNF com a exposição ao EA após lesão HI.
- os fatores epigenéticos relacionados ao EA após a lesão HI e o comportamento de ansiedade / medo.

## *Bibliografia*



Abbas, A.K., Lichtman, A.H., 2005. *Imunologia Celular e Molecular*. São Paulo, Saunders-Elsevier.

Abbas, A.K., Janeway, C.A., 2000. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. *Cell*. 100, 129-138.

Abbot, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*. 37, 13-25.

Alvarez-Díaz, A., Hilario, E., de Cerio, F.G., Valls-i-Soler, A., 2007. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain: key vascular and cellular players. *Neonatology*. 92, 227–235.

Arteni, Nice, Sarmiento., 2003. Neonatal cerebral hypoxia–ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Research*. 973, 171-178.

Arvin, B., Neville, LF., Barone, FC., Feuerstein, GZ., 1996. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neuroscience Biobehav. Rev.* 20,445–452.

Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., Yirmiya, R., 2003. Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus*. 13, 826-834.

Ballabah, P., Braun, A., Nedergaard, M., 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16, 1-13.

Barbara, B., 2010. Aquaporin Biology and Nervous System. *Current Neuropharmacology*. 8, 97-104.

Barone, FC., Arvin, B., White, RF., Miller, A., Webb, CL., Willette, RN., Lysko, PG., Feurstein, GZ., 1997. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : a mediator of local ischemic brain injury. *Stroke*. 28, 1233-44.

Beck, H., Plate, K.H., 2009. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* 117,481–496.

Belayev, A., Saul, I., Liu, Y., Zhao, W., Ginsberg, M.D., Valdes, M.A., Busto, R., Belayev, L., 2003. Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 964, 121-7.

Bengoetxea, H., Argandona, E. G., & Lafuente, J. V., 2008. Effects of visual experience on vascular endothelial growth factor expression during the postnatal development of the rat visual cortex. *Cereb. Cortex.* 18, 1630-9.

Berger, R., Garnier, Y., 1999. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res. Rev.* 30,107-34.

Blackburn, S., 1998. Environmental impact of the NICU and developmental outcomes. *J. Pediatr. Nurs.* 13, 279-89.

Boche, D., Perry, V. H., Nicoll, J. A., 2013. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 39, 3-18.

Bonkowski, D., Katyshev, V., Balabanov, R.D., Borisov, A., Dore-Duffy, P., 2011. The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids and Barriers of the CNS.* 8,2-12.,2011.

Branchi, I., Ricceri, L., 2004. Refining learning and memory assessment in laboratory rodents: an ethological perspective. *Ann. Ist. Super Sanita.* 40, 231-236.

Brough, D., Rothwell, N.J., 2007. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J. Cell Sci.* 120, 772–781.

Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., Rampon, C., 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 21, 513–521.

Bullock, R., Zauner, A., Woodward, J., Young, H.F., 1995. Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. *Stroke.* 26, 2187-9.

- Buwalda, B., Nyakas, C., Vosselman, H.J., Luiten, P.G.M., 1995. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. *Behav. Brain Res.* 67, 85-90.
- Cacci, E., Claasen, J.H., Kokaia, Z., 2005. Microglia-derived tumor necrosis factor alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J. Neuroscience Res.* 80, 789–797.
- Carletti, J.V., et al., 2012. Folic acid prevents behavioral impairment and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia–ischemia. *Neurochemical Research.* 37, 1624-1630.
- Carletti, J.V., et al., 2016. Folic acid can contribute to memory deficit and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase failure in the hippocampus of adolescent rats submitted to hypoxia-ischemia. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 15, 64-72.
- Carlioni, S., Carnevali, A., Cimino, M., Balduini, W., 2002. Extended role of cerebral cortex of the developing rat. *J. Neurotrauma.* 19, 573–585.
- Chalak, L.F., Sanchez, P.J., Adams-Huet, B., Laptook, A.R., Heyne, R.J., Rosenfeld, C.R., 2014. Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr.* 164, 468–474.
- Chen, C.Y., Sun, W.Z., Kang, K.H., Chou, H.C., Tsao, P.N., Hsieh, W.S., Fu, W.M., 2015. Hypoxic preconditioning suppresses glial activation and neuroinflammation in neonatal brain insults. *Mediators Inflamm.* 632592, 2-13.
- Chen, X., Sadowska, G.B., Zhang, J., Kim, J.E., Cummings, E.E., Bodge, C.A., Lim, Y.P., Makeyev, O., Besio, W.G., Gaitanis, J., Threlkeld, S.W., Banks, W.A., Stonestreet, B.S., 2015. Neutralizing anti-interleukin-1 antibodies modulate fetal blood-brain barrier function after ischemia. *Neurobiol. Dis.* 7, 118–129.
- Clark, W.M., 1997. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology.* 49, 10-14.
- Cohen, M.C., Cohen, S., 1996. Cytokine function: a study in biological diversity. *Am. J. Clin. Pathol.* 105, 589-98.

Corada, F., Liao, M., Lindgren, M.G., Lampugnani, F., Breviario, R., Frank, W.A., Muller, D.J., Hicklin, P., Bohlen, E., Dejana., 2001. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood*. 97, 1679–1684.

Correale, J., Villa, A., 2009. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochemical Research*. 34, 1630–1639.

Dammann, O., Leviton, A., 2000. Brain damage in preterm newborns: Biological response modification as a strategy to reduce disabilities. *J. Pediatr*. 136, 433-8.

Daneman, R., 2012. The blood-brain barrier in health and disease. *Annals of neurology*. 72, 648-672.

Dell'anna, ME., Luthman, J., Lindqvist, E., Olson, L., 1993. Development of monoamine systems after neonatal anoxia in rats. *Brain Res*. 32, 159-70.

Dezateux, C., Lum, S., Hoo, A.F., Hawdow, J., Costeloe, K., Stocks, J., 2004. Low birth weight for gestation and airway function in infancy: exploring the fetal origins hypothesis. *Thorax*. 59,60-6.

Dilenge, M.E., Majnemer, A., 2001. Long-term developmental outcome of asphyxiated term neonates. *J. Child Neurol*. 11, 781-92.

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

Dong, Y., Benveniste, E. N., 2001. Immune function of astrocytes. *GLIA*. 36, 180-90.

During, M. J., & Cao, L., 2006. VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. *Curr. Alzheimer Res*. 3, 29-33.

Engelhardt, B., & Sorokin, L., 2009. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in immunopathology*. 31, 497-511.

- Errede, M., Benagiano, V., Giroland, F., Flace, P., Bertossi, M., Roncali, L., Virgintino, D., 2002. Differential expression of connexin 43 in fetal, adult and tumor-associated human brain endothelial cells. *The Histochemical Journal*. 34, 265-71.
- Faherty, C.J., Kerley, D., Smeyne, R.J., 2003. A golgi-cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Brain Research*. 141, 55-61.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., Le Couter, J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669-76.
- Ferriero, D.M., 2004. Neonatal brain injury. *N Engl. J. Med.* 35<sub>1</sub>, 1985–1995.
- Filous, A.R., Silver, J., 2016. "Targeting astrocytes in CNS injury and disease: a translational research approach". *Prog. Neurobiol.* 144, 173-188.
- Francesca, B., Rrezzani, R., 2010. Aquaporin and Blood Brain Barrier. *Current Neuropharmacology*. 8, 92-96.
- Frick, K.M., Fernandez, S.M., 2003. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiology of aging*. 24, 626-645.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T., 2013. Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience*. 17, 7-45.
- Gobbo, O.L. O., Mara, S.M., 2004. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav. Brain Res.* 152, 231-41.
- Golden, W.C., 2001. Failure to sustain recovery of Na,K-ATPase function is a possible mechanism for striatal neurodegeneration in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 88, 94-102.
- Goodenough, D.A., Goliger, J.A., Paul, D.L., 1996. Connexins, connexons and intercelular communication. *Annual Review Biochemical.* 65, 475-502.

- Grow, J., Barks, J.D., 2002. Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. *Clinical Perinatology*. 29, 585-602.
- Plate, K.H., 2009. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* 117,481–496.
- Hansen, N., Okken, A., 1979. Continuous TcPO<sub>2</sub> monitoring in healthy and sick newborn infants during and after feeding. *Birth Defects*. 15, 503-8.
- Hawkins, R.A., 2009. The blood-brain barrier and glutamate. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 867-874.
- Hebb, D.O., 1947. The effects of early experience on problem solving at maturity. *Am. Psychol.* 2, 306–307.
- Hermann, D. M., & Zechariah, A., 2009. Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10, 1620-43.
- Hossain, M.A., 2008. Hypoxic-ischemic injury in neonatal brain: involvement of a novel neuronal molecule in neuronal cell death and potential target for neuroprotection. *Int. J. Dev. Neuroscience.* 26, 93-101.
- Howe, M.L., Barres, B.A., 2012. A novel role for microglia in minimizing excitotoxicity. *BMC BIOLOGY*. 31, 67-82.
- Hsu, Ms., Seldin, M., Lee, D.J., Seifert, G., Steinhäuser, C., Binder, D.K., 2011. Lamina-specific and developmental expression of aquaporin in the mouse hippocampus. *Neuroscience*. 178, 21-32.
- Hülser, D. F., Eckert, R., Irmer, U., Krisciukaitis, A., Mindirmann, A., Pleiss, J., Rehkopt, B., Sharouskaya, J., Traub, O., 2016. Intercellular communication via gap junction channels. *Bioelectrochemistry and Bioenergtis*. 45, 55-65.
- Ickes, B.R., 2000. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp. Neurol.* 164, 45–52.
- Ikeda, Tomoaki. 2008. Stem cells and neonatal brain injury. *Cell and tissue research*. 331, 263-269.

Imai, Y., & Kohsaka, S., 2002. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia*. 40, 164-74.

Ip, E.Y., Giza, C.C., Griesbach, G.S., Hovda, D.A., Imai, Y., Ohsawa, K., Microglia-specific localization of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*. 57, 1-9.

Biernaskie, J., Corbett, D., 2001. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J. Neurosci*. 21, 5272-80.

Jenkins, D.D., Rollins, L.G., Perkel, J.K., 2012. Serum cytokines in a clinical trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 32, 1888–1896.

Kadhim, H., Tabarki, B., Verellen, G., De Prez, C., Roma, A.M., Sébire, G., 2001. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology*. 56, 1278-84.

Kaur, C., Ling, E.A., 2009. Periventricular white matter damage in the hypoxic neonatal brain: role of microglial cells. *Prog. Neurobiol*. 87, 264-80.

Kelmendi, B., Saricicek, A., Sanacora, G., 2006. The role of the glutamatergic system in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Primary Psychiatry*. 13, 80-86.

Kogo, J., Takeba, Y., Kumai, T., 2006. Involvement of TNF- $\alpha$  in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res*. 208, 201-208.

Kolb, B., Forgie, M., Gibb, R., Gorny, G., Rowntree, S., 2012. Age, experience, injury, and the changing brain. *Dev. Psychobiol*. 54, 311-25.

Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev*. 2010;86(6):329-338.

- Labus, J., Häckel, S., Lucka, L., Danker, K., 2014. Interleukin-1 $\beta$  induces an inflammatory response and the breakdown of the endothelial cell layer in an improved human. *J. Neuroscience Methods*. 15, 35-45.
- Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y.C., Kriz, J., 2007. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J. Neurosci*. 27, 2596–2605.
- Lambert, T.J., Fernandez, S.M., Frick, K.M., 2005. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol. Learn. Mem*. 83, 206–216.
- Lawn, J., Shibuya, K., Stein, C., 2005. No cry at birth: global estimates of intrapartum stillbirths and intrapartum-related neonatal deaths. *Bull World Health Organ*. 83, 409–17.
- Lawn, J.E., Lee, A.C., Kinney, M., 2009. Two million intrapartum-related stillbirths and neonatal deaths: where, why, and what can be done?. *Int. J. Gynaecol Obstet*. 107, 18-19.
- Leggio, M.G., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F., Petrosini, L., 2005. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav. Brain Res*. 163,78–90.
- Leino, R.L., Gerhart, D.Z., Van Bueren, A.M., McCall, A.L., and Drewes, L.R., 1997. Ultrastructural localization of Glut 1 and Glut 3 glucose transporters in rat brain. *J. Neuroscience*. 49, 617-626.
- Levine, Seymour., 1960. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *The American Journal of Pathology*. 36, 1-23.
- Leviton, A., Kuban, K., O'Shea, T.M., Paneth, N., Fichorova, R., Allred, E.N., Dammann, O., 2011. The relationship between early concentrations of 25 blood proteins and cerebral white matter injury in preterm newborns: the ELGAN study. *J. Pediatr*. 158, 897– 903.
- Li, L., McBride, D.W., Doycheva, D., Dixon, B.J., Krafft, P.R., Zhang, J.H., Tang, J., 2015. G-CSF attenuates neuroinflammation and stabilizes the blood-brain



barrier via the PI3 K/Akt/GSK-3  $\beta$  signaling pathway following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 272, 135–144.

Liao, Y., Cotten, M., Tan, S., Kurtzberg, J., Cairo, M. S., 2012. Rescuing the neonatal brain from hypoxic injury with autologous cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 48, 890-900.

Lieberman, AP., Pitha, P.M., Shin, H.S., Shin, M.L., 1989. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86, 6348-52.

Liu, T., Clark, R.K., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Barone, FC., Feuerstein, G.Z., 1994. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke* 25, 1481-8.

Corada, M., Mariotti, G., Thurston, K., Smith, R., Kunkel, M., Brockhaus, M.G., Lampugnani, I., Martin-Padura, A., Stoppacciaro, L., Ruco, D.M., McDonald, P.A., Ward, E., Dejana, 1999. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9815–9820.

Marin-Padilla, M., 2000. Neuropathologic correlates of perinatal asphyxia. XXI Annual child neurology postgraduate course, Miami Beach, Florida, USA. 34, 24-26.

McAdams, R.M., Juul, S.E., 2012. The role of cytokines and inflammatory cells in perinatal brain injury. *Neurol. Res Int.* 56, 14-94.

McDonald, J.W., Johnston, M.V., 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Ver.* 15, 41-70.

Mckenna, M.C., 2007. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J. Neurosci Res.* 85, 3347-3358.

McLean, C., Ferriero, D., 2004. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Seminars in Perinatology.* 28, 425-432.

- McPherson, C.A., Aoyama, M., & Harry, G.J., 2011. Interleukin (il)-1 and IL-6 regulation of neural progenitor cell proliferation with hippocampal injury: Differential regulatory pathways in the subgranular zone (SGZ) of the adolescent and mature mouse brain. *Brain Behavioral and Immunity*. 25, 850-862.
- McQuillen, P.S., Ferriero, D.M., 2004. Selective vulnerability in the developing central nervous system. *Pediatr. Neurol.* 30, 227-35.
- Miguel, P.M., et al., 2015. Neonatal hypoxia-ischemia induces attention-deficit hyperactivity disorder-like behavior in rats. *Behav. Neuroscience*. 129, 309-20.
- Mishima, K., Ikeda, T., Aoo, N., Takai, N., Takahashi, S., Egashira, N., Ikenoue, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2004. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neurosci. Lett.* 376, 194–199.
- Mishra, O.P., Delivoria-Papadopoulos, M., 1999. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Research Bulletin*. 48, 233-238.
- Mobasher, A., 2000. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci. Rep.* 20, 51-91.
- Molofsky, A.V., Krenclk, R., Krennick., Ullian, E.M., Ullian, E., Tsai, H., Deneen, B., Richardson, W.D., Barres, B.A., and Rowitch, D.H., 2012. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 26, 891-907.
- Mountz, J.D., Edwards, C.K., Cheng, J., Yang, P., Wang, Z., Liu, C., Autoimmunity due to defective Nur77, Fas, and TNF-RI apoptosis. *Adv.Exp. Med. Biol.* 406, 241–62.
- Murray, C.J., Lopez, A.D., 1997. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 349, 1436-1451.
- Nakajima, W., Ishida, A., Lange, M.S., Gabrielson, K.L., Wilson, M.A., Martin, L.J., 2000. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J. Neurosci.* 20, 7994–8004.

- Nakajima, W., Ishida, A., Takada, G., 1999. Anoxic and hypoxic immature rat model for measurement of monoamine using in vivo microdialysis. *Brain Res. Protoc.* 3, 252-56.
- Nakajima, W., Ishida, A., Takada, G., 1996. Effect of anoxia on striatal monoamine metabolism in immature rat brain compared with that of hypoxia: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 740, 316-22.
- Nakamura, H., Kobayashi, S., Oaci, Y., Ando, S., 1999. Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *J. Neurosci. Res.* 56, 307–315.
- Nithianantharajah, J., Hannan, A.J., 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Rev. Neuroscience.* 7, 697- 709.
- Nusrat, C.A., Parkos, P., Verkade, C.S., Foley, T.W., Liang, W., Innis-Whitehouse, K. K., Eastburn, J.L., 2000. Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.* 113, 1771–1781.
- Nyakas, C., Buwalda, B., Luiten, P.G.M., Hypoxia and Brain Development. *Prog Neurobiol.* 49, 1-51.
- Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M., 2013. Development maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine.* 19, 1584- 1596.
- Ozawa, M., Baribault, H., Kemler, R., 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8, 1711–1717.
- Pantoni, L., Sarti, C., Inzitari, D., 1998. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler. Thromb. Vasc.Biol.* 18, 503–513.
- Pardridge, W.M., 1999. Blood-brain barrier biology and methodology. *Journal of Neuro Virology.* 5, 556-569.

- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., & Magistretti, P.J., 2007. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*. 55, 1251-1262.
- Perea, G., & Araque, A., 2005. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*. 38, 375-382.
- Pereira, L.O., et al. 2009. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia-ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. *Brain Res*. 1247, 188-95.
- Pereira, L.O., Strapasson, A.C.P., Nabinger, P.M., Achaval, M., Netto, C.A. 2008. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res*. 1218, 257– 266.
- Pereira, L. Orlandi et al. 2007. 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.
- Perlman, J.M., 2006. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther*. 28, 1353-65.
- Peyrieras, N., Louvard, D., Jacob, F., 1985. Characterization of antigens recognized by monoclonal and polyclonal antibodies directed against ovomorulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82, 8067–8071.
- Pham, T.M., Söderström, S., Winblad, B., Mohammed, A.H., 1999. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. *Behav. Brain Res*. 103, 63-70.
- Pickering, M., Cumiskey, D., O'Connor, J.J., 2005. Actions of TNF- $\alpha$  on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp. Physiol*. 90, 663–670.
- Pickering M, O'Connor, J.J., 2007. Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus. *Prog. Brain Res*. 163, 339–354.

Polacek, D., Lal, R., Volin, M.V., Davies, P.F., 1993. Gap junctional communication between vascular cells-induction of connexin 43 messenger-RNA in macrophage foam cells of atherosclerotic lesion. *American Journal of Pathology*. 142, 593-606.

Prybylowski, K., Wenthold, R.J., 2004. N-Methyl-D-aspartate receptors subunit assembly and trafficking to the synapse. *J. Biol. Chem.* 279, 9673-9676.

Puurunen, K., Koistinaho, J., Sirviö, J., Jolkkonen, J., Sivenius, J., 2001. Enriched environment housing increases neuronal Fos-staining in the dentate gyrus after a water maze spatial learning task. *Neuropharmacology*. 40, 440–447.

Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., Tsien, J.Z., 2001. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR 1-knockout mice. *Nature Neuroscience*. 3, 238-244.

Redzic, Z., 2011. Molecular biology of the blood-brain barrier and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids and Barriers of the CNS*. 8,2-23.

Revuelta, M., et al. 2016. Characterization of gene expression in the rat brainstem after neonatal hypoxic-ischemic injury and antioxidant treatment. *Mol. Neurobiol.* 25, 73-92.

Rice, John E., Vannucci, Robert, C., Brierley, James, B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic- ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology*. 9, 131-141.

Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 386, 671–674.

Rodrigues, A.L., Arteni, N.S., Abel, C., Zylbersztejn, D., Chazan, R., Viola, G., Xavier, L., Achaval, M., Netto, C.A., 2004. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 1002, 94-99.

Rojas, J. J., et al. 2013. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia–ischemia in the rat. *Experimental Neurology*. 241, 25-33.

Rojas, J. J., et al. 2015. Environmental stimulation improves performance in the ox-maze task and recovers Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus of hypoxic-ischemic rats. *Neuroscience*. 291, 118-27.

Rosenberg, G.A., 2009. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*. 8, 205-16.

Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., 1996. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain Res*. 78, 57–65.

Rothwell, N.J., 1999. Annual review prize lecture cytokines – killers in the brain? *J. Physiol*. 514, 3–17.

Row, B.W., Liu, R., Xu, W., Kheirandish, L., Gozal, D., 2003. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 167, 1548-53.

Rozental, R., Campos de Carvalho, A.C., Spray, D.C., 2000. Gap junction in the cardiovascular and immune systems. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33, 365-368.

Rumajogee, P., et al., 2016. Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: a systematic review. *Front. Neurol*. 7, 57-72.

Ryan, S., Taylor, C.T., McNicholas, W.T., 2006. Predictors of elevated nuclear factor- $\kappa$ B-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am. J., Respir. Crit. Care Med*. 174, 824–830.

Sadowska, G.B., Chen, X., Zhang, J., Lim, Y.P., Cummings, E.E., Makeyev, O., Besio, W.G., Gaitanis, J., Padbury, J.F., Banks, W.A., Stonestreet, B.S., 2015. Interleukin-1 $\beta$  transfer across the blood-brain barrier in the ovine fetus. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 35, 1388–1395.

Saffitz, J.E., Yamada, K.A., 2000. Closing the gap in understanding the regulation of intercellular communication. *Cardiovascular Research*. 45, 807-809.

Sanders, R.D., et al. 2005. Isoflurane exerts antinociceptive and hypnotic properties at all ages in Fischer rats. *British journal of anaesthesia*. 95, 393-399.

Sandoval, K., Witt, K., 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of Disease*. 32, 200-219.

Savransky, V., Bevans, S., Nanayakkara, A., Li, J., Smith, PL., Torbenson, M.S., Polotsky, V.Y., 2007. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol*. 293, 871-7.

Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev*. 2004;80:125–41

Schuch, C. P., et al. 2016. Early environmental enrichment affects neurobehavioral development and prevents brain damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Neurosci. Lett*. 617, 101-7.

Shah, K., Desilva, S., & Abbruscato, T., 2012. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's. *Disease international journal of molecular sciences*. 13, 12629-12655.

Shin, Y. J., Park, J. M., Cho, J. M., Cha, J. H., Kim, S. Y., & Lee, M. Y., 2013. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression in perivascular cells of the ischemic core following focal cerebral ischemia in rats. *Acta Histochemica*. 115, 170–177.

Smitha, J.A., Dasa, A., Rayb, S.K., Banik, N.L. 2012. Role of proinflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Research Bulletin*. 87, 10-20.

Souza, F., 2003. Fatores de risco associados a asfixia perinatal no Brasil. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz.

- Steinberg, T.H., 1998. Gap junction function. *American Journal of Pathology*. 152, 851-854.
- Stoll, G., Jander, S., Schroeter, M., 2000. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. *J. Neural Trans.* 59, 81-9.
- Sullivan, S. M., 2014. GFAP variants in health and disease: stars of the brain ... and gut. *J. Neurochem.* 130, 729-32.
- Takahashi, H., Shibuya, M., 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* 109, 227–241.
- Tam, C.S., Wong, M., Tam, K., Aouad, L., Waters, K.A., 2007. The effect of acute intermittent hypercapnic hypoxia treatment on IL-6, TNF-alpha, and CRP levels in piglets. *Sleep.* 30, 723-7.
- Tarkowski, E., Rosengren, L., Blomstrand, C., Wikkelso, C., Jensen, C., Ekholm, S., Tarkowski, A., 1995. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke.* 26, 1393-8.
- Tchelingerian, J.L., Le Saux, F., Jacque, C., 1996. Identification and topography of neuronal cell populations expressing TNF alpha and IL-1 alpha in response to hippocampal lesion. *J. Neurosci. Res.* 43, 99–106.
- Tencé, M., et al 2012. Increased interaction of connexin 43 with zonula occludens-1 during inhibition of *gap junctions* by G protein-coupled receptor agonists. *Cellular Signalling.* 24, 86-98.
- Thornton, P., Pinteaux, E., Gibson, R.M., Allan, S.M., Rothwell, N.J., 2006. Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *J. Neurochem.* 98, 258–266.
- Titomanlio, L., et al., 2015. Pathophysiology and neuroprotection of global and focal perinatal brain injury: lessons from animal models. *Pediatr Neurol.* 52, 566- 84.



Urakawa, S., et al., Environmental enrichment brings a beneficial effect on beam walking and enhances the migration of double cortin-positive cells following striatal lesions in rats. *Neuroscience*. 144, 920-933.

Van Praag, H., Kemperman, G., Gage, F.H. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev.* 1, 191–198.

Vannucci, R.C., 2000. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol.* 17, 113-20.

Vexler, Z.S., Ferriero, D.M., 2001. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin. Neonatol.* 6, 99-108.

Volpe, J.J., 2008. *Neurobiology of the newborn*. 5<sup>th</sup>.

Volpe JJ. 1992. Perinatal hypoxic-ischemic brain injury: overview. In: Fukuyama Y, Suzuki Y, Kamoshita S, Casaer P. editors. *Fetal and perinatal neurology*. Tokyo: Joint Convention of the 5th International Child Neurology and the 3<sup>rd</sup> Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 232-52.

Hypoxic Preconditioning Suppresses Glial Activation and Neuroinflammation in Neonatal Brain Insults.

Wang, X., Feuerstein, G.Z., 2000. Role of immune and inflammatory mediators in CNS injury. *Drug news perspect.* 13, 133–140.

Webster, J.L., Tonelli, L., Sternberg, E.M., 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual Review of Immunology.* 20, 125-163.

Weis, S.N., et al., 2011. Early biochemical effects after unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Int. J. Dev. Neuroscience.* 29, 115-20.

Will, B., Galani, R., Kelche, C., Rosenzweig, M.R., 2004. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Prog. Neurobiol.* 72, 167-182.

Won, S.M., Lee, J.H., Park, U.J., Gwag, J., Gwag, B.J., Lee, Y.B., 2011. Iron mediates endothelial cell damage and blood-brain barrier opening in the

hippocampus after transient forebrain ischemia in rats. *Exp. Mol. Med.* 43, 121–128.

Wood, P.L., 1995. Microglia as a unique cellular target in the treatment of stroke: potential neurotoxic mediators produced by activated microglia. *Neurological Research.* 17, 242-248.

Xin Zhang., Xiu-Ping, Chen., Jun-Bin, Lina., Yu Xiong., Wei-Jing, Liao., 2017. Effect of enriched environment on angiogenesis and neurological functions in rats with focal cerebral ischemia. *Brain Research.* 1655, 176–185.

Yamasaki, H., Krutovskikh, V., Mesnil, M., Tanaka, T., Zaidan-Dagli, M.L., Otori, V., 1999. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *Life sciences.* 323, 151-9.

Yi Liang, L., Xiao, H., Xu, M., Ye, X., Hu, J., Li, F., Li, M., Luo, C., Yu, S., Bian, X., Feng, H., 2011. Glioma-initiating cells: a predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma. *Journal of Neuroimmunology.* 232, 75-82.

Yoon, B.H., Romero, R., Park, J.S., Kim, J.C., Kim, H.S., Choi, J.H., Han, T.R., 2000. Fetal exposure to intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182, 675-81.

Yu, K., et al., 2013. Neuroprotective effects of prior exposure to enriched environment on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: the possible molecular mechanism. *Brain Res.* 1538, 93–103.

Zhai, H., Heppner, F.L., Tsirka, S.E., 2011. Microglia/macrophages promote glioma progression. *GLIA.* 59, 472-85.

Zhan, G., Serrano, F., Fenik, P., Hsu, R., Kong, L., Pratico, D., Klann, E., Veasey, S.C., 2005. NADPH oxidase mediates hypersomnolence and brain oxidative injury in a murine model of sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 921-9.

Zhang, H., Gao, X., Yan, Z., et al., 2008. Inhibiting caspase-3 activity blocks beta-catenin degradation after focal ischemia in rat. *Neuro Report.* 19, 821–824.

Zhang, H., Ren, C., Gao, X., et al., 2008. Hypothermia blocks betacatenin degradation after focal ischemia in rats. *Brain Res.* 1198, 182–187

Zhang, Z.G., et al., 2002. Bone marrow– derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ. Res.* 90, 284–288.

Ziv, Y., & Schwartz, M., 2008. “Immune-based regulation of adult neurogenesis: implications for learning and memory.” *Brain Behavior and Immunity.* 22, 167-176.

## Anexo



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 24090

**Título:** Ambiente enriquecido como estratégia neuroprotetora em ratos submetidos à hipóxia-isquemia e privação materna

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

LENIR ORLANDI PEREIRA SILVA - coordenador desde 01/03/2013  
Jaqueline Vieira Carletti - pesquisador desde 01/03/2013  
Clarissa Cristini Pedrini Schuch - pesquisador desde 01/03/2013  
Bruna Ferrary Deniz - pesquisador desde 01/03/2013  
Joseane Jiménez Rojas - pesquisador desde 01/03/2013  
Ramiro Diaz - pesquisador desde 01/03/2013  
IOHANNA DECKMANN - pesquisador desde 01/03/2013

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 22/07/2013 - Sala do 2º andar, prédio da Reitoria, Campus Centro, Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 112 ratos Wistar (machos e fêmeas) e 14 ratas prenhas, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Quarta-Feira, 7 de Agosto de 2013

STELA MARIS KUZE RATES  
Coordenador da comissão de ética