



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

BIOQUÍMICA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO COUMESTROL EM
MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* NA ISQUEMIA CEREBRAL
EXPERIMENTAL**

CIBELE CANAL CASTRO

Porto Alegre, 2013.

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

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO COUMESTROL EM
MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* NA ISQUEMIA CEREBRAL
EXPERIMENTAL**

CIBELE CANAL CASTRO

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2013.

Dedicatória

Dedico este estudo a todas as pessoas que estão sofrendo as decorrências degenerativas promovidas por um acidente vascular encefálico. Que este trabalho possa contribuir de maneira significativa para a qualidade de vida humana, e que seja utilizado como ferramenta para futuros estudos envolvidos na terapêutica da isquemia cerebral.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Prof. Carlos Alexandre Netto pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório de pesquisa. Obrigada pela compreensão e amizade e, principalmente, pelo constante apoio ao longo desses quatro anos de trabalho.

Aos meus pais, Ana Maria Canal Castro e Luiz Afonso Castro, que me proporcionaram a vida. Muito obrigada pelo amor e zelo, pelo carinho e apoio.

À amiga Aline Pagnussat, por todos os momentos de suporte intelectual, emocional e pelas inúmeras risadas regadas a espumantes gelados e maravilhosos. Muito obrigada, Pipoquinha!

À amiga e colega Lenir Orlandi Pereira, pelo coleguismo, incentivo e apoio constantes!

À Professora Dra. Anne Etgen, pela orientação e colaboração nos trabalhos ao longo desses quatro anos de estudo.

À Professora Angela Wyse pela oportunidade de colaboração e ‘bons fluidos científicos’ compartilhados.

À amiga-irmã de coração Angélica Veríssimo. Tua capacidade de acolhimento, empatia e grande coração são bênçãos em minha vida. Meu profundo e eterno muito obrigada!

À querida Norma Bruno, pela parceria e suporte incondicional em todos os momentos. Que o universo retribua em dobro a tua generosidade! Muito obrigada!

Ao querido Marcelo Coimbra, pela amizade, carinho, cuidado, apoio e incentivo constantes. Obrigada pelo ombro amigo em todos os momentos!

Ao querido e fofo Lucas Elias Rosito, pelo constante suporte e oportunidade de crescimento proporcionada ao longo deste período, me incentivando e acreditando na minha capacidade sem limites.

À Nathália Moura, pelos momentos de descontração, de suporte técnico-científico, pela amizade, responsabilidade e cooperação.

À Juliana Ellwanger e à Caroline Bassoto, pelo comprometimento e suporte na minha pesquisa.

Aos colegas do Lab 35, pelo coleguismo e contribuições científicas.

A todos integrantes do Laboratório de Engenharia Genética da Universidade Johns Hopkins, em especial ao George Umanah, pelos ensinamentos valiosos e parceria profissional.

À Prof. Dra. Valina Dawson, pela oportunidade de aprendizado e pesquisa em seu laboratório e por ter me proporcionado um excelente ambiente de trabalho.

Aos colaboradores do PPG Bioquímica, à UFRGS, à CAPES, ao CNPq pelo suporte e financiamento enquanto estudante de doutorado.

“Até que o sol não brilhe, acendamos uma vela na escuridão.”

Confúcio

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMO.....	X
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO	1
1.1 Isquemia Cerebral.....	2
1.2 Fisiopatologia da Isquemia Cerebral.....	4
1.2.1 Excitotoxicidade Glutamatérgica.....	4
1.2.2 A Cascata Isquêmica.....	6
1.2.3 Mecanismos de Morte Neuronal em Isquemia Global.....	9
1.3 Modelos Experimentais em Isquemia Cerebral	11
1.4 O Hipocampo.....	13
1.4.1 Vulnerabilidade Seletiva e Morte Neuronal Tardia.....	15
1.5 Receptores AMPA e a Excitotoxicidade.....	17
1.6 Pre-Condicionamento e Sobrevivência Neuronal.....	22
1.6.1 A Proteína Thorase	23
1.7 Neuroproteção Farmacológica.....	24
1.7.1 Coumestrol.....	26
OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
CAPÍTULO 1.....	31
COUMESTROL HAS NEUROPROTECTIVE EFFECTS BEFORE AND AFTER GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA IN FEMALE RATS.....	31
CAPÍTULO 2.....	41
COUMESTROL TREATMENT RESCUE Na^+/K^+ -ATPASE ACTIVITY INHIBITION AFTER CEREBRAL GLOBAL ISCHEMIA AND AFFORDS HISTOLOGICAL NEUROPROTECTION IN MALE RATS.....	41
CAPÍTULO 3.....	69
COUMESTROL PROTECTS AGAINST IN VIVO AND IN VITRO NMDA-INDUCED EXCITOTOXICITY THROUGH GLUR2 ACTIVATION AND PREVENTS MEMORY IMPAIRMENT IN MICE.....	69
DISCUSSÃO.....	108
CONCLUSÃO.....	129
PERSPECTIVAS.....	131
REFERÊNCIAS.....	133

APRESENTAÇÃO

Esta tese é constituída por:

1. Introdução, onde está o embasamento teórico necessário para a compreensão da proposta de trabalho e objetivos.
2. Objetivos, onde se encontram todas as metas a serem desenvolvidas ao longo dos capítulos.
3. Capítulo 1, onde se encontra o primeiro artigo publicado pertencente a este estudo.
4. Capítulo 2, referente ao segundo artigo submetido à revista *Neurochemistry International*.
5. Capítulo 3, estudo pertinente ao artigo a ser submetido na revista *Hippocampus*, e que foi desenvolvido no Laboratório da Prof.a Dra. Valina Dawson, na Universidade Johns Hopkins em Baltimore, EUA, relativo ao doutorado-sanduíche realizado no último ano de doutorado.
6. Discussão, que contém uma interpretação dos resultados obtidos relativos aos três capítulos acima, englobando-os em um contexto geral.
7. Conclusões, onde se encontra o fechamento geral da tese.
8. Perspectivas, que aborda as possibilidades futuras de pesquisas relativas à continuação deste trabalho.
9. Referências, onde se encontram listadas todas as referências bibliográficas utilizadas na Introdução e Discussão deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Visão geral da fisiopatologia da isquemia cerebral.....	10
Figura 2. Esquema da estrutura e conexões do hipocampo.....	15
Figura 3. Desenho esquemático da estrutura dos receptores AMPA.....	18
Figura 4. GluR2 quanto à permeabilidade a cálcio.....	22

Capítulo 1

Figura 1. Fotomicrografias da região CA1 hipocampal.....	33
Figura 2. Neuroproteção conferida por coumestrol em CA1.....	34
Figura 3. Efeito da administração do antagonista estrogênico.....	35
Figura 4. Fotomicrografias de CA1 na administração periférica.....	35
Figura 5. Neuroproteção na administração periférica.....	35

Capítulo 2

Figura 1. Neuroproteção e atividade da bomba Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	67
Figura 2. Neuroproteção e ratos machos.....	67
Figura 3. Fotomicrografias da região CA1 na pré-administração em machos.....	68

Capítulo 3

Figura 1. Quantificação proteica de GluR2 hipocampal pós isquemia.....	104
Figura 2. Quantificação proteica da Thorase hipocampal pós isquemia.....	105
Figura 3. Fotomicrografias do ensaio excitotóxico <i>in vitro</i> com NMDA.....	106
Figura 4. Gráfico do desempenho na tarefa de memória de referência.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP: Proteína ligante de receptores AMPA

ADAR2: Adenosina Deaminase 2

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPARs: Receptores AMPA

AP2: Complexo adaptador de clatrina

Arc/Arg3.1: Proteína associada ao citoesqueleto de atividade regulamentada

ATP: Adenosina 5' Trifosfato

AVE: Acidente Vascular Encefálico

AVH: Acidente Vascular Hemorrágico

AVI: Acidente Vascular Isquêmico

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado de Encéfalo

CA1: Corno de Ammon

CAG: Códon Genômico da Glutamina

CaMKII: Proteína Quinase dependente de Calmodulina

CIG: Códon Genômico da Arginina

CPG2: Proteína sináptica *candidate plasticity gene 2*

E2: 17- β -estradiol

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

ER α : Receptor de Estrogênio α

ER β : Receptor de Estrogênio β

ERs: Receptores de Estrogênio

GABA: Ácido Gama Aminobutírico

GRIP1: Proteína de interação com o receptor de glutamato

Homer: Proteína pós-sináptica homóloga 1

ICG: Isquemia Cerebral Global

LAM: Labirinto Aquático de Morris

LTP: Potenciação de Longa Duração

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MCP: Morte Celular Programada

mRNA: RNA mensageiro

NMDA: N-Methyl-D-Aspartato

NPG6: Gene Neuroprotetor 6

PARP-1: Poli (ADP-ribose) Polimerase 1

PDZ: PSD95, DlgA e zo-1

PICK1: Proteína de interação com a proteína quinase 1

PKC: Proteína quinase C

Q: Resíduo de arginina

R: Resíduo de glutamina

Rab5: GTPase Rabaptina

RIG: Receptores Ionotrópicos Glutamatérgicos

SNC: Sistema Nervoso Central

4VO: Oclusão de 4 Vasos

RESUMO

Pacientes que sobrevivem a uma parada cardíaca ou a um AVE demonstram uma alta incidência de prejuízos neurológicos como resultado do dano neuronal isquêmico tardio. Uma intervenção farmacológica apropriada durante a janela terapêutica entre o recomeço do fluxo sanguíneo normal e o início do dano neuronal seria de grande benefício, porém as abordagens experimentais atuais são limitadas neste sentido. Ao longo da última década, dados provenientes de muitos estudos apoiam a ideia que estrógenos promovem efeitos neuroprotetores em uma variedade de doenças neurodegenerativas, incluindo a isquemia cerebral global. O potente hormônio feminino 17- β -estradiol (E2) é neuroprotetor em uma variedade de modelos celulares e animais de isquemia, contudo os parafeitos inerentes a sua terapêutica não permitem seu uso em larga escala. Considerando a estrutura e mecanismo de ação similares dos fitoestrogênios no SNC, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos neuroprotetores de coumestrol, um potente isoflavonóide com alta afinidade de ligação por ambos os receptores de estrogênio (ERs) e alto potencial antioxidante, contra a neurodegeneração geralmente encontrada em eventos isquêmicos. Nós demonstramos aqui que coumestrol foi hábil em resgatar a morte neuronal na subárea CA1 hipocampal induzida pela isquemia global em ratas fêmeas em uma avaliação de sobrevivência celular, incluindo 24h pós-isquemia, e que esta neuroproteção parece ser mediada através dos ERs. Em um próximo passo, avaliamos se a pré-administração de coumestrol poderia reverter a atividade da bomba de Na^+/K^+ -ATPase, cuja atividade se encontra prejudicada após insultos isquêmicos, e se sua ação seria igualmente efetiva quando administrado em ratos machos. A análise demonstrou que coumestrol foi eficiente em restaurar a atividade da Na^+/K^+ -ATPase em todos os tempos avaliados, incluindo 24h pós-isquemia. A efetividade em prevenir a morte neuronal em ratos machos foi igualmente observada em todos os tempos de administração, incluindo 24h pós-isquemia. As correspondências neuroprotetoras no tempo de 24h na neuroproteção sugerem um possível mecanismo pelo qual coumestrol possa estar agindo para promover neuroproteção em longo prazo. Sabendo que a morte neuronal tardia na isquemia global está associada com a redução na expressão de GluR2 na região CA1 pouco antes do início da morte celular, examinamos o possível papel de coumestrol na expressão de GluR2 em camundongos machos em três diferentes tempos pós-isquemia. O evento isquêmico reduziu os níveis proteicos de GluR2 hipocampais em todos os tempos avaliados e o tratamento com coumestrol foi efetivo em prevenir essa redução. Adicionalmente, estando consciente que a excitotoxicidade é um dos mecanismos celulares ligados à neurodegeneração associada à isquemia, buscou-se determinar se coumestrol poderia promover neuroproteção *in vitro*, contra a excitotoxicidade induzida por NMDA em culturas neuronais hipocampais. Nós observamos que coumestrol promoveu neuroproteção, porém somente quando sua administração foi perto do evento excitotóxico. Atribuímos esta inabilidade em conferir neuroproteção em longo prazo devido à presença do inibidor de células gliais presente na cultura neuronal, que limita a proliferação glial em 10% ou menos, sugerindo o sistema glial como um importante coadjuvante no contexto da neuroproteção em longo prazo conferida por coumestrol. Estendendo nossa investigação para uma avaliação comportamental, examinamos se coumestrol poderia ser igualmente eficaz em prevenir os déficits de memória presentes após um insulto isquêmico. A análise histológica confirmou a neuroproteção promovida pela administração de coumestrol como esperado, e sua terapêutica foi bem sucedida em reverter os déficits de memória promovidos pela isquemia global. Portanto, esses resultados coletivos indicam que coumestrol desperta novas perspectivas dentro da terapêutica da isquemia global e abre novas possibilidades na investigação no contexto dos acidentes vasculares encefálicos.

ABSTRACT

Patients who survive cardiac arrest or stroke demonstrate a high incidence of neurological impairment as a result of delayed ischemic neuronal damage. Proper pharmacological intervention during the therapeutic window between the resumption of normal blood flow and the onset of neuronal damage would be of great benefit, but the current experimental approaches have yielded only limited success. Over the last decade, data from many studies support the idea that estrogens provide neuroprotective effects in a variety of neurodegenerative diseases, including cerebral global ischemia. The potent feminizing hormone 17- β -estradiol (E2) is neuroprotective in a host of cell and animal models of stroke, however the side effects inherent its therapeutics doesn't allow its use in a large scale. Considering the similar structure of phytoestrogens and its similar actions within the CNS, the aim of this study was verify the neuroprotective effects of coumestrol, a potent isoflavonoid with high binding affinities for both estrogen receptors (ERs) and significant antioxidant activity, against neurodegeneration usually observed in global ischemic events. We demonstrate here that coumestrol was able to rescue neuronal death in the hippocampal CA1 subfield induced by global ischemia in female rats in a cell survival evaluation, including 24h after ischemia, and its neuroprotective actions seems to be through the ERs. In a next step, we evaluated if coumestrol pre-administration could rescue the Na⁺/K⁺-ATPase activity that is found severely impaired after ischemic insults, and if its administration would be equally neuroprotective in male rats. The analysis showed that coumestrol was able to reverse the Na⁺/K⁺-ATPase activity in all times of evaluation, including 24h after ischemia. The effectiveness in preventing neuronal death in male rats was also observed in all time-points evaluated, including 24h after ischemia. These two 24h correspondence in neuroprotection suggests one possible mechanism by which coumestrol could be acting to afford neuroprotection in a long term. Knowing that the delayed neuronal death in global ischemia is associated with a reduced GluR2 expression in CA1 hippocampal field just before the cell death onset, we examined the possible role of coumestrol at the level of GluR2 expression of male mice in three different time-points after ischemia. The ischemic event induced high suppression of GluR2 in all evaluated times and coumestrol pre-treatment was able in preventing this reduction. In addition, being aware that excitotoxicity is one of the cellular mechanisms linked to cerebral ischemic neurodegeneration, we sought to determine if coumestrol could be neuroprotective *in vitro* as well, against a NMDA-induced excitotoxicity in hippocampal neuronal culture. We observed that coumestrol was skilled to afford neuroprotection only when its administration was next to the excitotoxic event. We attribute this longest reach inability of neuroprotection due the glial inhibitor present in the neuronal culture, which limits the glial cells proliferation in 10% or less, suggesting the glial system as an important adjuvant in the context of the coumestrol longer therapeutic window. Extending our investigation in a behavior assessment, we examined if the coumestrol could be also virtuous in preventing the memory deficits present after an ischemic insult. The histological analysis confirmed the reduction in neuronal loss afforded by coumestrol administration as expected, and its pre ischemic administration was able to rescue the memory impairment promoted by the global ischemia. Therefore, our collective results indicate that coumestrol spread new perspectives in the context of global ischemia therapeutics and unlock new possibilities for the stroke investigation.

INTRODUÇÃO

1.1 Isquemia Cerebral

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, mais de 15 milhões de pessoas por ano sofrem acidentes isquêmicos cerebrais no mundo inteiro. A preponderância de pessoas afetadas inclui a idade maior que 65 anos, porém todas as idades estão incluídas neste contexto, incluindo crianças e adultos (ALLEN & BAYRAKTUTAN, 2009). A isquemia cerebral é considerada a causa principal de mortalidade após doenças do coração, igualando 9% do total de mortes a cada ano, sendo considerada a causa mais comum de incapacidades físicas e mentais a longo prazo, com mais de 40% dos pacientes não atingindo independência (CAPLAN, 2001; WEIR & DENNIS; 1997). Acidentes isquêmicos são considerados com sendo 80-85% dos casos, com aproximadamente 30% dessa forma passando por transformações hemorrágicas (LYDEN & ZIVIN, 1993).

Com o foco na alta mortalidade devido às doenças neurodegenerativas, pesquisadores do mundo inteiro estão tentando desvendar os mecanismos envolvidos na morte celular e na neuroproteção. Esforços têm sido feitos com o objetivo de prevenir a neurodegeneração em desordens de cunho neurológico, como a isquemia, basicamente através de dois caminhos: o primeiro deles envolve a identificação das causas moleculares fundamentais dessas desordens; alternativamente, a elucidação dos mecanismos de morte e sobrevivência celular levando a agentes que possam prevenir a neurodegeneração (DAWSON & DAWSON, 2004).

O cérebro é um órgão que utiliza glicose e oxigênio como nutrientes, sendo totalmente dependente do metabolismo aeróbico. Por demandar uma alta taxa metabólica, o cérebro é mais suscetível a danos isquêmicos em comparação com outros

órgãos. Alterações no fluxo sanguíneo do sistema nervoso levam a uma sequência de eventos que vão desde o comprometimento de seu metabolismo até modificações do meio intracelular, levando a uma subsequente deterioração das funções neurológicas. Os pacientes que sobrevivem a uma isquemia cerebral, frequentemente sofrem de incapacidades físicas e/ou mentais permanentes. As principais causas naturais da isquemia em humanos são a trombose, a embolia e o decréscimo sistêmico da perfusão sanguínea seguida por falência cardíaca (ZEMKE et al., 2004).

Em humanos, alterações do fluxo sanguíneo cerebral são definidas pelo termo clínico Acidente Vascular Encefálico (AVE). Estas alterações podem se desenvolver a partir de uma isquemia, o que caracteriza um Acidente Vascular Isquêmico (AVI), ou a partir de uma ruptura de um vaso encefálico, com extravazamento de sangue no tecido circundante, o que caracteriza um Acidente Vascular Hemorrágico (AVH). Dentro deste contexto, a isquemia cerebral global se dá quando o suprimento sanguíneo é interrompido em todo o encéfalo, enquanto que na isquemia cerebral focal, o suprimento sanguíneo é interrompido em uma determinada região do cérebro, pela presença de trombos ou embolia (GINSBERG, 1997; DUGAN & CHOI, 1994). Ainda, a isquemia cerebral pode ser classificada como perene, na qual não há possibilidade de reperfusão por dano vascular irreversível, ou transitória, na qual a reperfusão sanguínea resulta em injúria celular reversível, que, dependendo da duração ou gravidade da isquemia, pode provocar morte celular (FAROOQUI & HORROCKS, 1994; SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991).

A incidência de acidentes vasculares encefálicos é dependente de sexo e idade, com maior prevalência no sexo masculino, independente de faixa etária. Homens e mulheres não diferem em relação aos fatores de risco primários para a isquemia cerebral, como pressão alta e o avanço da idade. Entretanto, uma série de estudos tem

demonstrado uma diferença quanto à incidência da isquemia, uma vez que mulheres no período pré-menopausa exibem uma menor susceptibilidade a danos isquêmicos em comparação com mulheres pós-menopáusicas e homens com idades equivalentes (ALKAYED et al., 2000; GARCIA-SEGURA et al., 2001). Uma possível explicação para esta maior neuroproteção em mulheres pré-menopausa pode estar relacionada com níveis circulantes mais altos de estrógenos, principalmente o 17- β -estradiol (LIAO et al., 2001; DHANDAPANI & BRANN, 2002).

Não existe, até o momento, um protocolo terapêutico clinicamente eficaz para reduzir o dano celular causado pela isquemia cerebral. Desde os anos 80, testes clínicos com drogas indiscutivelmente eficazes em estudos experimentais (como antagonistas de receptores de glutamato ou cálcio, e scavengers de radicais livres) têm mostrado pouca eficácia clínica (WHITE, et al., 2000). Contudo, avanços significativos têm sido realizados nos últimos anos no sentido de esclarecer os mecanismos moleculares e genéticos envolvidos na fisiopatologia isquêmica, bem como o desenvolvimento de modelos *in vivo* e *in vitro*, fundamentais para a identificação dos mecanismos patogênicos. Uma das principais estratégias terapêuticas investigadas é a neuroproteção farmacológica, visando reduzir a vulnerabilidade do tecido cerebral à isquemia. Tendo em vista que o Sistema Nervoso Central (SNC) é mais vulnerável a insultos isquêmicos que a maioria dos outros tecidos, é fundamental que se identifique e bloqueie os mecanismos celulares implicados nesta vulnerabilidade (PRICE et al., 1999).

1.2 Fisiopatologia da Isquemia Cerebral

1.2.1 Excitotoxicidade Glutamatérgica

O conceito de excitotoxicidade, introduzido por J.W. Olney em 1969 (OLNEY, 1969) foi baseado em uma série de observações que incluíam injúria neuronal com

aplicação local de glutamato e outros aminoácidos ácidos (aspartato, N-methyl-D-aspartato [NMDA], homocisteína e cisteína). Glutamato, o mais abundante aminoácido excitatório do SNC, serve a uma variedade de funções importantes (metabólicas, neurotróficas e neurotransmissoras) e é armazenado em neurônios (FONNUM, 1984; CHOI, 1988). O cérebro adulto saudável tem a habilidade de retirar o glutamato extracelular por rápida recaptação. Contudo, sob condições de déficit energético, como na isquemia, o efluxo de glutamato nos compartimentos extracelulares devido à despolarização celular (BENVENISTE et al., 1984), juntamente com sua recaptação prejudicada, resulta em um aumento nos níveis intracelulares de cálcio (HARUKUNI & BHARDWAJ, 2006). A excessiva liberação de cálcio e seu influxo intracelular é considerada o primeiro gatilho para o desencadeamento de uma variedade de processos intracelulares deletérios e complexos, que resultam na ativação de enzimas catabólicas como as fosfolipases (que levam à quebra da membrana celular, produção de ácido araquidônico e formação de radicais livres) e endonucleases (que levam a fragmentação do DNA e falha energética devido à disfunção mitocondrial).

O glutamato ativa três famílias de receptores ionotrópicos: NMDA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid [AMPA] e cainato, e receptores metabotrópicos que ativam sistemas de segundos mensageiros (SOMMER & SEEBURG, 1992). Embora a liberação de glutamato estimule simultaneamente receptores NMDA e AMPA, estudos *in vitro* demonstram que a toxicidade por glutamato ocorre em duas fases distintas: (1) a excitotoxicidade é rapidamente desencadeada pela breve e intensa estimulação de receptores NMDA, que são dependentes da presença e influxo de cálcio extracelular e (2) através de um processo lento desencadeado pela estimulação prolongada de receptores AMPA, que possuem canais de cálcio limitados (CHOI, 1992). Deste modo, a cascata de eventos responsáveis

pela excitotoxicidade glutamatérgica inclui 3 processos distintos: (1) indução, por onde o efluxo de glutamato extracelular é captado por receptores na membrana neuronal, causando uma sobrecarga intracelular de cálcio, o que leva a desarranjos intracelulares letais; (2) amplificação desses desarranjos, com o aumento na intensidade e envolvimento de outros neurônios e (3) expressão de morte celular desencadeada pela cascata citotóxica (CHOI, 1992). Populações neuronais distintas são seletivamente vulneráveis à injúria excitotóxica, possivelmente a partir de diferenças em sinapses excitatórias de entrada, densidade de receptores glutamatérgicos, ou por mecanismos de defesa intrínsecos (KIRINO et al., 1984).

1.2.2 A Cascata Isquêmica

Dentro de segundos a minutos após a perda de fluxo sanguíneo cerebral, a cascata isquêmica é rapidamente iniciada, o que implica uma série de eventos bioquímicos que eventualmente levam a desintegração da membrana celular e morte neuronal. A isquemia começa com uma severa hipoperfusão sanguínea, que leva a excitotoxicidade e dano oxidativo, o que causam injúria microvascular, disfunção da barreira hemato-encefálica, iniciando inflamação pós-isquêmica. Esses eventos todos exacerbam a injúria inicial e podem levar a um dano cerebral permanente (Figura 1). O dano permanente vai depender de vários fatores: o grau e a duração da isquemia, e a capacidade de recuperação do cérebro em reparar os danos provocados pela isquemia (DIRNAGL et al., 1999; LAKHAN et al., 2009).

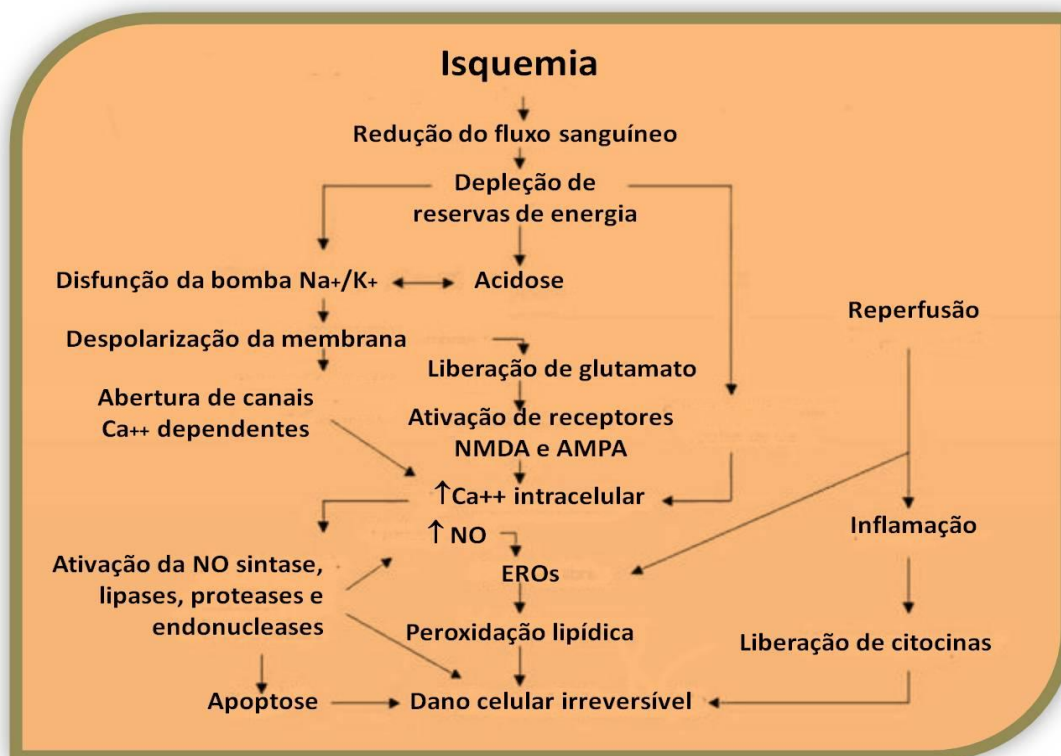


Figura 1. Visão geral simplificada dos mecanismos patofisiológicos envolvidos na isquemia cerebral.

As investigações têm demonstrado que os principais processos responsáveis pelo dano neuronal pós-isquêmico envolvem: um aumento na concentração de cálcio intracelular, neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos, elevação nos níveis de lactato e ácidos graxos livres, o aumento na formação de radicais livres e diminuição da concentração de adenosina 5' trifosfato (ATP) (NYAKAS et al., 1996; HERTZ, 2008). Durante e imediatamente após o evento isquêmico, o potencial de membrana é perdido e os neurônios sofrem despolarização devido à disfunção da bomba de Na^+/K^+ -ATPase. Essa alteração na homeostase iônica compromete os sistemas de liberação e captação de neurotransmissores na fenda sináptica. Conseqüentemente, os canais de cálcio voltagem-dependentes são ativados induzindo uma liberação massiva de glutamato no espaço extracelular (NICHOLLS & RICHARDS, 1999). A ativação de

receptores glutamatérgicos causa a abertura dos canais de cálcio, ocasionando um aumento da concentração de cálcio livre intracelular, resultando no influxo de sódio e cloro nos neurônios, juntamente com a água, caracterizando o edema celular (DIRNAGL et al., 1999; HERTZ et al., 2008). O aumento de cálcio citoplasmático desencadeia uma cascata de eventos intracelulares, causando dano tecidual através da ativação de enzimas proteolíticas, endonucleases, lipases, entre outras, levando à morte celular (MITANI et al., 1993). A ativação da fosfolipase A2 e da ciclooxigenase (COX) gera radicais livres acima da capacidade dos mecanismos antioxidantes endógenos, produzindo peroxidação lipídica e dano à membrana (ZHAO et al., 1994).

A cascata isquêmica normalmente segue por horas e pode permanecer por dias, mesmo após a restauração da circulação sanguínea. Embora a reperfusão do tecido cerebral isquêmico seja crítica para a restauração da função cerebral normal, ela pode paradoxalmente resultar em danos secundários, chamados de injúrias decorrentes da isquemia/reperfusão (I/R). A definição patofisiológica em relação à injúria causada pela I/R ainda permanece obscura; contudo, mediadores de estresse oxidativo, como espécies reativas de oxigênio (EROs) são sugeridos desempenhar um papel importante dentro deste contexto. O termo estresse oxidativo se refere à condição na qual células são submetidas a níveis excessivos de EROs, sendo inábeis em contrabalancear os efeitos deletérios decorrentes da liberação de EROs com mecanismos antioxidantes celulares. O estresse oxidativo tem sido associado com processos de envelhecimento e a uma variedade de doenças, incluindo arterosclerose, câncer, doenças neurodegenerativas e isquemia (CHAN, 1996).

Em termos de atenuar os efeitos deletérios promovidos pela excessiva liberação de ROS na isquemia, inundar o sistema com antioxidantes ou induzir a hiperexpressão de enzimas antioxidantes pode ser tão prejudicial quanto excessiva exposição a radicais

livres. Atualmente, não existem terapias disponíveis para o tratamento da isquemia em relação à excessiva produção de EROs, e isso em parte se deve a alta natureza reativa desses mediadores. Contudo, um número de compostos em testes clínicos demonstram resultados promissores neste sentido. A abordagem mais produtiva em maximizar a efetividade das terapias diretamente relacionadas com as EROs seria administrar agentes antioxidantes no tempo da reperfusão, estabelecendo um balanço nos níveis de EROs que não seja prejudicial e que permita os processos normais funcionarem (ALLEN & BAYRAKTUTAN, 2009).

1.2.3 Mecanismos de Morte Neuronal em Isquemia Global

Nas duas últimas décadas, a morte celular foi classificada convencionalmente como sendo apoptótica ou necrótica, diferindo morfológica e bioquimicamente entre si (MARTIN et al., 1998; KIRINO et al., 1984). A morte celular fisiológica é geralmente considerada apoptótica e sugere-se que seja organizada de forma programada (MCP), mediada por mecanismos ativos e intrínsecos. Em contraste, morte celular patológica ou acidental é considerada necrótica, resultando de insultos extrínsecos à célula (DEAN, 1987; FARBER, 1981). O processo celular necrótico envolve rompimento estrutural e funcional da integridade da membrana plasmática, rápido influxo intracelular de cálcio e água, e subsequente dissolução da célula. Mais recentemente, o conceito de morte celular foi reformulado baseado no achado de que fenótipos morfológicos da morte neuronal excitotóxica compartilham características comuns entre si, independente da fragmentação do DNA (PORTERA-CAILLIAU et al., 1997). Isto significa que uma análise histológica da morte celular pode apresentar uma coexistência morfológica apoptótica e necrótica. Os mecanismos moleculares correspondentes aos estágios estruturais de morte celular permanecem por ser identificados.

A isquemia cerebral global (ICG) é uma patologia provocada por uma parada cardíaca transitória, decorrente de um choque, asfixia ou, ainda, em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca complexa (HARUKUNI & BHARDWAJ, 2006; NEUMANN et al., 2012). Adicionalmente, a ICG implica uma diminuição total do fluxo sanguíneo cerebral em todo o encéfalo, o que resulta em um padrão previsível de injúria histológica, na qual populações específicas de neurônios são afetadas, causando morte neuronal irreversível (NIKONENKO et al., 2009; ROSENBERG et al., 2010). Entre essas regiões estão o hipocampo (sub-região CA1), o estriado (núcleo caudado e putâmen) e as lâminas 3, 5 e 6 do córtex cerebral (DIEMER et al., 1993). Várias manifestações de vias de morte neuronal foram relacionadas para explicar este fenômeno, incluindo excitotoxicidade, estresse oxidativo e mecanismos de apoptose (DAWSON & DAWSON, 2006). Contudo, os mecanismos pelos quais a ICG produz morte neuronal irreversível não estão bem esclarecidos, e, atualmente, estão mais obscuros pelas tentativas de explorar a contribuição da MCP em relação à neurodegeneração isquêmica.

O achado de que a morte celular na região CA1 hipocampal é tardia seguida de ICG (ITO et al., 1975; KIRINO, 1982; PULSINELLI et al., 1982) apela no sentido de um possível papel da MCP na neurodegeneração. O pressuposto subjacente é que alguns mecanismos de morte celular ativos são engajados durante o atraso temporal entre o insulto inicial e a degeneração última dos neurônios piramidais da região CA1. Embora os mecanismos implicados na morte neuronal tardia não estejam ainda bem elucidados, o atraso substancial entre a provocação e o começo da morte neuronal fornece a oportunidade de examinar os eventos moleculares que destinam esses neurônios à morte (JOVER-MENGUAL et al., 2006). A futura exploração desses conceitos pode ser de

fundamental importância a respeito de como a neurodegeneração é desencadeada no contexto da isquemia cerebral e outras doenças neurodegenerativas.

1.3 Modelos Experimentais em Isquemia Cerebral

Desde o final da década de 70, modelos animais de isquemia cerebral foram desenvolvidos com o objetivo de identificar mecanismos que causam dano tecidual, promovendo bases para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da isquemia. Inúmeros modelos animais desenvolvidos recentemente foram concebidos para tratar fatores de risco específicos, visando identificar os processos de reparação neuronal e, conseqüentemente, recanalizando novas estratégias neuroprotetoras. Hoje em dia, modelos animais confiáveis estão disponíveis em uma variedade de espécies, incluindo primatas, porcos, ovelhas, cachorros, gatos, gerbilos, coelhos, ratos e camundongos, e são ferramentas essenciais para o entendimento dos mecanismos implicados na patofisiologia da isquemia cerebral (BACIGALUPPI e al., 2010). Os modelos experimentais de isquemia cerebral mostram que as alterações do metabolismo que acompanham a reperfusão podem desencadear lesão celular em regiões específicas do sistema nervoso, que são dependentes da duração da isquemia. Os estudos sobre a maior vulnerabilidade do hipocampo à isquemia/reperfusão têm sido direcionados para mecanismos que envolvem a liberação de glutamato (BLOCK, F., 1999).

A ICG pode ser induzida por métodos visando diferentes abordagens. Diversos modelos animais foram desenvolvidos para simular completamente uma ICG humana, e são frequentemente utilizados para estudarem o dano cerebral. O modelo de oclusão dos quatro vasos (4VO) consiste em uma oclusão reversível das artérias carótidas, que, combinado com a interrupção permanente das artérias vertebrais via eletrocauterização, resulta em uma isquemia bilateral com um alto e previsível dano cerebral (PULSINELLI & BRIERLEY, 1979). Brevemente, eletrocauteriza-se as

artérias vertebrais com 24h de antecedência da oclusão temporária das artérias carótidas, com verificação da eficiência isquêmica através da ausência de reflexo pupilar e de endireitamento. A reperfusão é restaurada pela liberação do fluxo sanguíneo de ambas as artérias carótidas. Como alternativa ao modelo 4VO, a isquemia global pode ser induzida também pela oclusão transitória das artérias carótidas comuns, isto é, por oclusão de dois vasos (2VO), juntamente com a indução de hipotensão por um período de tempo limitado. Nestes modelos experimentais de isquemia global, observa-se uma susceptibilidade maior em áreas específicas do encéfalo, como a região CA1 do hipocampo, o neocórtex, o estriado e regiões específicas do cerebelo (SMITH et al., 1984).

Os modelos experimentais em ICG têm sido amplamente empregados em mamíferos de grande porte, como cachorros e porcos, considerando que as variáveis cardiocirculatórias podem ser monitoradas de maneira similar como em humanos nesses animais. Os gerbilos mongolianos são amplamente utilizados em modelos crônicos de isquemia cerebral transitória, devido ao seu círculo de Willis incompleto, isto é, ausência de comunicação arterial entre as artérias cerebrais médias e posteriores. Devido a esta anatomia peculiar, a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns produz hiperperfusão prolongada, com uma redução de até 75% do fluxo sanguíneo cerebral (KUDO et al., 1993). Com a oclusão das artérias carótidas comuns por mais de 10 minutos, observa-se uma morte neuronal significativa no hipocampo (GIULIANI et al., 2006). Essas modificações são acompanhadas por vários prejuízos comportamentais, tais como déficits de aprendizado e memória espacial que variam com o grau e a duração da hipoperfusão.

Os modelos de camundongos foram inicialmente menos comuns, à medida que foram prejudicados pelo alto índice de mortalidade e complicações frequentemente

decorrentes dos insultos isquêmicos (TRAYSTMAN, 2003). Devido à necessidade de uso de animais transgênicos, a isquemia global foi recentemente introduzida em camundongos pelo método de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns em associação com ventilação controlada (MURAKAMI et al., 1998) e, clinicamente mais relevante, pela indução de parada cardíaca (8-10 min), seguida de ressuscitação cardiopulmonar. Estes modelos são caracterizados pela injúria seletiva de neurônios do hipocampo e estriado (KRIEGLSTEIN et al., 2000).

1.4 O Hipocampo

A anatomia e a diferenciação neuroquímica do hipocampo têm sido bem descrita na literatura ao longo do tempo (BAYER, 1985; AMARAL & WITTER, 1989), sendo a região mais utilizada no estudo da fisiopatologia da isquemia cerebral. Isto se deve ao fato dessa estrutura possuir um arranjo neuronal relativamente simples em comparação a outras regiões encefálicas. Adicionalmente, permite o estudo detalhado das alterações morfofisiológicas devido a sua sensibilidade particular a esta patologia (KIRINO et al., 1984).

O hipocampo consiste em duas finas camadas de neurônios, dobradas uma sobre a outra. Uma camada é o giro denteado, e a outra é o corno de Amon (do latim *cornu Ammonis*). O corno de Amon é subdividido em áreas chamadas CA1, CA2 e CA3. As iniciais C e A maiúsculas referem-se à abreviatura de corno de Amon. Em um corte histológico típico do hipocampo dorsal, a região CA1 contém células piramidais convergindo para a região dorsal (Figura 2). Nesta região, existe um fim bem definido de células CA1, onde estas células piramidais se tornam maiores, formando a região CA2. A transição da região CA2 para a CA3 está em algum lugar na curvatura lateral e não é morfológicamente detectável em material histológico corado. As células piramidais da região CA3 se estendem até o hilus do giro denteado. Os neurônios do

hilus e do giro denteado são frequentemente definidos como CA4, o que deixa alguma dúvida sobre a inclusão da parte final da região CA3 (FRIED & NOWAK, 1987; SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991).

Em termos de injúria celular, o hipocampo é a região de predileção clássica para a injúria isquêmica. O setor CA1 sofre com a isquemia, enquanto o setor adjacente CA3 e o giro denteado permanecem amplamente resistentes. Esse diferencial nos padrões de lesão celular em CA1/CA3 cria uma situação ideal para comparar áreas resistentes e vulneráveis dentro de uma pequena parte do cérebro (KIRINO et al., 1984; PULSINELLI et al., 1982). Muitos estudos histológicos utilizam cortes em parafina ou em criostato para descrever a distribuição geral das lesões isquêmicas no hipocampo. Os métodos histológicos de coloração de Nissl ou de Hematoxilina-eosina são os métodos mais amplamente utilizados na revelação de neurônios com danos isquêmicos no hipocampo. A análise histológica hipocampal permite um acesso fácil e direto, onde os neurônios encontram-se alinhados nas bandas piramidais celulares, enquanto o dano nas populações neuronais do estriado e neocortex são mais difíceis de acessar. Essa é uma razão óbvia do porque de muitos estudos terapêuticos em isquemia preferirem analisar mudanças morfológicas no hipocampo. Ainda, manipulações terapêuticas podem ser quantificadas como diferenças em números de neurônios piramidais sobreviventes na região hipocampal em animais tratados com drogas neuroprotetoras. Conseqüentemente, quando certas precauções são feitas, como a fixação-perfusão e um período adequado de sobrevivência, estudos histológicos conservativos utilizando o microscópio óptico apresentam indicações de maior confiança em relação à manifestação da injúria isquêmica (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991).

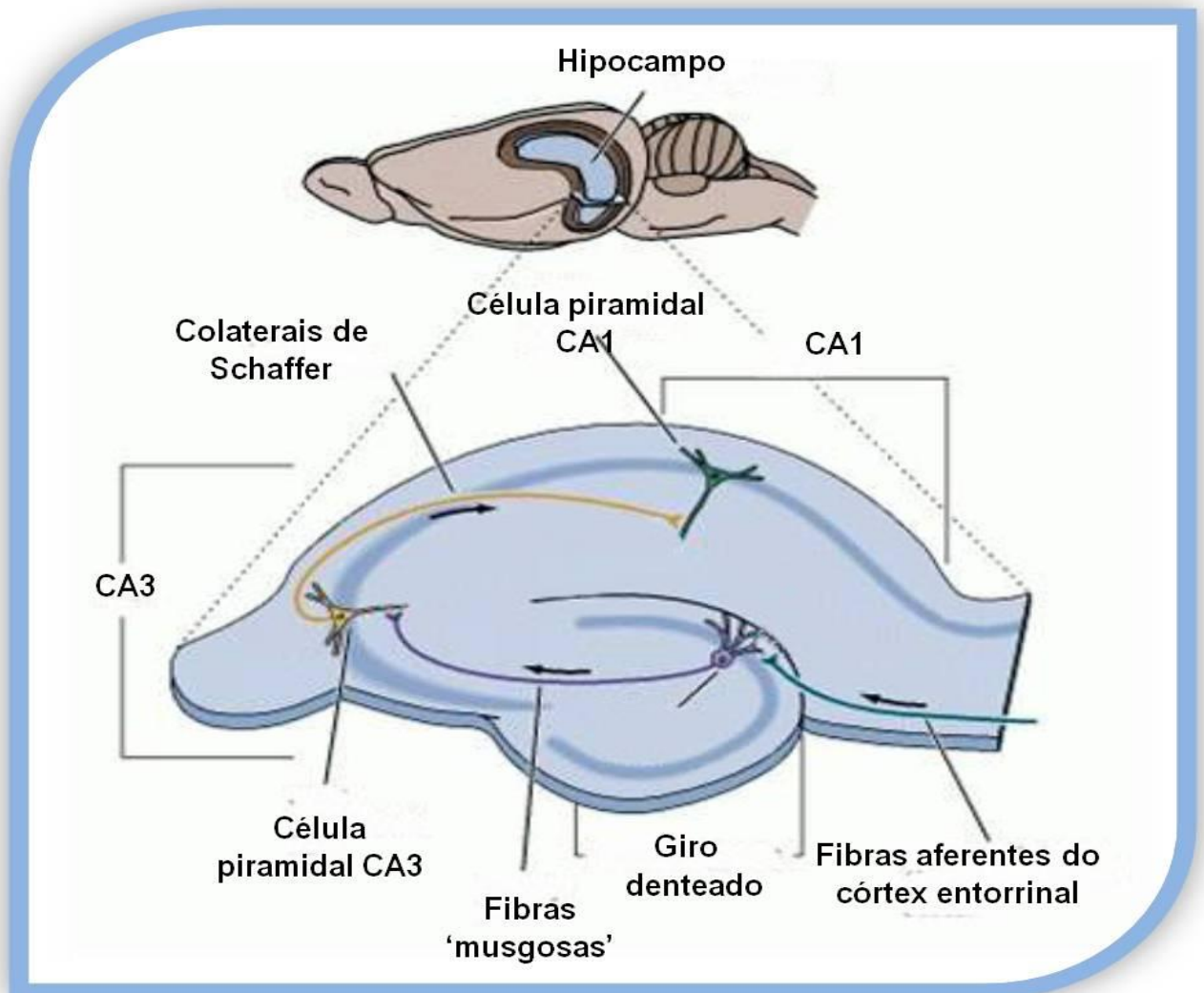


Figura 2. Esquema da estrutura e conexões do hipocampo. CA: abreviatura de Corno de Ammon. (Adaptado de HYDE & STROWBRIDGE, 2012).

1.4.1 Vulnerabilidade Seletiva e Morte Neuronal Tardia

Os conceitos alusivos aos termos “vulnerabilidade seletiva” e “morte neuronal tardia” têm papel fundamental no contexto da fisiopatologia da isquemia cerebral, permitindo-nos compreender o porquê de algumas células permanecerem viáveis por períodos limitados após o insulto isquêmico. A região CA1 hipocampal é considerada uma das regiões de maior vulnerabilidade celular no contexto da isquemia cerebral, e seus neurônios piramidais são tidos como sendo os mais sensíveis de todo o encéfalo,

levando mais de um dia para apresentarem morte celular isquêmica completa (SHELDON et al., 2001; NITATORI et al., 1995; ARAI et al., 1986). Embora esta vulnerabilidade seletiva da isquemia tenha sido reconhecida há muito tempo (PULSINELLI et al., 1982), os mecanismos moleculares que sustentam este mistério neurobiológico permanecem pouco conhecidos (TANAKA et al., 2004; LO et al., 2003).

Em 1982, KIRINO, utilizando o modelo de isquemia global transitória de curta duração, demonstrou que neurônios da região CA1 tinham aparência normal quando observados sob lente microscópica óptica até 3 dias após isquemia experimental induzida. Este relato deu início ao novo mecanismo de dano isquêmico denominado morte neuronal tardia, bem fundamentado hoje em dia na literatura científica. Uma variabilidade de relatos científicos corrobora com este achado, e demonstram que, se o impacto isquêmico é mantido por tempo limitado, isto é, de 5-10 min em gerbilos ou por 5-30 min em ratos, neurônios da região CA1 se recuperam morfológicamente durante os 2-3 primeiros dias após o estresse isquêmico. Estes acontecimentos estimularam fortemente a pesquisa em isquemia, com foco especial no hipocampo. Esses achados morfológicos implicam, na realidade, que neurônios piramidais da região CA1 hipocampal podem ser recuperados por meios terapêuticos após a isquemia cerebral, e, de fato, várias medidas farmacológicas utilizadas na terapêutica isquêmica demonstraram proteger neurônios CA1 da morte neuronal tardia (para revisão, consulte WEIGL et al., 2005).

A morte neuronal tardia pode ser detectada também em análise neuropatológica em pacientes com morte por parada cardiorrespiratória, sugerindo que este evento não é uma peculiaridade específica observada somente em modelos animais, mas com relevância clínica importante (PETITO et al., 1987). Considerando que o auge do dano

celular ocorre após 72 horas do evento isquêmico, restando apenas 5,8% dos neurônios íntegros no decorrer de 3 semanas (NITATORI et al., 1995), interferir farmacologicamente nesta janela de tempo entre sobrevivência e morte celular parece ser uma alternativa plausível na terapêutica isquêmica, já que não existe atualmente um tratamento eficaz contra os efeitos neurodegenerativos provocados por esta patologia.

1.5 Receptores AMPA e a Excitotoxicidade

Já está bem fundamentado na literatura, por mais de duas décadas, que a liberação de glutamato ativa receptores ionotrópicos glutamatérgicos (RIG), causando entrada de cálcio, excitotoxicidade e morte neuronal em regiões cerebrais vulneráveis (SIMON et al., 1984; LO et al., 2003). O que permanece nebuloso, entretanto, é o papel específico de alguns receptores glutamatérgicos permeáveis a cálcio em precipitar a morte celular, e o porque de neurônios em algumas regiões do encéfalo, incluindo neurônios piramidais hipocâmpais em CA1, neurônios estriatais e projeções corticais, serem mais vulneráveis à excitotoxicidade mediada por glutamato em comparação com outras regiões encefálicas (SIMON et al., 1984; PELLEGRINI-GIAMPIETRO et al., 1997).

No SNC, a ativação de RIG permite a rápida entrada de íons através da membrana, mediando uma rápida transmissão sináptica excitatória, sendo crucial para a plasticidade sináptica e aprendizado e memória. Contudo, a ativação excessiva destes receptores em condições patológicas, como a isquemia, precipita a morte neuronal excitotóxica em populações neuronais vulneráveis, permitindo um excessivo influxo intracelular cálcio, sódio e zinco (LO et al., 2003). Existem 3 tipos de RIG: NMDA, AMPA e cainato. Devido a todos os subtipos de receptores NMDA serem permeáveis a cálcio, estudos iniciais focaram esforços em desvendar o papel deste receptor na injúria isquêmica (SIMON et al., 1984; LO et al., 2003). Mais recentemente, a atenção dos

pesquisadores se voltou para o papel crítico que os receptores AMPA permeáveis a cálcio também desempenham na morte neuronal excitotóxica (LIU & ZUKIN, 2007).

Os receptores AMPA (AMPA) no SNC são canais homoméricos/tetraméricos/heteroméricos localizados em densidades pós-sinápticas (DPSs) na sinapse, agrupados em quatro possíveis sub-unidades (GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4), cada um deles pesando, aproximadamente, 100kDa (DINGLELINE et al., 1999). Frequentemente, AMPARs são constituídos de, pelo menos, 2 subunidades diferentes, embora homomeros podem também ser formados (MARTIN et al., 2000; WENTHOLD et al., 1996). As 4 subunidades possuem um domínio N-terminal longo, que é extracelular, 3 domínios transmembrana e um C-terminal que é intracelular. Os C-terminais desses receptores são essenciais na regulação da sua função (Figura 3).

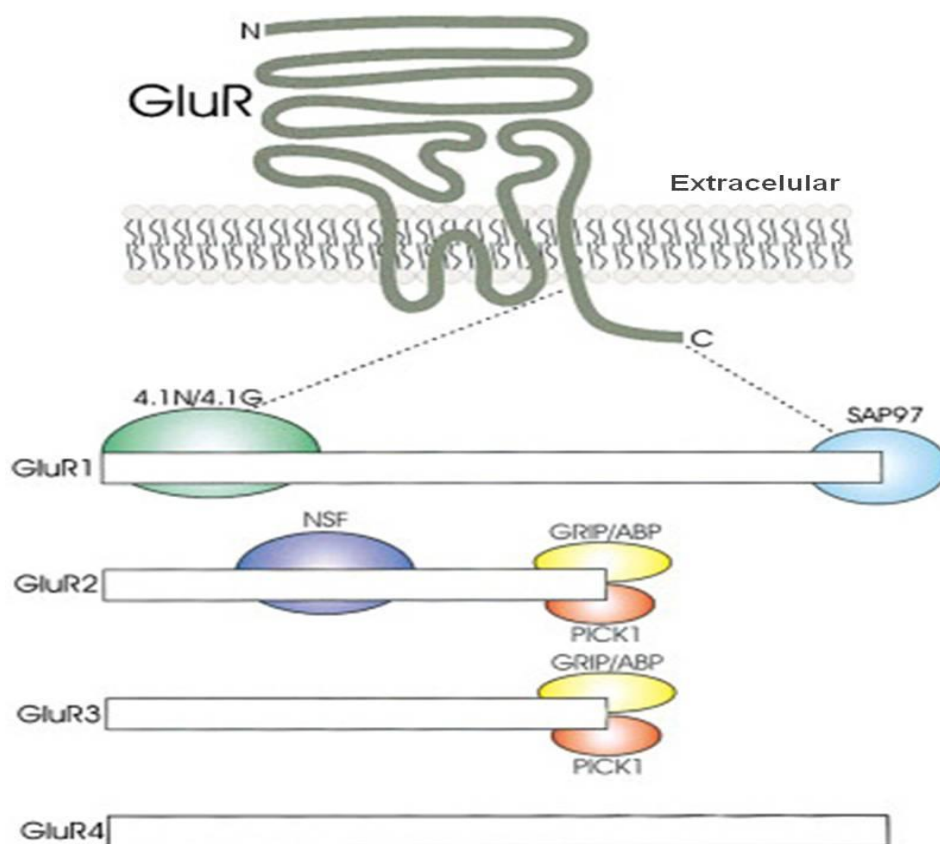


Figura 3. Desenho esquemático relativo às quatro subunidades dos receptores AMPA (GluR1-4) e suas respectivas proteínas de interação acopladas ao longo de suas moléculas.

No hipocampo, os receptores AMPA exibem primariamente a disposição GluR1/GluR2 e GluR2/GluR3 (CRAIG et al., 1993; WENTHOLD et al., 1996). Alguns estudos demonstram que a ausência da subunidade GluR2 na constituição dos AMPARs está relacionada com a alta permeabilidade a cálcio e a morte celular em CA1 na ICG (PELLEGRINI-GIAMPIETRO et al., 1997; LIU et al., 2006). A impermeabilidade a cálcio nos receptores que contém GluR2 é caracterizada pela presença de um resíduo de arginina (R) no domínio transmembrana 2 desta subunidade, ao invés de um resíduo de glutamina (Q), presente nas subunidades GluR1, GluR3 e GluR4. Essa informação não é codificada a nível genômico, mas sim é um resultado da edição do RNA no núcleo (pré-RNA mensageiro do GluR2) pela enzima adenosina deaminase 2 (ADAR2), que catalisa a desaminação sítio-seletiva da adenosina no códon genômico da glutamina (CAG) a uma inosina, gerando um códon de arginina (CIG) no RNA mensageiro (mRNA) (SEEBURG & HARTNER, 2003). Essa posição do mRNA do GluR2 é normalmente encontrada 100% editada no cérebro, no chamado sítio Q/R no códon 607 (SOMMER et al., 1991). Na maioria dos neurônios piramidais da região CA1 hipocampal, encontra-se esta forma editada de GluR2, o GluR2(R), conferindo, então, a impermeabilidade a entrada de cálcio, sugerindo que a vasta maioria de AMPARs no SNC que possuem GluR2(R) em sua composição são impermeáveis a cálcio (Figura 4).

A isquemia cerebral transitória induz um padrão seletivo de perda neuronal no SNC. Como resultado, certos subconjuntos de neurônios identificáveis, incluindo neurônios piramidais da região CA1, são gravemente prejudicados, enquanto outros permanecem intactos (PULSINELLI et al., 1982; SCHMIDT-KASTNER & FREUND; 1991). Essa injúria neuronal seletiva é dependente de cálcio e/ou zinco (CHOI, 1988; CHOI & KOH, 1998), e provavelmente reflete a ativação de canais de receptores

AMPA permeáveis a cálcio (GORTER et al., 1997; OGURO et al., 1999; WEISS & SENSI, 2000). Na maioria dos neurônios CA1 hipocampais, os canais receptores AMPA exibem a forma editada GluR2(R), conferindo, desta forma, a impermeabilidade a entrada de cálcio (GEIGER et al., 1995).

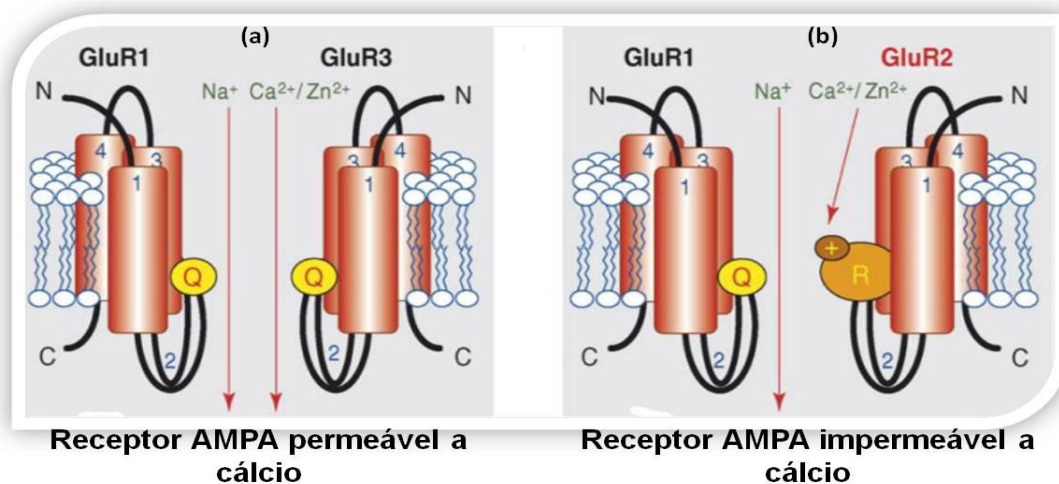


Figura 4. Permeabilidade ao cálcio dependente da composição de subunidades relativa aos receptores AMPA. A subunidade GluR2 ausente na estrutura confere permeabilidade ao cálcio (a), enquanto que a presença da subunidade GluR2 nos canais heteroméricos AMPA limita o influxo de cálcio e zinco (b). (Adaptado de LIU & ZUKIN, 2007).

Pesquisas recentes demonstraram que a isquemia cerebral transitória reduz tanto os níveis de mRNA quanto os níveis proteicos de GluR2 em neurônios da região CA1 (PELLEGRINI-GIAMPIETRO et al., 1992; GORTER et al., 1997; OGURO et al., 1999). Ainda, insultos isquêmicos desencadeiam uma regulação na expressão do mRNA do GluR2 e abundância de proteína em neurônios piramidais em CA1, induzindo uma modificação de longa duração no fenótipo dos AMPARs a partir da presença ou não da subunidade GluR2 no canal da membrana. Esta observação levou à hipótese do GluR2, que, por sua vez, postula que, em insultos isquêmicos, há uma redução significativa na expressão de GluR2, o que permite a entrada de cálcio através de canais receptores AMPA permeáveis a cálcio, levando à morte neuronal em CA1 devido ao aumento da

toxicidade. Considerando que os canais de AMPARs permeáveis a cálcio não são somente permeáveis a cálcio, mas também são altamente permeáveis a zinco (KOH et al., 1996; WEISS & SENSI, 2000) e que um breve insulto isquêmico em ratos induz uma acumulação de zinco em neurônios vulneráveis (KOH et al., 1996), sugere-se o papel dos canais de AMPARs permeáveis a cálcio proporcionam uma rota para a entrada tóxica de cálcio e/ou zinco em neurônios vulneráveis CA1. Neste contexto, um fato marcante a ser considerado é o atraso substancial no influxo de cálcio e de zinco na região CA1. O influxo de cálcio ocorre antecipadamente, durante e logo após o insulto isquêmico, enquanto que o influxo de zinco ocorre 24-48 horas após a isquemia, coincidindo com o início da morte celular (LIU & ZUKIN, 2007).

O domínio C-terminal do GluR2, conhecido como o domínio de ligação PDZ, é de crucial importância na internalização dos receptores AMPA através da ligação de proteínas, como a proteína de interação com o receptor de glutamato (GRIP1) e a proteína de interação com a C-quinase-1 (PICK1) (DONG et al., 1997; HANLEY, 2008; SHEPHERD & HUGANIR, 2007). O complexo adaptador de clatrina (AP2), a GTPase Rabaptina-5 (Rab5), a proteína pós-sináptica homóloga 1 (Homer), a proteína sináptica *candidate plasticity gene 2* (CPG2), a mecano-enzima dinamina 3 e a proteína associada ao citoesqueleto de atividade regulamentada (Arc/Arg3.1) também estão implicadas no controle da endocitose dos AMPARs bem como na fosforilação do GluR1 (ZHANG et al., 2011; NEWPHER & EHLERS, 2008). Esses estudos fornecem informações importantes na maquinaria proteica envolvida no tráfego de AMPARs (KESSELS & MALLINOW, 2009; SHENG & HOOGENRAAD, 2007). Contudo, os mecanismos específicos envolvidos na internalização dos AMPARs ainda não estão bem esclarecidos.

Evidências emergentes na literatura indicam que, não somente a expressão de GluR2, mas também o tráfego de receptores pode estar desregulado em resposta a insultos neuronais. Por exemplo, a isquemia promove internalização massiva de receptores AMPA com GluR2 em sua estrutura através de endocitose dependente de clatrina, levando a uma modificação no fenótipo dos receptores AMPA. Essa modificação no fenótipo é dependente de proteína quinase C (PKC) e envolve a dissociação do GluR2 da proteína ligante de receptores AMPA (ABP) e sua associação com PICK1 (ISAAC et al., 2007; SHI et al., 2001, NEWPHER & EHLERS, 2009).

1.6 Pre-Condicionamento e Sobrevivência Neuronal

Muitos estímulos metabólicos estressantes, mas não letais, ativam mecanismos endógenos protetores que diminuem significativamente o grau de injúria tecidual. Esse mecanismo protetor é conhecido como *pré-condicionamento* ou *tolerância induzida*, e se faz presente em vários órgãos, incluindo o cérebro e o sistema nervoso central. O pré-condicionamento isquêmico (um curto período de isquemia não letal para as células neuronais) pode proteger os neurônios contra uma isquemia mais grave que normalmente seria letal para estas células, especialmente da região CA1 do hipocampo (MELLER & SIMON, 2013). Os mecanismos de proteção da região CA1 pelo pré-condicionamento isquêmico ainda não estão bem compreendidos, mas estudos recentes têm mostrado que vários aspectos podem estar envolvidos no desenvolvimento do fenômeno, como mecanismos anti-apoptóticos e ativação de proteínas, entre outros fenômenos (YANO et al., 2001; ZHAN et al., 2001). Entendendo o sinal em cascata promovido pelo pré-condicionamento poderá ensejar o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos em pacientes com risco de injúria isquêmica e de tratar doenças crônicas neurodegenerativas.

A ativação gênica, ou sua repressão, processos envolvidos no pré-condicionamento, são temporalmente específicos e induzem a expressão de diversas famílias de genes envolvidos na sobrevivência celular que, por sua vez, aumentam a resistência cerebral à injúrias (GIDDAY, 2006). A natureza do estímulo pré-condicionado determina a via de transdução que leva a modificações pós-transducionais e/ou a ativação de respostas transcricionais que estão envolvidas com a resposta da sobrevivência celular (DAI et al., 2010). Enquanto as moléculas neuroprotetoras e as redes associadas a esses eventos são pouco conhecidos, é válido ressaltar que a resposta cerebral a esses estressores pode prover profunda neuroproteção contra injúrias letais (GIDDAY, 2006). Células e modelos animais estão auxiliando a compreender o mecanismo envolvido entre resposta gênica e expressão proteica que ativa a resposta neuroprotetora. Aprender mais sobre esses potentes mecanismos neuroprotetores endógenos poderia ajudar com novas abordagens para tratar pacientes com isquemia cerebral e outras desordens do sistema nervoso ou injúrias.

1.6.1 A Proteína Thorase

A partir desse paradigma, Valina Dawson e colegas desenvolveram uma estratégia para descobrir genes neuroprotetores a partir de tecidos pré-condicionados. Alguns desses genes fornecem proteção não somente contra injúrias isquêmicas e excitotóxicas, mas também contra apoptose e quando em restrição de oxigênio e glicose (DAI et al., 2010). Seus achados sugerem que seja possível encontrar moléculas neuroprotetoras e que poderiam proporcionar novas estratégias de tratamento. Um destes genes, caracterizado como gene neuroprotetor 6 (NPG6) locus:(EF688601) (DAI et al., 2010), foi identificado tendo um papel importante na sobrevivência neuronal e aprendizado. Esse gene codifica a uma proteína (uma AAA-ATPase) chamada *Thorase*,

que demonstrou controlar a internalização de AMPARs, de modo ATPase-dependente, através da desmontagem do complexo GluR2/GRIP1.

A *Thorase* é uma ATPase composta por 361 aminoácidos com um papel fundamental na internalização dos AMPARs. Estudos imunohistoquímicos revelaram uma expressão heterogênea da *Thorase* com uma alta expressão desta proteína em neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo. Ainda, a microscopia confocal indicou que a *Thorase* colocaliza com os AMPARs GluR1 e GluR2, com a proteína pré-sináptica sinapsina 1 e com o marcador pós-sináptico PSD95 (ZHANG et al., 2011). Em um estudo de coimunoprecipitação, onde ela foi coexpressada com proteínas pós-sinápticas envolvidas na internalização de AMPARs, demonstrou interagir especificamente com o GRIP1, falhando em coimunoprecipitar com GRIP2, Arc, Homer 1, Homer 2, PICK1 e PSD95. Ela também mostrou exercer interação com os aminoácidos 832-839 relativos ao terminal C do GluR2 tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Adicionalmente, foi demonstrado a sua participação na dissociação do complexo GluR2-GRIP1, agindo neste complexo controlando a endocitose e subsequente remoção do GluR2 da membrana pós-sináptica, promovendo sua internalização (ZHANG et al., 2011). Determinar a atividade biológica da *Thorase* é de essencial importância para a melhor compreensão de como as vias neuronais de sobrevivência atuam e como elas podem servir como possíveis terapias futuras no tratamento de doenças neurodegenerativas.

1.7 Neuroproteção Farmacológica

Com a crescente compreensão do mecanismo de morte celular na isquemia cerebral, novas abordagens de tratamento emergiram. Ensaios clínicos na avaliação de drogas neuroprotetoras para o AVE foram primeiramente iniciados durante os anos 80 e ainda permanecem em processo de avaliação (SHUAIB & HUSSAIN, 2008). Embora

a definição de neuroproteção não seja sempre clara, o objetivo básico dessa estratégia é interferir nos eventos da cascata isquêmica, com foco no bloqueio de mecanismos que levam à injúria cerebral, bloqueando os processos patológicos e prevenindo a morte celular. Esse conceito envolve a inibição dos eventos patológicos moleculares que levam eventualmente ao influxo de cálcio, produção de EROs e morte neuronal (AURIEL & BORNSTEIN, 2010).

A lista de drogas neuroprotetoras testadas é muito vasta. Esses agentes incluem, entre outros, bloqueadores de canais de cálcio, quelantes de cálcio, antioxidantes, EROs *scavengers*, anticoagulantes, antagonistas GABA, antagonistas AMPA, antagonistas NMDA, antagonistas de Glicina, antagonistas de poliaminas, fatores de crescimento, anti-inflamatórios, inibidores da oxido nítrico sintase, antagonistas de opióides, antagonistas serotoninérgicos, bloqueadores de canais de sódio e potássio, terapia hormonal estrogênica (WAHLGREN & AHMED, 2004; AURIEL & BORNSTEIN, 2010).

Em termos quantitativos, aproximadamente 1.026 drogas foram testadas em vários modelos animais, dentre estas, somente 114 estão sob avaliação clínica (DE LA OSSA et al., 2007). A maior parte desses agentes estudados até agora falharam. Somente o ativador de plasminogênio tecidual permanece o único agente eficaz em melhorar o quadro clínico após um AVE em ensaios clínicos. Contudo, sua utilização é limitada pela curta janela terapêutica (3 horas) devido às complicações derivadas de sua administração, essencialmente caracterizadas pelo risco de hemorragia (FURLAN et al., 2003).

1.7.1 Coumestrol

Já está bem estabelecido na literatura que o hormônio feminino estrogênio (E_2) exerce profundos efeitos protetores em modelos animais de isquemia focal e global (McCULLOUGH & HURN, 2003; CIMAROSTI et al., 2005; GIBSON et al., 2006). O E_2 tem amplas propriedades no cérebro. Ambos os conhecidos receptores de E_2 ($ER\alpha$ e $ER\beta$) são expressos em neurônios hipocâmpais (PEREZ et al., 2003; MITRA et al., 2003). No hipocampo, o E_2 regula a densidade de espinhos dendríticos (GOULD et al., 1990), o número de sinapses (WOOLLEY et al., 1994), a síntese de fatores de crescimento (GARCIA-SEGURA et al., 2001) e a expressão de receptores NMDA (GAZZALEY et al., 1996). Estudos recentes demonstram que E_2 , em níveis considerados fisiológicos, previne a ativação de cascatas de sinalização apoptóticas e diminui a perda neuronal induzida pela isquemia global (JOVER et al., 2002).

Fitoestrógenos são micronutrientes estruturalmente similares ao E_2 (HOGERVORST et al., 2008). São compostos não-esteróides, difenólicos encontrados em diversas plantas (frutas, vegetais, legumes, grãos e especialmente produtos derivados da soja) que têm propriedades químicas e estruturais semelhantes às propriedades dos estrógenos. Centenas de moléculas se encaixam nesta classificação e existem três grupos principais de fitoestrógenos. (1) as isoflavonas (derivadas da soja), (2) as lignanas (encontradas na semente de linho) e os coumestóis (derivados das plantas como a alfafa) (LUND et al., 2005). Estes compostos podem agir através de receptores de estrogênio, tanto $ER\alpha$ quanto $ER\beta$, ligando-se principalmente a receptores $ER\beta$ (LEPHART et al., 2007).

Vários isoflavonóides podem mimetizar os efeitos neuroprotetores do estrogênio. Coumestrol é um composto orgânico natural na classe dos fitoquímicos

conhecidos como coumestóis. Foi identificado na alfafa primeiramente por BICKOFF em 1957 (BICKOFF, 1957). Desde então, tem sido encontrado em altas concentrações em legumes como o feijão, brotos de alfafa e espinafre. A estrutura química do coumestrol é idêntica a dois grupos hidroxil (OH) em comparação à estrutura química do estradiol (CHOI et al., 2008). Este tem ganhado muita atenção e interesse durante os últimos anos devido a sua atividade estrogênica e por ser um potente isoflavonóide, com alta afinidade por receptores ER α e ER β , comparáveis com o 17- β -estradiol (WHITTEN et al., 2002).

Levando em conta que ainda não estão inteiramente elucidados os mecanismos pelos quais coumestrol age no cérebro, surge um crescente interesse em desvendar as vias de sinalização celular que este composto requer para que seus possíveis efeitos neuroprotetores sejam exercidos. Logo, é essencial dissecar minuciosamente as causas e efeitos de todo o processo envolvendo este composto e suas implicações, a fim de definir precisamente as janelas terapêuticas para um efetivo tratamento para a isquemia cerebral.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a possível atividade neuroprotetora de coumestrol contra os efeitos excitotóxicos decorrentes da isquemia cerebral global induzida, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*, visando suas propriedades antioxidantes e estrogênicas.

2.2 Objetivos Específicos

1) Avaliar a neuroproteção mediada por coumestrol *in vivo*:

a) Investigando se este composto pode promover neuroproteção quando administrado pré e pós isquemia cerebral global, através da análise morfológica de morte celular em CA1;

b) Determinando se a neuroproteção mediada por coumestrol estaria associada à atividade estrogênica, através do uso do antagonista de receptores ER α e ER β em CA1;

c) Avaliando se a neuroproteção mediada por coumestrol poderia estar relacionada com a atividade da bomba de Na⁺/K⁺ ATPase no hipocampo;

d) Verificando se coumestrol promove neuroproteção em ratos machos submetidos à isquemia experimental;

e) Examinando o possível papel do coumestrol nos níveis de expressão do receptor GluR2 no hipocampo de camundongos machos submetidos à isquemia cerebral global.

d) Examinando o possível papel do coumestrol na expressão da proteína Thorase no hipocampo de camundongos machos submetidos à isquemia cerebral global.

e) Investigando se o tratamento com coumestrol pode prevenir os déficits de memória induzidos pela isquemia cerebral global em uma avaliação comportamental.

2) Avaliar a neuroproteção mediada por coumestrol *in vitro*:

a) Investigando o efeito neuroprotetor deste composto contra excitotoxicidade induzida por NMDA em cultura de neurônios hipocâmpais quando administrado pré e pós ensaio excitotóxico;

b) Determinando se o efeito neuroprotetor de coumestrol está associado à atividade glial, através da administração do inibidor de crescimento glial 5F2DO.

CAPÍTULO 1

COUMESTROL HAS NEUROPROTECTIVE EFFECTS BEFORE AND AFTER

GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA IN FEMALE RATS

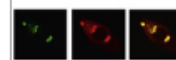
Brain Research, 1474: 82-90, 2012.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

Coumestrol has neuroprotective effects before and after global cerebral ischemia in female rats

Cibele Canal Castro^{a,*}, Aline S. Pagnussat^c, Lenir Orlandi^d, Paulo Worm^a, Nathalia Moura^c, Anne M. Etgen^b, Carlos Alexandre Netto^a

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Sul–UFRGS, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde–ICBS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^bDepartment of Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine, New York City, USA

^cDepartamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^dDepartamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 12 July 2012

Available online 21 July 2012

Keywords:

Coumestrol

Estradiol

Neuroprotection

Cerebral global ischemia

Hippocampus

Delayed neuronal death

ABSTRACT

Global ischemia arising during cardiac arrest or cardiac surgery causes highly selective, delayed death of hippocampal CA1 neurons. Phytoestrogens are naturally occurring plant-derived compounds that are present in the human diet and are considered selective estrogen receptor (ER) modulators. The phytoestrogen coumestrol is a potent isoflavonoid, with binding affinities for both ER- α and ER- β that are comparable to those of 17 β -estradiol. The present study examined the hypothesis that coumestrol protects hippocampal neurons in ovariectomized rats in a model of cerebral global ischemia. Ovariectomized rats were subjected to global ischemia (10 min) or sham surgery and received a single intracerebroventricular or peripheral infusion of 20 μ g of coumestrol, 20 μ g of estradiol or vehicle 1 h before ischemia or 0 h, 3 h, 6 h or 24 h after reperfusion. Estradiol and coumestrol afforded significant neuroprotection in all times of administration, with the exception of estradiol given 24 h after the ischemic insult. Animals received icv infusion of the broad-spectrum ER antagonist ICI 182,780 (50 μ g) or vehicle into the lateral ventricle just before the E2 or coumestrol administration. The ER antagonist abolished estradiol protection, consistent with a role of classical ERs. In contrast, ICI 182,780 effected only partial reversal of the neuroprotective actions of coumestrol, suggesting that other cellular mediators in addition to classical ERs may be important. Additional research is needed to determine the molecular targets mediating the neuroprotective action of coumestrol and the therapeutic potential of this phytoestrogen in the mature nervous system.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Stroke is the third leading cause of death in industrialized countries (Lewis et al., 2008) and the most frequent cause of

permanent disability in adults worldwide (Donnan et al., 2008). Three months following a stroke, 15–30% of stroke survivors are permanently disabled and 20% require institutional care. Deficits can include partial paralysis, difficulties

*Corresponding author. Fax: +55 51 3308 5540.

E-mail address: chodron@terra.com.br (C. Canal Castro).

with memory, thinking, language, and movements. In the western world, over 70% of individuals experiencing a stroke are over 65 years of age. Since life expectancy continues to grow, the absolute number of individuals with stroke will further increase in the future (Lakhan et al., 2009). Transient global ischemia arises as a consequence of cardiac arrest and causes selective, delayed death of hippocampal CA1 neurons in humans and can produce serious neurobiological sequelae of which cognitive deficits are most prominent (Lo et al., 2003; Moskowitz et al., 2010; Tanaka et al., 2000; Merchenthaler et al., 2003; Etgen et al., 2010).

Over the last decade, data from many studies support the idea that estrogens provide neuroprotective effects in a variety of focal and global ischemia models (Lebesgue et al., 2009; Merchenthaler et al., 2003; Garcia-Segura et al., 2001; Toran-Allerand, 2004; Shughrue and Merchenthaler, 2003). The potent feminizing hormone, 17 beta-estradiol (E2), is neuroprotective in a host of cell and animal models of stroke and neurodegenerative diseases. The discovery that 17 alpha-estradiol, an isomer of E2, is equally as neuroprotective as E2 yet is >200-fold less active as a hormone, has permitted development of novel, more potent analogs where neuroprotection is independent of hormonal potency (Simpkins and Dykens, 2008). For example, a single dose of estradiol administered immediately after reperfusion (acute estradiol) ameliorates global ischemia-induced neuronal death and cognitive deficits (Jover-Mengual et al., 2010; Gulinello et al., 2006). Moreover, a single injection of 17 β -estradiol administered to ovariectomized rats 2–4 day before ischemia also protects hippocampal neurons against ischemic damage via activation of CREB (Raval et al., 2009). At physiological concentrations it intervenes in apoptotic death cascades and ameliorates neuronal death in experimental models of focal and global ischemia (Brown et al., 2009; Gill et al., 2002;

Lebesgue et al., 2009). The cellular targets that mediate estradiol protection of hippocampal neurons in global ischemia are, however, unclear (Miller et al., 2005; Etgen et al., 2010; Strom et al., 2009; Brown et al., 2009; Suzuki et al., 2009; Yang et al., 2003; Barrera-Ocampo et al., 2008; Alonso de Leciñana and Egido, 2006).

Phytoestrogens are estrogen-like molecules found in many plants. They have the ability to selectively bind classical estrogen receptors (ERs) to regulate gene expression mediated by estrogen response elements (Zhao et al., 2002). Phytoestrogens have been investigated intensively in recent years because of their potential protective effects against many diseases (Lephart et al., 2000). They not only bind to ERs but also exert potent antioxidant activity. It is increasingly clear that physiologically attainable doses of isoflavones, which can behave as phytoestrogens, may mimic some of the neuroprotective effects of estrogens. Some phytoestrogens exhibit some estrogen agonist-like properties (Stahl et al., 1998 and Mäkelä et al., 1995). Zhao et al., 2002 reported a significant reduction in glutamate-induced lactate dehydrogenase release and subsequently neuroprotection by phytoestrogens such as genistein, daidzein, daidzin, equol and formononetin in cultured hippocampal neurons. A high soy diet reduces stroke injury in female and male rats, and the soy isoflavone genistein is neuroprotective in a mouse cerebral ischemia model (Donzelli et al., 2010). Moreover, dietary intake of phytoestrogens can improve outcomes after focal (Lovekamp-Swan et al., 2007; Burguete et al., 2006) and global ischemia in rats (Liang et al., 2008). However, the mechanisms underlying protection from ischemic injury remain unclear (Schreihofer and Redmond, 2009).

Among the hundreds of molecules that fall under this classification, the coumestan phytoestrogen coumestrol (derived from sprouting plants like alfalfa), has gained prominence

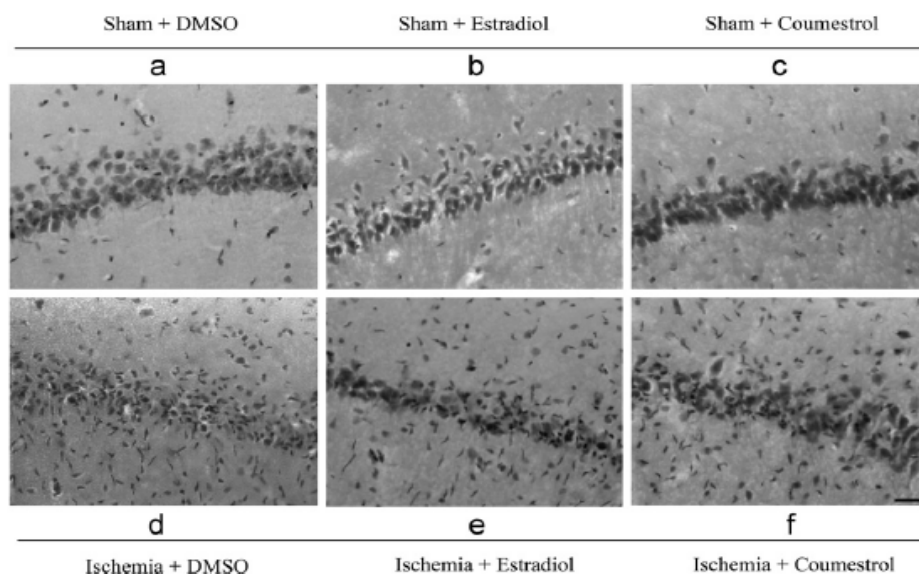


Fig. 1 – Photomicrographs (40X) of the hippocampal CA1 region of female rats with or without 10-min global ischemia 7 day after reperfusion. Rats that underwent global ischemia had significantly fewer surviving neurons than the sham-operated groups ($p < 0.01$). Estradiol and Coumestrol treatment afforded robust neuroprotection. Scale bar = 100 μ m.

because it is the most potent isoflavonoid, with binding affinities for both ER- α and ER- β that are comparable to those of 17 β -estradiol (Whitten et al., 2002). As ERs are expressed in several regions of the brain that are vulnerable to ischemia-induced neuronal death, we sought to determine whether the coumestrol has neuroprotective actions in CA1 hippocampal cells and whether its effects are mediated through classical ERs. If so, it could be a potential therapeutic treatment for global brain ischemia.

2. Results

Ovariectomized female rats were subjected to global ischemia or sham operation and recovered from an icv infusion of estradiol, coumestrol in vehicle or vehicle alone in different times. Global ischemia induced extensive death of pyramidal cells in the CA1 subfield of hippocampus accessed at 7 day post-ischemia ($p < 0.01$ vs. sham) (Fig. 1d). Estradiol did not detectably alter the appearance or number of CA1 neurons in sham-operated rats (Fig. 1b), but greatly reduced the ischemia-induced neuronal loss ($p < 0.01$ vs. ischemia), (Fig. 1e). As expected, coumestrol did not detectably alter the appearance or number of CA1 neurons in sham-operated rats (Fig. 1c), and also greatly reduced the ischemia-induced neuronal loss ($p < 0.01$ vs. ischemia) (Fig. 1f). There were no significant difference between the estradiol and coumestrol groups at 1 h before, 0 h, 3 h and 6 h after ischemia-induced neuronal loss, but at 24 h, the statistical analysis detected a significant difference between these two groups ($p < 0.01$ vs. ischemia) (Fig. 2), providing a clear evidence of neuroprotection promoted by coumestrol. The ER antagonist ICI 182,780, when administered at 0 h after surgery, did not detectably alter the number or appearance of surviving neurons in sham-operated rats or vehicle-treated animals subjected to ischemia, but totally abrogated the neuroprotective action of estradiol in the hippocampal CA1 layer ($p < 0.01$ vs. estradiol alone) and partially blocked the neuroprotection afforded by coumestrol at 0 h post-ischemia ($p < 0.01$ vs. coumestrol alone). Moreover, the statistical comparison showed a significant difference between the ischemic groups coumestrol and estradiol ($p < 0.01$) indicating that whereas the antagonist ICI 182,780 reverses the estradiol neuroprotection, it was not totally able to reverse the neuroprotective actions of coumestrol, thus providing strong evidence that this compound is more effective in promoting neuronal survival than estradiol itself (Fig. 3). To access if coumestrol administration could be neuroprotective when administered peripherally as well we injected a single dose of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intracardiacly one hour before the global ischemia. The peripheral administration of coumestrol strongly prevented the delayed neuronal death after global ischemia (Fig. 4). Global ischemia induced extensive death of pyramidal cells in the CA1 subfield of hippocampus accessed at 7 day post-ischemia ($p < 0.01$ vs. sham) (Fig. 5). We did not detect any changes in the number of cells in the CA1 subfield in sham-operated rats in comparison with the coumestrol sham-operated rats (Fig. 4). The statistical comparison showed a significant difference between the ischemic group and coumestrol ($p < 0.01$) indicating that

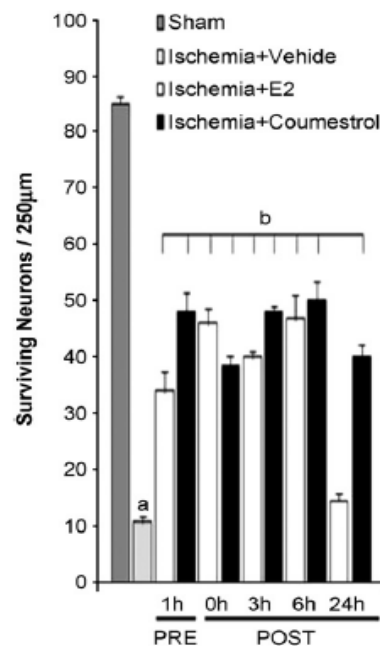


Fig. 2 – Effect of the treatment of coumestrol and estradiol in different times of administration. Ovariectomized female rats were subjected to global ischemia (10 min) or sham surgery and received a single icv infusion of 20 μg of coumestrol or 20 μg of estradiol or vehicle 1 h before ischemia or 0 h, 3 h, 6 h and 24 h after reperfusion. The ischemic groups had less surviving neurons in comparison with the sham groups. Estradiol and coumestrol afforded significant neuroprotection in all times of administration, with the exception of estradiol in 24 h after the ischemic insult. (a) Difference between ischemic and sham groups; (b) difference between ischemic treated groups and vehicle, with the exception of estradiol in 24 h after ischemia. Each bar represents the mean \pm standard error of the mean (SEM). ANOVA followed by Duncan's test, $p < 0.01$.

coumestrol was able to afford robust neuroprotection in the ischemic rats ($p < 0.01$ vs. ischemia) (Fig. 5).

3. Discussion

Estradiol and estrogen-like compounds are powerful neuroprotective agents against numerous in vivo and in vitro apoptotic stimuli including experimental stroke (Hurn and Brass, 2003; McCullough and Hurn, 2003; Alonso de Leciana and Egidio, 2006; Gibson et al., 2006). However, the precise mechanisms underlying these protective effects are still under investigation.

It is now well established in the literature that endogenous and exogenous estrogens exert profound neuroprotective effects in animal models of focal and global ischemia and produce their cellular actions by binding the classical estrogens receptors. Thus, estrogens hold great promise as

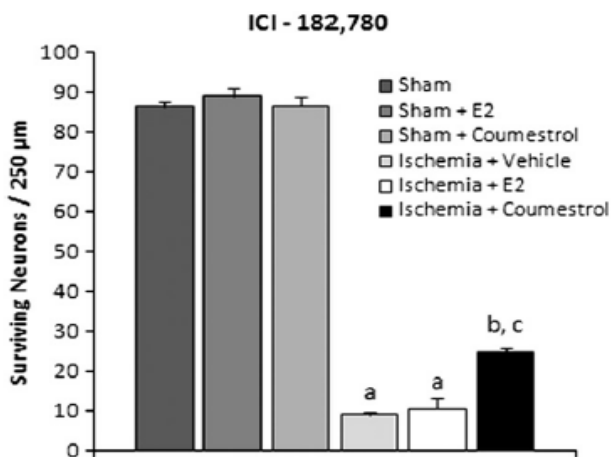


Fig. 3 – Effect of the ER antagonist ICI 182,780 treatment 0 h after ischemia. All groups were treated with estradiol or coumestrol (20 μg icv) and undergone to ischemia or sham surgery. The ER antagonist ICI 182,780 treatment fully abolished the neuroprotection promoted by estradiol but partially abrogated the coumestrol neuroprotection effect. Treatment with the ER antagonist did not affect the number of surviving neurons in any of the other treatment groups; therefore, for the statistical analysis, sham-operated vehicle and ICI 182,780 treated groups were combined. (a) Difference between sham and ischemic groups; (b) difference between the ischemic treated coumestrol and vehicle groups; (c) difference between the ischemic coumestrol and estradiol treated groups. Each bar represents the mean ± standard error of the mean (SEM). ANOVA followed by Duncan's test, $p < 0.01$.

potential therapeutic agents in treatment of ischemia (Etgen et al., 2010). Along with phytoestrogens, the coumestan coumestrol, which is present in sprout of soybeans, clover and alfalfa, is another significant phytoestrogens regularly consumed by humans (Belcher and Zsarnovszky, 2001). This compound is known to be the most potent isoflavonoid, with binding affinities for both ERs that are comparable to those of 17 β-estradiol (Whitten et al., 2002).

Our results show that coumestrol, at all time of administrations, injected icv or intracardially, protected neurons against global ischemia-induced CA1 neuronal death, indicating that this compound may work against the cascade of pathological events that lead to neuronal death. Both estradiol and coumestrol were able to promote neuroprotection in a cerebral global ischemia model when administered 1 h before and 0 h, 3 h and 6 h after ischemia. However, estradiol at 24 h after the ischemic event was not effective in preventing massive neuronal death at the hippocampal layer. It is interesting to note that coumestrol, at this same time of administration, was able to prevent the neuronal death promoted by the global ischemia. There are a few reports in the literature showing treatments that are still effective when delayed 24 h after ischemia. The two most cited long term strategies to the treatment of global ischemia is hypothermia (Tooley et al., 2002; Colbourne et al., 2000; Corbett et al., 2000;

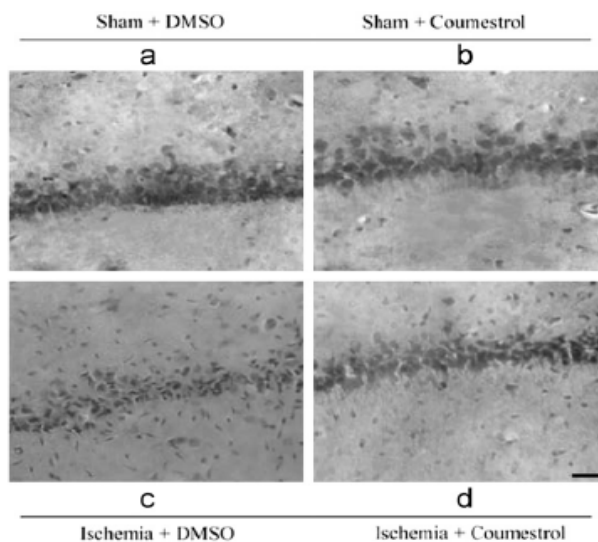


Fig. 4 – Photomicrographs (40X) of the hippocampal CA1 region of female rats with or without 10-min global ischemia 7 day after reperfusion. Rats that underwent global ischemia had significantly fewer surviving neurons than the sham-operated groups ($p < 0.01$). The peripheric pre-treatment of coumestrol strongly protected the CA1 hippocampal layer. Scale bar=100 μm.

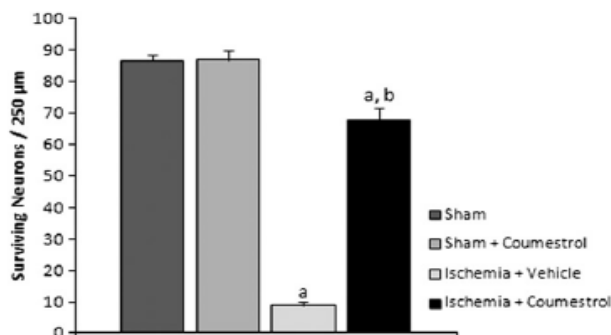


Fig. 5 – Effect of the peripheric administration of coumestrol one hour before global ischemia. Ovariectomized female rats were subjected to global ischemia (10 min) or sham surgery and received a single intracardiac infusion of 20 μg of coumestrol or vehicle 1 h before ischemia. The ischemic groups had less surviving neurons in comparison with the sham groups. Coumestrol afforded significant neuroprotection in (a) difference between ischemic and sham groups; (b) difference between ischemic vehicle group and coumestrol group. Each bar represents the mean ± standard error of the mean (SEM). ANOVA followed by Duncan's test, $p < 0.01$.

Colbourne and Corbett, 1994; Valentim et al., 2003) and preconditioning (Zhang et al., 2010; Yoshida et al., 2004; Boche et al., 2003; Dowden and Corbett, 1999). The mechanisms of coumestrol-mediated neuronal protection have not

been completely elucidated, but appear to be via both estrogen receptor and non-receptor actions.

In order to further ascertain whether coumestrol could be a tangible therapeutic strategy against global ischemia injury, we injected intracardially a single dose of 20 µg/kg of coumestrol one hour before the global ischemia. For our surprise, the peripheric administration appears to be even more neuroprotective in comparison with the icv administration (statistical analysis not shown). It is well documented that systemic administration of pharmacological doses of estradiol can be neuroprotective in global ischemia (Lebesgue et al., 2010) and in focal ischemia (Fan et al., 2003). We presume that coumestrol can reach similar brain levels as much as estradiol since both are small molecules that are highly lipophilic therefore, they cross the Blood Brain Barrier and cell membranes easily.

The mechanisms by which coumestrol is acting either icv or peripherally to afford robust neuroprotection remain unclear. Its protective effects appear to be receptor-mediated since its beneficial effect in histological parameter was partially prevented by the broad-spectrum ER antagonist ICI 162,780. ERs play a critical role in the neuroprotective effects of phytoestrogens (Schreihofer and Redmond, 2009). Coumestrol has a relative binding affinity for ER- β approximately equivalent to 17 β -estradiol (Kuiper et al., 1998). Both ERs are expressed in the rodent hippocampus but ER- β is more prevalent regulating hippocampal synaptic plasticity (Mitra et al., 2003) and improving neuronal survival. Increased ER- β immunoreactivity in the post-ischemic monkey hippocampus has also been found (Takahashi et al., 2004).

There are several lines of evidence that ER- β is involved in neuroprotection (Sawada et al., 1998). Comparison of relative binding affinities from various studies indicates that some phytoestrogens appear to have a higher affinity for ER- β than for ER- α and therefore suggests that the ER-mediated effects of phytoestrogens may be mediated through ER- β (Belcher and Zsarnovszky, 2001). However, it is still unclear which ER subtype mediates the neuroprotective efficacy of estrogen/phytoestrogen.

The icv and the peripheral administration of coumestrol in different times before and after ischemia and the partial neuroprotection abrogation by the ER antagonist indicate that the neuroprotection afforded by this compound likely involves activation of the classical ERs. However, this not rules out the possibility that other estrogen receptors or pathways of neuronal survival may play a role in coumestrol neuroprotection following ischemic insult. The partial abrogation by the antagonist suggest that it might be another alternative pathway that coumestrol is using to reach neuroprotection to CA1 than just through the ER pathway. Furthermore, some neuroprotective effects of estrogen-like compounds appear to be independent of their ability to bind ERs (Prokai and Simpkins, 2007).

Studies conducted with other phytoestrogens affording neuroprotection in models of cerebral ischemia and other neurodegenerative diseases agree with our findings (Al-Nakkash et al., 2009; Donzelli et al., 2010; Kim et al., 2009; Carswell et al., 2004). Genistein (Kindy, 1993; Donzelli et al., 2010), (-) catechin (Inanami et al., 1998), green tea extracts

rich in phytoestrogens (Hong et al., 2001) have been shown to limit brain injury in gerbil model of global cerebral ischemia. In a study conducted by Schreihofer (2005) genistein demonstrated to protect neurons from transient global ischemia injury in rat hippocampus by attenuating oxidative stress, lipid peroxidation, and the signaling cascade leading to apoptotic cell death.

Recent evidence indicates that the production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radicals, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide is increased after cerebral ischemia. Since the rates of oxidative metabolic activities are high and the antioxidants enzyme activities are low in the brain, neurons are vulnerable to ischemic events. In studies about phytoestrogen antioxidant properties, coumestrol showed a high hydrogen/electron donation via hydroxyl groups and demonstrated to have an effective antioxidant activity (Mitchell et al., 1998). It is well known that phytoestrogens, acting as antioxidants, can decrease the accumulation of ROS, thereby protecting cell membrane integrity and so promoting neuronal survival (Cai et al., 1997; Mitchell et al., 1998). However, the ROS production after the ischemic insult remains for a very short period in the cell (Thiyagarajan et al., 2004; Golden and Patel, 2009; Kleinschnitz et al., 2010) suggesting that perhaps the neuroprotection seen after 24 h or even after 6 h afforded by coumestrol administration may be not due its antioxidant properties. The mechanism, however, by which coumestrol was neuroprotective against delayed neuronal death has not been fully elucidated. Further studies are necessary to elucidate other molecular targets mediating the action of the coumestrol.

Beyond chemical antioxidant properties, other biochemical mechanisms might also play a role in neuronal survival. It is now clear that estrogens initiate rapid signaling events in neurons by binding to recognition molecules other than the classical receptors ER- α and ER- β . Recent studies reveal the existence of transmembrane receptors capable of responding to steroids with cellular activation. On such receptor, GPR30, is a member of the G protein coupled receptor superfamily and mediates transcription-dependent and independent actions of estrogens and widely expressed in the brain including hippocampus (Filardo et al., 2002; Filardo and Thomas, 2005; Prossnitz et al., 2007, 2008). Estradiol exhibits an affinity for GPR30 similar to ER- α and ER- β (Etgen et al., 2010) and its binding to GPR30 stimulates production of cAMP, mobilization of calcium and activation of growth factor signaling (Prossnitz et al., 2007, 2008; Filardo et al., 2000, 2002). There is strong evidence that GPR30 can act together with intracellular ERs to activate cell signaling pathways to promote neuronal survival after global ischemia (Lebesgue et al., 2009). Therefore this might be an alternative pathway of neuronal survival afforded by coumestrol in cerebral global ischemia. Additional studies are needed to verify the molecular mechanisms involving this receptor and its targets in neuroprotection. Determining whether ERs and/or other membrane estrogen receptors mediate estradiol and coumestrol neuroprotection following global ischemia is of great interest both for the development of therapeutic strategies and for elucidating underlying molecular mechanisms of delayed neuronal death.

In conclusion, with the present study we have demonstrated that coumestrol prevented long-term neuronal death in CA1 hippocampal layer in rats when submitted to 10 min global ischemia. Such findings suggest that this compound interferes with the early and delayed stages of neuronal damage. Furthermore, our study reports the first evidence that an acute administration of coumestrol significantly reduces the delayed neuronal cell death occurring in hippocampus of female rats following a transient global ischemic insult. The mechanisms underlying the neuroprotection exerted by coumestrol seem to involve, at least in part, estrogen receptor activation, antioxidant activity and activation of other membrane receptors that mediate estradiol neuroprotection. Additional studies are needed to determine the molecular targets mediating the neuroprotective action of coumestrol and the effects that this phytoestrogen may have on the mature nervous system.

4. Experimental procedure

4.1. Animals

Female adult Wistar rats (3 months, 170–210 g BW) were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were maintained on a 12/12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) colony room, with free access to water. This work was carried out in accordance with the EC directive 86/609/EEC for animal experiments. The study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

4.2. Surgery

Rats weighing between 150 and 250 g at time of surgery were ovariectomized (OVX) by the surgical removal of both ovaries under intraperitoneal (i.p.) ketamine anesthesia (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) to eliminate endogenous ovarian steroids (Waynforth and Flecknell, 1992).

4.3. Groups

The animals were randomized into six groups: Vehicle-treated sham and ischemic; coumestrol-treated sham and ischemic; 17 β -estradiol-treated sham and ischemic (used as positive control). For the broad-spectrum ER antagonist ICI 182,780 experiment, the same groups were used ($n=5$ animals/group).

4.4. Global ischemia

One week following the OVX surgery, rats were subjected to transient global ischemia by four vessel occlusion as previously described by Pulsinelli and Brierley (1979). Rats were deeply anesthetized under halothane (4% induction, 1% maintenance in 70% N_2O :30% O_2), and the vertebral arteries were irreversibly occluded by electrocoagulation to prevent collateral blood flow to the forebrain during the subsequent

occlusion of the common carotid arteries. A silk thread was looped around the carotid arteries to facilitate subsequent occlusion. Twenty-four hours later, the animals were anesthetized again, the wound was reopened and both carotid arteries were occluded with micro arterial clamps for 10 min. The 4 VO model were chosen because it is the most used model that resembles a human cardiac arrest where the blood supply in the brain is almost depleted. The outcomes are neurological damage, loss of memory, convulsions and coma. During clamping, the animals were awake and spontaneously ventilating. During both surgeries, rectal temperature was monitored and maintained at 36.5 – 37.5°C with a rectal thermistor and heat lamp until recovery from anesthesia. Sham operated animals were subjected to the same anesthesia and surgical procedures as animals subjected to global ischemia, except the carotid arteries were not occluded (Netto et al., 1993). Animals that failed to show complete loss of the righting reflex and pupillary dilatation (from 2 min after occlusion has initiated until the end of occlusion); animals that exhibited obvious behavioral manifestations (abnormal vocalization when handled, convulsions, hyperactivity etc.) were excluded from the experiment; and animals with loss of greater than 20% of body weight by 3–7 day after ischemia. There were 5 deaths due to respiratory arrest; 11 other rats were excluded from the study because they failed to show neurological signs of ischemia (no loss of consciousness or incomplete dilation of the pupils during occlusion).

4.5. Drugs

One hour before ischemia or 0 h, 3 h, 6 h or 24 h after ischemia animals received intracerebroventricular (icv) injections into the right lateral ventricle of 20 μg of coumestrol (Sigma) (diluted in 100% dimethylsulfoxide) (DMSO; Sigma), 20 μg of 17 β -estradiol (diluted in 0.9% saline solution containing 10% DMSO) or 50 μg of ICI 182,780 (Sigma), in a volume of 2 μl . Control animals were infused with vehicle (100% DMSO). The dose of 20 μg was chosen based on previous studies with estrogen-like compounds (Azcoitia et al., 1999; Picazo et al., 2003; Callier et al., 2001; Bryant et al., 2005; Young et al., 2000) with similar properties and actions in the central nervous system. Animals also received icv infusion of the broad-spectrum antagonist ICI 182,780 or vehicle into the lateral ventricle. The administration of 50 μg was done 10 min prior to the other drugs administration. For the peripheral administration, a dose of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of coumestrol was injected intracardially one hour before the ischemic insult. Coumestrol was diluted in 100% dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma) in a volume of 300 μl .

4.6. Intracerebroventricular and peripheral injections

In the first experiment, rats were positioned in a stereotaxic apparatus and icv injections performed under halothane anesthesia either 1 h before ischemia or 0 h, 3 h, 6 h or 24 h after ischemia. The position of the right lateral ventricle was calculated based on the position of bregma: 0.92 mm posterior to bregma, 1.2 mm lateral to bregma, 3.6 mm below the skull surface according to the atlas of Paxinos and Watson (1998) and

then coumestrol, 17 β -estradiol, the non-selective ER antagonist ICI 162,780 and/or vehicle was infused with a Hamilton syringe (Fisher scientific, Pittsburgh, PA) in a volume of 2 μ l per infusion over 2 min. The injection needle was left in place for an additional 2 min before being withdrawn. For the coumestrol peripheral administration, rats received a single dose of 20 μ g diluted in 300 μ l of 100% DMSO injected intracardially one hour before the ischemic insult.

4.7. Histological analysis and hippocampal cell counts

The impact of transient global ischemia on the survival of hippocampal CA1 pyramidal neurons was examined seven days after ischemia or sham surgery, rats were killed by transcardiac perfusion with 4% paraformaldehyde under deep anesthesia. Brains were rapidly removed. Hematoxylin–Eosine method was used to stain coronal sections of 25 μ m collected through the entire dorsal hippocampus. Digital images of every tenth section from each animal (~100 sections per brain) were captured and used to trace the outline of the CA1. Medial, middle and lateral sectors from the CA1 region of the left and right hippocampus were photographed at 40X magnification using a Nikon microscope and digital camera. As previously described by Colbourne and Corbett (1995) a microscope counting grid (250 μ m \times 250 μ m) was positioned a few cells medial from CA2 neurons (lateral sector), at the apex of the CA1 (middle sector) and the upswing of CA1 and the number of viable pyramidal neurons in this 250 μ m \times 250 μ m region of interest was counted. Viable neurons had rounded cell bodies and clearly visible nucleoli. Pyknotic and shrunken neurons were not counted. All cell counts were carried out by an investigator who was blind to the animal's treatment.

5. Statistical analysis

Statistical comparison of the number of surviving CA1 pyramidal neurons among groups was performed using a two-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test for post hoc analysis. Differences were considered significant at $p < 0.01$.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and also by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazilian Foundations.

REFERENCES

Al-Nakkash, L., Markus, B., Bowden, K., Batia, L.M., Prozialeck, W.C., Broderick, T.L., 2009. Effects of acute and 2-day genistein treatment on cardiac function and ischemic tolerance in ovariectomized rats. *Gend. Med.* 6 (3), 488–497.

Alonso de Leciana, M., Egidio, J.A., 2006. Estrogens as neuroprotectants against ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 21 (2), 48–53.

Azcoitia, I., Sierra, A., Garcia-Segura, L.M., 1999. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signaling. *J. Neurosci. Res.* 58 (6), 815–822 Dec 15.

Barrera-Ocampo, A.A., Céspedes-Rubio, A.E., Cardona-Gómez, G.P., 2008. A potential neuroprotective and synaptic plasticity mechanism induced by estradiol through PI3K/GSK3 β in cerebral ischemia. *Rev. Neurol.* 46 (1), 32–39 Jan 1–15.

Belcher, S.M., Zsarnovszky, A., 2001. Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299 (2), 408–414.

Boche, D., Cunningham, C., Gaudie, J., Perry, V.H., 2003. Transforming growth factor- β 1-mediated neuroprotection against excitotoxic injury in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23 (10), 1174–1182.

Brown, C.M., Suzuki, S., Jelks, K.A., Wise, P.M., 2009. Estradiol is a potent protective, restorative, and trophic factor after brain injury. *Semin. Reprod. Med.* 27 (3), 240–249.

Burguete, M.C., Torregrosa, G., Pérez-Asensio, F.J., Castelló-Ruiz, M., Salom, J.B., Gil, J.V., Alborch, E., 2006. Dietary phytoestrogens improve stroke outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *Eur. J. Neurosci.* 23 (3), 703–710.

Bryant, D.N., Bosch, M.A., Rønnekleiv, O.K., Dorsa, D.M., 2005. 17- β estradiol rapidly enhances extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylation in the rat brain. *Neuroscience* 133 (1), 343–352.

Cai, Q., Rahn, R.O., Zhang, R., 1997. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Lett.* 119 (1), 99–107 Oct 28.

Callier, S., Morissette, M., Grandbois, M., Pélapat, D., Di Paolo, T., 2001. Neuroprotective properties of 17 beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse* 41 (2), 131–138.

Carswell, H.V., Macrae, I.M., Gallagher, L., Harrop, E., Horsburgh, K.J., 2004. Neuroprotection by a selective estrogen receptor beta agonist in a mouse model of global ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287 (4), H1501–H1504.

Colbourne, F., Corbett, D., 1994. Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbil. *Brain Res.* 654 (2), 265–272 Aug 22.

Colbourne, F., Corbett, D., 1995. Delayed postischemic hypothermia: a six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection. *J. Neurosci.* 15 (11), 7250–7260.

Colbourne, F., Corbett, D., Zhao, Z., Yang, J., Buchan, A.M., 2000. Prolonged but delayed postischemic hypothermia: a long-term outcome study in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Cereb. Blood Flow Metab.* 20 (12), 1702–1708.

Corbett, D., Hamilton, M., Colbourne, F., 2000. Persistent neuroprotection with prolonged postischemic hypothermia in adult rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion. *Exp. Neurol.* 163 (1), 200–206.

Donnan, G.A., Fisher, M., Madeod, M., Davis, S.M., 2008. Stroke. *Lancet* 371, 1612–1623.

Donzelli, A., Braidà, D., Finardi, A., Capurro, V., Valsecchi, A.E., Colleoni, M., Sala, M., 2010. Neuroprotective effects of genistein in Mongolian gerbils: estrogen receptor- β involvement. *J. Pharmacol. Sci.* 114 (2), 158–167.

Dowden, J., Corbett, D., 1999. Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures. *Stroke* 30 (6), 1240–1246.

Etgen, A.M., Jover-Mengual, T., Suzanne Zukin, R., 2010. Neuroprotective actions of estradiol and novel estrogen analogs in ischemia: translational implications. *Front. Neuroendocrinol.* 14.

Fan, T., Yang, S.H., Johnson, E., Osteen, B., Hayes, R., Day, A.L., Simpkins, J.W., 2003. 17 beta-estradiol extends ischemic thresholds and exerts neuroprotective effects in cerebral

- subcortex against transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 993 (1–2), 10–17.
- Filardo, E.J., Thomas, P., 2005. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol. Metab.* 16 (8), 362–367.
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., Frackelton Jr., A.R., 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* 14 (10), 1649–1660.
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton Jr., A.R., Bland, K.I., 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol. Endocrinol.* 16 (1), 70–84.
- Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I., DonCarlos, L.L., 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog. Neurobiol.* 63 (1), 29–60.
- Gibson, C.L., Gray, L.J., Murphy, S.P., Bath, P.M., 2006. Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26 (9), 1103–1113.
- Gill, R., Soriano, M., Blomgren, K., Hagberg, H., Wybrecht, R., Miss, M.T., Hoefler, S., Adam, G., Niederhauser, O., Kemp, J.A., Loetscher, H., 2002. Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-induced neurodegeneration in adult and neonatal brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22 (4), 420–430.
- Golden, T.R., Patel, M., 2009. Catalytic antioxidants and neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.* 11 (3), 555–569.
- Gulinello, M., Lebesgue, D., Jover-Mengual, T., Zukin, R.S., Etgen, A.M., 2006. Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. *Horm. Behav.* 49 (2), 246–260.
- Hong, J.T., Ryu, S.R., Kim, H.J., Lee, J.K., Lee, S.H., Yun, Y.P., Lee, B.M., Kim, P.Y., 2001. Protective effect of green tea extract on ischemia/reperfusion-induced brain injury in Mongolian gerbils. *Brain Res.* 888 (1), 11–18 Jan 5.
- Hurn, P.D., Brass, L.M., 2003. Estrogen and stroke: a balanced analysis. *Stroke* 34 (2), 338–341.
- Inanami, O., Watanabe, Y., Syuto, B., Nakano, M., Tsuji, M., Kuwabara, M., 1998. Oral administration of (-) catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil. *Free. Radic. Res.* 29 (4), 359–365.
- Jover-Mengual, T., Miyawaki, T., Latuszek, A., Alborch, E., Zukin, R.S., Etgen, A.M., 2010. Acute estradiol protects CA1 neurons from ischemia-induced apoptotic cell death via the PI3K/Akt pathway. *Brain Res.* 19 (1321), 1–12.
- Kim, J.W., Jin, Y.C., Kim, Y.M., Rhie, S., Kim, H.J., Seo, H.G., Lee, J.H., Ha, Y.L., Chang, K.C., 2009. Daidzein administration in vivo reduces myocardial injury in a rat ischemia/reperfusion model by inhibiting NF-kappaB activation. *Life Sci.* 84 (7–8), 227–234 Feb 13.
- Kindy, M.S., 1993. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents delayed neuronal death following cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*
- Kleinschnitz, C., Grund, H., Wingler, K., Armitage, M.E., Jones, E., Mittal, M., Barit, D., Schwarz, T., Geis, C., Kraft, P., Barthel, K., Schuhmann, M.K., Herrmann, A.M., Meuth, S.G., Stoll, G., Meurer, S., Schrewe, A., Becker, L., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Klopstock, T., de Angelis, M.H., Jandeleit-Dahm, K., Shah, A.M., Weissmann, N., Schmidt, H.H.H.W., 2010. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol.* 8 (9), e1000479.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139 (10), 4252–4263.
- Lakhan, S.E., Kirchgessner, A., Hofer, M., 2009. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J. Trans. Med.*, 7–97.
- Lebesgue, D., Chevalere, V., Zukin, R.S., Etgen, A.M., 2009. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids* 74 (7), 555–561.
- Lebesgue, D., Traub, M., De Butte-Smith, M., Chen, C., Zukin, R.S., Kelly, M.J., Etgen, A.M., 2010. Acute administration of non-classical estrogen receptor agonists attenuates ischemia-induced hippocampal neuron loss in middle-aged female rats. *PLoS One* 5 (1), e8642.
- Lewis, D.K., Johnson, A.B., Stohlgren, S., Hams, A., Sohrabji, F., 2008. Effects of estrogen receptor agonists on regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. *J. Neuroimmunol.* 195 (1–2), 47–59 Mar.
- Lephart, E.D., Thompson, J.M., Setchell, K.D., Adlercreutz, H., Weber, K.S., 2000. Phytoestrogens decrease brain calcium-binding proteins but do not alter hypothalamic androgen metabolizing enzymes in adult male rats. *Brain Res.* 859 (1), 123–131 Mar 17.
- Liang, H.W., Qiu, S.F., Shen, J., Sun, L.N., Wang, J.Y., Bruce, L.C., Xia, Q., 2008. Genistein attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 438 (1), 116–120 Jun 13.
- Lo, E.H., Dalkara, T., Moskowitz, M.A., 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (5), 399–415.
- Lovekamp-Swan, T., Glendenning, M., Schreihof, D.A., 2007. A high soy diet reduces programmed cell death and enhances bcl-xL expression in experimental stroke. *Neuroscience* 148 (3), 644–652 Sep 7.
- Mäkelä, S., Santti, R., Salo, L., McLachlan, J.A., 1995. Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ. Health Perspect.* (7), 123–127 Oct;103.
- Merchenthaler, I., Dellovade, T.L., Shughrue, P.J., 2003. Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1007, 89–100.
- McCullough, L.D., Hurn, P.D., 2003. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends Endocrinol. Metab.* 14 (5), 228–235.
- Miller, N.R., Jover, T., Cohen, H.W., Zukin, R.S., Etgen, A.M., 2005. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. *Endocrinology* 146 (7), 3070–3079.
- Mitchell, J.H., Gardner, P.T., McPhail, D.B., Morrice, P.C., Collins, A.R., Duthie, G.G., 1998. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 360 (1), 142–148 Dec 1.
- Mitra, S.W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H.A., Hayashi, S., Pfaff, D.W., Ogawa, S., Rohrer, S.P., Schaeffer, J.M., McEwen, B.S., Alves, S.E., 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144 (5), 2055–2067.
- Moskowitz, A., Chan, Y.F., Bruns, J., Levine, S.R., 2010. Emergency physician and stroke specialist beliefs and expectations regarding telestroke. *Stroke* 41 (4), 805–809 Epub 2010 Feb 18.
- Netto, C.A., Hodges, H., Sinden, J.D., Le Peillet, E., Kershaw, T., Sowinski, P., Meldrum, B.S., Gray, J.A., 1993. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. *Neuroscience* 54 (1), 69–92.
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10 (3), 267–272.
- Paxinos, G., Watson, W.C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Picazo, O., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., 2003. Neuroprotective and neurotoxic effects of estrogens. *Brain Res.* 990 (1–2), 20–27 Nov 14.

- Prokai, L., Simpkins, J.W., 2007. Structure-nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. *Pharmacol. Ther.* 114 (1), 1–12.
- Prossnitz, E.R., Oprea, T.I., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., 2008. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 109 (3–5), 350–353.
- Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B., Sklar, L.A., 2007. GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265 (266), 138–142 Epub 2007 Jan 11.
- Raval, A.P., Saul, I., Dave, K.R., DeFazio, R.A., Perez-Pinzon, M.A., Bramlett, H., 2009. Pretreatment with a single estradiol-17 beta bolus activates cyclic-AMP response element binding protein and protects CA1 neurons against global cerebral ischemia. *Neuroscience* 160 (2), 307–318 May 5.
- Sawada, H., Ibi, M., Kihara, T., Urushitani, M., Akaike, A., Shimohama, S., 1998. Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J. Neurosci. Res.* 54 (5), 707–719 Dec 1.
- Schreihöfer, D.A., 2005. Transcriptional regulation by phytoestrogens in neuronal cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 231 (1–2), 13–22 Feb 28.
- Schreihöfer, D.A., Redmond, L., 2009. Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury in vitro. *Neuroscience* 158 (2), 602–609 Jan 23.
- Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., 2003. Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury. *Neuroscience* 116 (3), 851–861.
- Simpkins, J.W., Dykens, J.A., 2008. Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain. Res. Rev.* 57 (2), 421–430.
- Stahl, S., Chun, T.Y., Gray, W.G., 1998. Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152 (1), 41–48.
- Strom, J.O., Theodorsson, A., Theodorsson, E., 2009. Dose-related neuroprotective versus neurodamaging effects of estrogens in rat cerebral ischemia: a systematic analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29 (8), 1359–1372.
- Suzuki, S., Brown, C.M., Wise, P.M., 2009. Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front. Neuroendocrinol.* 30 (2), 201–211.
- Takahashi, N., Tonchev, A.B., Koike, K., Murakami, K., Yamada, K., Yamashima, T., Inoue, M., 2004. Expression of estrogen receptor-beta in the posts ischemic monkey hippocampus. *Neurosci. Lett.* 369 (1), 9–13 Oct 7.
- Thiyagarajan, M., Kaul, C.L., Sharma, S.S., 2004. Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxynitrite decomposition catalysts in focal cerebral ischemia in rats. *Br. J. Pharmacol.* 142 (5), 899–911.
- Tanaka, S., Uehara, T., Nomura, Y., 2000. Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* 275 (14), 10388–10393 Apr 7.
- Tooley, J., Satas, S., Eagle, R., Silver, I.A., Thoresen, M., 2002. Significant selective head cooling can be maintained long-term after global hypoxia ischemia in newborn piglets. *Pediatrics* 109 (4), 643–649.
- Toran-Allerand, C.D., 2004. Estrogen and the brain: beyond ER-alpha and ER-beta. *Exp. Gerontol.* 39 (11–12), 1579–1586.
- Toung, T.K., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Sieber, F.E., 2000. Estrogen decreases infarct size after temporary focal ischemia in a genetic model of type 1 diabetes mellitus. *Stroke* 31 (11), 2701–2706.
- Valentin, L.M., Rodnight, R., Geyer, A.B., Horn, A.P., Tavares, A., Cimarosti, H., Netto, C.A., Salbego, C.G., 2003. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118 (2), 379–386.
- Waynforth and Flecknell, 1992H. Waynforth and P. Flecknell, *Experimental and Surgical Technique, The Rat* (second ed.), Academic, London (1992), pp. 276–278.
- Whitten, P.L., Patisaul, H.B., Young, L.J., 2002. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicol. Teratol.* 24 (1), 47–54 Jan-Feb.
- Yang, S.H., Liu, R., Wu, S.S., Simpkins, J.W., 2003. The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1007, 101–107.
- Yoshida, E., Atkinson, T.G., Chakravarthy, B., 2004. Neuroprotective gene expression profiles in ischemic cortical cultures preconditioned with IGF-1 or bFGF. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 131 (1–2), 33–50 Nov 24.
- Zhang, H.P., Yuan, L.B., Zhao, R.N., Tong L., Ma, R., Dong, H.L., Xiong, L., 2010. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection by attenuating ubiquitin-conjugated protein aggregation in a mouse model of transient global cerebral ischemia. *Anesth. Analg.* 111 (2), 506–514.
- Zhao, L., Chen, Q., Diaz Brinton, R., 2002. Neuroprotective and neurotrophic efficacy of phytoestrogens in cultured hippocampal neurons. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 227 (7), 509–519.

CAPÍTULO 2

*COUMESTROL TREATMENT RESCUE NA⁺/K⁺-ATPASE ACTIVITY
INHIBITION AFTER CEREBRAL GLOBAL ISCHEMIA AND AFFORDS
HISTOLOGICAL NEUROPROTECTION IN MALE RATS*

Neurochemistry International.

Submetido em 18/10/2012.

Coumestrol treatment prevents Na⁺/K⁺-ATPase inhibition and affords histological neuroprotection to male rats receiving cerebral global ischemia.

Cibele Canal Castro¹, Aline S. Pagnussat², Nathalia Moura², Maira J da Cunha¹,
Fernanda R. Machado¹, Angela T.S. Wyse¹, Anne M. Etgen³, Carlos Alexandre Netto¹.

1. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Departamento de Fisioterapia. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Department of Neuroscience. Albert Einstein College of Medicine. New York City, USA.

Corresponding author

Cibele Canal Castro

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600. 90035-003 / Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: + 55-51-3308 5568 / Fax: +55 51 3308 5540

Email: chodron@terra.com.br

Abstract

Several studies report that neuronal damage caused by cerebral global ischemia is associated with an imbalance in ionic homeostasis, and leads to delayed neuronal death of pyramidal CA1 neurons in hippocampus. Coumestrol is a potent isoflavonoid with antioxidant activities and binding affinities for both ER- α and ER- β that are comparable to those of 17 β -estradiol. In this study, we investigated the possible mechanisms underlying the neuroprotective effects of coumestrol administration in a model of global ischemia in male subjects. Wistar rats underwent to global ischemia (10 min) or sham surgery and received a single intracerebroventricular infusion of 20 μ g of coumestrol or vehicle 1 hr before ischemia or 0h, 3h, 6h or 24h after reperfusion. The data analysis revealed an extensive neuronal death in the CA1 hippocampal subfield at 7 days, and a significant decrease in the Na⁺/K⁺-ATPase activity at 1h and 24h after ischemia. Coumestrol treatment was effective in preventing neuronal loss in all times of administration as well as able to rescue the Na⁺/K⁺-ATPase activity, suggesting its potential benefits for either prevention or therapeutics use against cerebral ischemia in males.

Key words: cerebral ischemia; Na⁺/K⁺-ATPase; coumestrol; neuroprotection; hippocampus.

1. Introduction

Stroke is the third leading cause of death in industrialized countries, and the most frequent cause of permanent disability in adults worldwide (Lakhan et al., 2009). Global ischemia can be induced by cardiac arrest followed by resuscitation (Taraszewska et al., 2002), transient bilateral carotid ligation in gerbils and mice (Bubis et al., 1976; Kirino, T., 1982; Li et al., 2007), combined carotid ligation and hypoxia in rats (Smith, BR., 1984), or 4-vessel occlusion in the rat (Pulsinelli et al., 1982; Petito et al., 1998) as well as several other conditions and models (Hossmann KA, 2008). The classical lesion after 5-10 min of global ischemia is delayed neuronal death of pyramidal CA1 neurons in hippocampus after 2-3 days with sparing of CA3 and dentate gyrus neurons (Kirino, T., 1982; DeLeo et al., 1987; Petito, CK et al., 1992; Hara et al., 2007).

Several studies report that neuronal damage caused by cerebral global ischemia (CGI) is associated with an imbalance in ionic homeostasis (Siesjo BK, 1988). The Na^+/K^+ -ATPase is a transmembrane heterodimeric protein composed of α and β subunits, and has a vital player in maintaining ionic homeostasis. Blocking Na^+/K^+ activity concomitantly reduces intracellular K^+ and increases Ca^{++} and Na^+ . Excessive Ca^{++} and Na^+ influx and their intracellular accumulation are most likely to be responsible for necrotic death (Choi, DK., 1988), whereas excessive K^+ efflux and intracellular K^+ depletion may play key roles in apoptotic death (Dallaporta et al., 1998). Wyse and collaborators (2000) demonstrated that 10 min of global ischemia produce significant reductions in membrane bound Na^+/K^+ -ATPase activity (by 30%-40%) in both hippocampus and cerebral cortex, suggesting that the maintenance of

Na^+/K^+ -ATPase activity could be related to cellular neuroprotection. Additionally, the reperfusion period after ischemic insults are known to produce excessive reactive oxygen species (ROS), molecules directly involved in oxidative damage leading to cell death. After brain ischemia, the Na^+/K^+ -ATPase activity is impaired by the presence of excessive ROS generation. Therefore, antioxidant approaches may play an important role in the prevention of oxidative damage.

Considerable evidence suggests that estrogen affords neuroprotection against brain injury and neurodegenerative diseases (for review, see Wise et al., 2001; Etgen et al., 2011). Estrogen administration in ovariectomized female (Canal Castro et al., 2012; Dubal and Wise, 2001; Jover-Mengual et al., 2010) and male (Toung et al., 1998) rats reduces brain injury after focal ischemia. Estrogen receptor ER- α and ER- β are expressed in the hippocampus where they could subserve the neuroprotective actions of estradiol (McEwen B, 2002; Miller et al., 2005). Phytoestrogens are estrogen-like molecules found in many plants binding ERs. They have been investigated intensively in recent years because of their potential protective effects against many diseases (Castro et al., 2012; Lephart et al., 2000). Some phytoestrogens exhibit some estrogen agonist-like properties (Stahl et al., 1998; Makela et al., 1995). Among the hundreds of molecules that fall under this classification, the coumestan phytoestrogen coumestrol (derived from sprouting plants like alfalfa), has gained prominence because it is the most potent isoflavonoid, with binding affinities for both ER- α and ER- β that are comparable to those of 17 β -estradiol (Canal Castro et al., 2012; Whitten et al., 2002). In studies about phytoestrogen antioxidant proprieties, coumestrol showed a high hydrogen/electron donation via hydroxyl groups demonstrating to have an effective antioxidant effects (Mitchell et al., 1998). Moreover, a recent study from our laboratory revealed the neuroprotective actions of coumestrol in female rats, suggesting that this

compound could be a tangible therapeutic strategy against global ischemia injury (Canal Castro et al., 2012).

Considering the promising coumestrol neuroprotective effect in female rats, the present study was undertaken to examine whether coumestrol would afford neuroprotection in male rats receiving global ischemia, as assessed by Na^+/K^+ -ATPase activity impairment and the delayed pyramidal cell death in the hippocampus.

2. Methods

2.1. Animals

Male adult Wistar rats (3 months, 170–210 g BW) were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were maintained on a 12/12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature (22 ± 1 °C) colony room. Animals were provided with a constant supply of food and water *ad libitum*. Animal care followed the official governmental guidelines in compliance with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology and experimental protocols were conducted with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (reference: 15577). All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 80-23, revised 1978). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in each experiment.

2.2 *Global ischemia*

Rats were subjected to transient global ischemia by four vessel occlusion as previously described by Pulsinelli and Brierley (1979). Rats were deeply anesthetized under halothane (4% induction, 1% maintenance in 70% N₂:30% O₂), and the vertebral arteries were irreversibly occluded by electrocoagulation to prevent collateral blood flow to the forebrain during the subsequent occlusion of the common carotid arteries. A silk thread was looped around the carotid arteries to facilitate subsequent occlusion. Twenty-four hours later, the animals were anesthetized again, the wound was reopened and both carotid arteries were occluded with micro arterial clamps for 10 min. The 4 VO model was chosen because it is the most used model that resembles a human cardiac arrest where the blood supply to the brain is transiently depleted. The outcomes are neurological damage, loss of memory, convulsions and coma (Salazar et al., 2001; Bernard et al., 2002). During both surgeries, rectal temperature was monitored and maintained at 36.5-37.5°C with a rectal thermistor and heat lamp until recovery from anesthesia. Sham operated animals were subjected to the same anesthesia and surgical procedures as animals subjected to global ischemia, except the carotid arteries were not occluded (Netto et al., 1993). Animals that failed to show complete loss of the righting reflex and pupillary dilatation (from 2 min after occlusion was initiated until the end of occlusion); animals that exhibited obvious behavioral manifestations (abnormal vocalization when handled, convulsions, hyperactivity etc.) and animals with loss of greater than 20% of body weight by 3-7 days after ischemia were excluded from the experiment. There were 7 deaths due to respiratory arrest; 9 other rats were excluded from the study because they failed to show loss of consciousness or complete dilation of the pupils during occlusion.

2.3 Experimental Design and Drugs

The animals were randomized into four groups: Vehicle-treated sham and ischemic and coumestrol-treated sham and ischemic. The number of animals was 5 per group in both histological and biochemical experiments. One hour before or 0, 3, 6 or 24 h after ischemia animals received intracerebroventricular (icv) injections into the right lateral ventricle of 20 µg of coumestrol (Sigma) (diluted in 100% dimethylsulfoxide) (DMSO; Sigma). Control animals were infused with vehicle (100% DMSO). The dose of 20µg was selected on the basis of earlier reports, which demonstrated similar properties and actions of estradiol and coumestrol in the central nervous system (Azcoitia et al., 1999; Picazo et al., 2003; Callier et al., 2001; Bryant et al., 2005; Toung et al., 2000). Rats were positioned in a stereotaxic apparatus and icv injections were performed under halothane anesthesia either 1 h before ischemia or 0 h, 3 h, 6 h or 24 h after ischemia. The position of the right lateral ventricle was calculated based on the position of bregma: 0.92 mm posterior, 1.2 mm lateral, and 3.6 mm below the skull surface according to the atlas of (Paxinos et al., 1980) and then coumestrol or vehicle was infused with a Hamilton syringe (Fisher scientific, Pittsburgh, PA) in a volume of 2 µl per infusion over 2 min (Castro et al., 2012). The injection needle was left in place for an additional 2 min before being withdrawn.

2.4 Histological analysis and hippocampal cell counts

The impact of transient global ischemia or sham surgery on the survival of hippocampal CA1 pyramidal neurons was examined seven days after ischemia. Briefly, rats were killed by transcardiac perfusion with 4% paraformaldehyde under deep anesthesia. Brains were rapidly removed. Hematoxiline-Eosine was used to stain

coronal sections of 25 μm collected through the entire dorsal hippocampus (Castro et al., 2012). Digital images of every tenth section from each animal (~100 sections per brain) were captured and used to trace the outline of the CA1. The CA1 region of the left and right hippocampus was photographed at 40 X magnification using a Nikon microscope and digital camera. As previously described by Colbourne and Corbett (1995) a microscope counting grid (250 μm x 250 μm) was positioned a few cells medial from CA2 neurons (lateral sector), at the apex of the CA1 (middle sector) and the upswing of CA1 and the number of viable pyramidal neurons in this 250 μm x 250 μm region of interest was counted. Viable neurons had rounded cell bodies and clearly visible nucleoli. Pyknotic and shrunken neurons were not counted. All cell counts were carried out by an investigator who was blind to the animal's treatment.

2.5 Na^+, K^+ -ATPase activity assay

For determination of Na^+, K^+ -ATPase activity, the hippocampus was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA, pH 7.4. Homogenates were centrifuged at 1000 x g for 10 min at 4°C. The pellet was discarded and the supernatant was immediately separated and used for the measurements. The reaction mixture for Na^+, K^+ -ATPase activity assay contained 5 mM MgCl_2 , 80 mM NaCl, 20 mM KCl and 40 mM Tris-HCl, pH 7.4. The reaction was initiated by the addition of ATP. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1mM ouabain. Na^+, K^+ -ATPase activity was calculated by the difference between the two assays, as previously described (Wyse et al, 2000). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of (Chan et al., 1986). Specific activity of the enzyme was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein. All samples were run in duplicate.

2.6 Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford, using bovine serum albumin as standard (Bradford MM, 1976).

3. Statistical analysis

All data are presented as mean±standard error of the mean (SEM). Changes were analyzed with a two-way analysis of variance (ANOVA) and when necessary followed by Duncan post hoc analysis to determine differences from control values. All comparisons were performed using the SPSS software. In all cases, differences were considered significant if $P \leq 0.05$.

4. Results

4.1 Effects of global ischemia and coumestrol pre-treatment on Na^+ , K^+ -ATPase activity

Rats received an acute icv injection of coumestrol in vehicle or vehicle alone one hour before ischemia. At 1h and 24 h after reperfusion hippocampi were removed for Na^+ , K^+ -ATPase activity measurement. The analysis revealed a significant decrease in the enzyme activity at 1h and 24h after ischemia, and coumestrol administration was able to rescue this deleterious effect in both times of reperfusion. The 2-way ANOVA didn't detect any differences in Na^+ , K^+ -ATPase activity between sham operated groups treated with vehicle or coumestrol at either 1 or 24h after surgery, but revealed a significant effect of CGI on hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity at both time points of reperfusion ($p < 0,001$) when compared to sham operated animals 1h, $F(3,18)=14.144$) and 24h, $F(3,18)=14.257$) ($p < 0,001$) (Fig. 1, a). Additionally, the post-hoc Duncan test

analysis revealed no significant difference between sham_vehicle vs. ischemia_coumestrol groups at 1h of reperfusion, but a significant effect was detected between ischemia_vehicle x ischemia_coumestrol groups ($p < 0.001$), indicating that coumestrol treatment was able to completely restore Na^+ , K^+ -ATPase activity at this time point. At 24h, the Na^+ , K^+ -ATPase activity in the ischemia_coumestrol group was significantly higher in comparison to the ischemia control group ($p < 0.001$), demonstrating the protective effect of coumestrol against CGI induced decrease of hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity (Fig. 1, a, b and c).

4.2 Effects of coumestrol treatment on global ischemia- induced delayed pyramidal cell death in the CA1 hippocampal subfield

Male rats were subjected to global ischemia or sham operation given icv infusion of coumestrol in vehicle or vehicle alone at different times relative to ischemia induction. Global ischemia induced extensive death of pyramidal cells in the CA1 subfield of hippocampus assessed at 7 days post-ischemia ($p < 0.001$ vs. sham) (Fig. 2a). Coumestrol treatment did not detectably alter the appearance or number of CA1 neurons in sham-operated rats, indicating that coumestrol administration does not interfere with cell structure, as shown in Fig. 3A. However, coumestrol significantly reduced the ischemia-induced neuronal loss at all times of administration before or after the ischemic insult ($p < 0.001$ vs. ischemia) (Fig 2 b, c and d). The post-hoc Duncan test detected significant differences among the ischemic treated groups: between 1h before and 3h after ischemia; between 0h and 3h; and between the ischemic treated group 6h and the other groups, indicating different levels of neuroprotection in specific time points of coumestrol administration. Regarding the shape and distribution of the of the

CA1 pyramidal neurons, the histological observation demonstrated a normal shape and unvarying distribution in both sham vehicle and sham treated animals. The statistical analysis did not show significant difference between sham vehicle and sham treated animals regarding the cell counting, indicating that coumestrol administration does not interfere in the cell morphology, as shown in Fig. 3A. In the ischemic vehicle treated animals, pyramidal neurons exhibited significant shrinkage, dark staining appearance and widespread damage after 7 days (Fig. 3 B), whereas in the ischemic coumestrol treated groups, a partial cytoprotection against the global ischemia induced could be seen in all times of administration, providing evidence of its neuroprotective effects (Fig. 3C).

5. Discussion

In the current study we confirmed and extended our previous findings showing that a single intracerebroventricular injection of coumestrol can afford neuroprotection when administered either before or after cerebral global ischemia. Here we demonstrate that coumestrol treatment 1h prior or 0h, 3h, 6h and 24h promoted neuroprotection in the CA1 hippocampal region against 10 min of a global ischemic insult in male rats. Additionally, we show a significant correlation between the decrease of the Na^+ , K^+ -ATPase activity induced by 10 min of global ischemia with a significant rescue of its activity promoted by coumestrol pre administration in both 1h and 24h time points of reperfusion. Moreover, the cytoprotection seen at 24h after ischemia afforded by coumestrol, and the rescue of the Na^+ , K^+ -ATPase activity impairment promoted by the ischemic insult may be correlated, since it matches the same time point after reperfusion. These findings provide useful information about the potential application of

coumestrol in the treatment of ischemic-like injuries, suggesting a neuroprotective role of coumestrol in excitotoxicity.

To our knowledge this is the first evidence of a neuroprotective effect of coumestrol against the Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition in a cerebral model of ischemia. Na^+ , K^+ -ATPase activity is responsible for establishing the electrochemical gradient of Na^+ and K^+ ions across the plasma membrane of various cell types. In the central nervous system, Na^+ , K^+ -ATPase activity serves to maintain the resting membrane potential essential for nerve impulse generation, and acts at the hydrolysis step through which ATP supplies free energy. It is therefore conceivable that suppression of Na^+ , K^+ -ATPase activity during ischemia disturbs the energy supply, thereby aggravating the neuronal damage that characterizes this condition. During cerebral ischemia, depletion of cellular ATP and the resultant dysfunction of Na^+ , K^+ -ATPase results in a rise in the intracellular Na^+ concentration. When the intracellular Na^+ concentration is increased sufficiently, the Na^+ - Ca^{++} exchange carrier reverses its resting mode of operation, which leads to an increase in intracellular Ca^{++} concentration. A marked influx of Ca^{++} into neurons during ischemia has been shown to provoke catastrophic events, leading to irreversible neuronal injury (Chen et al., 2008; Hansen AJ, 1985; Mitani et al., 1994). Maintenance of this enzymatic activity is considered essential for preservation of neuronal function during ischemia/reperfusion injury in mouse brain.

In this study we hypothesized that coumestrol administration would prevent both CA1 delayed neuronal death and Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition against a global insult of ischemia, based on our previous studies where coumestrol prevented long-term neuronal death in CA1 hippocampal layer in female rats when submitted to 10 min global ischemia (Castro et al., 2012). In agreement with previous studies, where a

cerebral global ischemia induced an impairment in the Na^+ , K^+ -ATPase activity (Wyse et al., 2000; Kwon et al., 2003; Zhan et al., 2011), our results have shown a significant impairment in the enzyme activity in both times after reperfusion, and that coumestrol administration was able to completely prevent the impairment at 1h, and partially rescue its activity at 24h after reperfusion. These findings support strong evidence on the neuroprotective effects of coumestrol against the Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition induced by ischemia. It is well known that phytoestrogens, acting as antioxidants, can decrease the accumulation of ROS, thereby protecting cell membrane integrity and so promoting neuronal survival (Cai et al., 1997; Mitchell et al., 1998). In addition, previous studies have demonstrated the antioxidant properties of coumestrol (Gelinas & Martinoli, 2002; Jin et al., 2012), and its neuroprotective effects against excitotoxic events (Liu et al., 2011; Gelinas & Martinoli, 2002). In line with this view, strong evidences allow us to suggest a possible coumestrol's involvement in preserving the Na^+ , K^+ -ATPase activity integrity through its antioxidant mechanisms. Thus, being coumestrol a potent antioxidant, we could infer that its treatment is somehow preventing ROS generation, thereby contributing to the plasmatic membrane maintenance and to the Na^+ , K^+ -ATPase activity integrity. Further studies are needed to dissect the exact mechanism by which coumestrol is acting to promote the Na^+ , K^+ -ATPase activity reestablishment.

It is well established that transient global ischemia causes selective delayed neuronal death in the hippocampal CA1 subfield. Histological evidence of degeneration is not observed until 2-3 day after ischemia, which suggests a critical role for transcriptional changes activating specific apoptotic pathways. Thus, estrogen receptors (ERs), which are ligand-activated transcription factors, might mediate neuroprotection by directly regulating intracellular signaling of pro- and anti-apoptotic molecules

(Lebesgue et al., 2009; Etgen et al., 2011). In addition, the neuroprotective effects of estrogens have been demonstrated in a variety of models of acute and chronic cerebral ischemia. Estrogen-induced neuroprotection has been demonstrated in adult female (Cimarosti et al., 2005; Jover-Mengual et al., 2010; Etgen et al., 2011) as well as in males rats (Hawk et al., 1998; Toung et al., 1998) and gerbils (Jover et al., 2002). The therapeutic window of estrogens lasts up to 3h after insult (Yang et al., 2000) and this therapeutic window can be extended to up to 6h after ischemic insult in a dose-dependent manner (Yang et al., 2003). Some phytoestrogens exhibit some estrogen agonist-like properties (Stahl et al., 1998 & Makela et al., 1995). Along with phytoestrogens, coumestrol is known to be the most potent isoflavonoid, with binding affinities for both ERs that are comparable to those of 17 β -estradiol (Whitten et al., 2002). In the present study, we observed that the global ischemia caused marked and delayed neuronal cell death in the hippocampal CA1 region 7 days after reperfusion region in agreement with other studies (Pulsinelli et al., 1982; Hagan and Beaughard, 1990; Hartman et al., 2005; Etgen et al., 2011). Coumestrol administration was found to reduce delayed neuronal cell death as measured by HE staining, promoting more viable neurons in the ischemic treated animals in all times of administrations, including 24h post ischemia. This long post-event efficacy of coumestrol is promising, considering the therapeutic window for estrogen neuroprotection don't reach longer than 6h after ischemia. Moreover, since our previous study demonstrated that coumestrol was able to afford neuroprotection 24h after global ischemia in female rats, it is reasonable to suggest that coumestrol has a longer therapeutic window than the 6h window seeing in estrogens therapy, and could be a tangible long-term therapeutic strategy against global ischemia injury.

As mentioned before, the histological analysis revealed an attenuation of neuronal loss promoted by coumestrol administration in all times after reperfusion. However, we observed an uneven level of surviving neurons among the ischemic treated groups, as disclosed by the post-hoc Duncan statistical analysis. Despite the statistical analysis been significative at 6h, we observed a significant decrease of survival neurons at this time point. It is worth to mention that in our previous study with females this decrease was not observed at this time point (Castro et al., 2012), considering that the same protocol of experiments was followed. One of our hypotheses to explain this result is that coumestrol could be acting through intracellular signaling cascades, which are activated after ischemia at this specific time of reperfusion in males, but not in females, resulting in cell death.

It is well settled in the literature that the caspase -3 activation triggers neuronal death by cleaving nuclear and cytosolic proteins, including poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). Key evidence in establishing PARP-1 activation as a major cytotoxic mechanism has accumulated from exclusively male animals with targeted deletions of PARP (PARP_{-/-}). In each case, these knockouts are resistant to brain injury from focal and global cerebral ischemic insults (Dawson et al, 1996; Eliasson et al, 1997; Endres et al, 1997; Samdani et al, 1997; Hagberg et al., 2004). The cleavage of PARP-1 by caspases activated early in apoptosis provides one of the most recognizable observations of the role in cell death (Dawson & Dawson, 2004). In 2002, Jover and collaborators published a study demonstrating that global ischemia induced a marked increase in expression of activated caspase-3 in male gerbils 6h after global ischemia, and the estrogen administration was able to abolish the apoptotic cascade that leads to cell death. Accordingly, Bagetta and colleagues (2004) in a experiment involving male

rats observed an increase of cytochrome c (cyt-c) levels (which triggers caspase-3 activation and leads to apoptosis through PARP-1 activation) in hippocampus induced by cerebral global ischemia at this same time of reperfusion, and the estrogen administration one hour before the ischemic insult abrogated this effect.

Coumestrol is a potent phytoestrogen with binding affinities for both estrogen receptors α and β that are comparable to those of estradiol. Although the structural similarity of both compounds being evident, we cannot expect suchlike actions, since physiological parameters involved cerebral ischemia are complex. Because we didn't perform any experiments relative the intracellular mechanisms regarding coumestrol actions against cell death, we shall not strongly suggest any role of coumestrol at this parameters. However, we feel comfortable, based on the studies mentioned above, to come up with some possible explanations for the intriguing decrease of cell survival observed at 6h in our results. Therefore, considering that estrogen therapy was able to minimize cell death by interfering in the caspase-3 signaling at 6h after reperfusion in the studies mentioned above, and coumestrol not, we presume that coumestrol mechanism to afford neuroprotection is other than the estrogens mechanisms. Moreover, since 6h is the time point activation of caspase-3 that leads PARP-1 cleavage triggering subsequent apoptotic neuronal death, and considering that it matches with the same time point of coumestrol inability to promote neuroprotection, it seems to us that its actions could be through caspase-3 pathway, implying a possible role of coumestrol in apoptotic cell death regulation in males. These evidences taken together suggest that the differences that exist between male and female brain after exposure to ischemic injury may respond the decrease of surviving cells seen in ischemic treated males at 6h of reperfusion. The published data about sex-related differences in cerebral ischemia

and PARP-1 activation corroborates with our above hypothesis that coumestrol may interfere in the PARP-1 pathway and it is influenced by gender. Thus, these collective data encourage us to proceed with further investigations regarding the intracellular mechanisms by which coumestrol affords neuroprotection in global ischemia. The apoptotic signaling involving caspase-3 pathway and subsequent PARP-1 activation seems a promising target for future studies involving coumestrol treatment against ischemic insults.

6. Conclusions

The present study demonstrated the neuroprotective actions of coumestrol against a cerebral global ischemia induced in male rats. The histological neuroprotection and the Na⁺, K⁺ -ATPase activity reestablishment promoted by its treatment provides substantial support that coumestrol interferes against the excitotoxic events followed by global ischemia in a long-term window, suggesting its role as a possible therapeutic agent against stroke. Additional research is needed to determine the molecular targets mediating the neuroprotective action of coumestrol and the therapeutic potential in the mature nervous system.

7. Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and also by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazilian Foundations.

8. References

Azcoitia, I., Sierra, A., Garcia-Segura, L.M., 1999. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling. *J Neurosci Res* 58, 815-822.

Bagetta, G., Chiappetta, O., Amantea, D., Iannone, M., Rotiroti, D., Costa, A., Nappi, G., Corasaniti, M.T., 2004. Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat. *Neurosci Lett* 368, 87-91.

Bernard, S.A., Gray, T.W., Buist, M.D., Jones, B.M., Silvester, W., Gutteridge, G., Smith, K., 2002. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 346, 557-563.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Bryant, D.N., Bosch, M.A., Ronnekleiv, O.K., Dorsa, D.M., 2005. 17-Beta estradiol rapidly enhances extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylation in the rat brain. *Neuroscience* 133, 343-352.

Bubis, J.J., Fujimoto, T., Ito, U., Mrsulja, B.J., Spatz, M., Klatzo, I., 1976. Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. v. Ultrastructural changes in H3 sector of the hippocampus. *Acta Neuropathol* 36, 285-294.

Cai, Q., Rahn, R.O., Zhang, R., 1997. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Lett* 119, 99-107.

Callier, S., Morissette, M., Grandbois, M., Pelaprat, D., Di Paolo, T., 2001. Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse* 41, 131-138.

Canal Castro, C., Pagnussat, A.S., Orlandi, L., Worm, P., Moura, N., Etgen, A.M., Alexandre Netto, C., 2012. Coumestrol has neuroprotective effects before and after global cerebral ischemia in female rats. *Brain Res* 1474, 82-90.

Chen, X., Kintner, D.B., Luo, J., Baba, A., Matsuda, T., Sun, D., 2008. Endoplasmic reticulum Ca^{2+} dysregulation and endoplasmic reticulum stress following in vitro neuronal ischemia: role of Na^{+} - K^{+} - Cl^{-} cotransporter. *J Neurochem* 106, 1563-1576.

Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.

Dallaporta, B., Hirsch, T., Susin, S.A., Zamzami, N., Larochette, N., Brenner, C., Marzo, I., Kroemer, G., 1998. Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *J Immunol* 160, 5605-5615.

Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2004. Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 36, 287-294.

Dawson, V.L., Kizushi, V.M., Huang, P.L., Snyder, S.H., Dawson, T.M., 1996. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 16, 2479-2487.

de Souza Wyse, A.T., Streck, E.L., Worm, P., Wajner, A., Ritter, F., Netto, C.A., 2000. Preconditioning prevents the inhibition of Na^{+} , K^{+} -ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* 25, 971-975.

DeLeo, J., Toth, L., Schubert, P., Rudolphi, K., Kreutzberg, G.W., 1987. Ischemia-induced neuronal cell death, calcium accumulation, and glial response in the hippocampus of the Mongolian gerbil and protection by propentofylline (HWA 285). *J Cereb Blood Flow Metab* 7, 745-751.

Dubal, D.B., Wise, P.M., 2001. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats. *Endocrinology* 142, 43-48.

Eliasson, M.J., Sampei, K., Mandir, A.S., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z.Q., Dawson, T.M., Snyder, S.H., Dawson, V.L., 1997. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 3, 1089-1095.

Endres, M., Wang, Z.Q., Namura, S., Waeber, C., Moskowitz, M.A., 1997. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* 17, 1143-1151.

Etgen, A.M., Jover-Mengual, T., Zukin, R.S., 2011. Neuroprotective actions of estradiol and novel estrogen analogs in ischemia: translational implications. *Front Neuroendocrinol* 32, 336-352.

Gelinas, S., Martinoli, M.G., 2002. Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* 70, 90-96.

Hagan, J.J., Beaughard, M., 1990. The effects of forebrain ischaemia on spatial learning. *Behav Brain Res* 41, 151-160.

Hagberg, H., Wilson, M.A., Matsushita, H., Zhu, C., Lange, M., Gustavsson, M., Poitras, M.F., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Northington, F., Johnston, M.V., 2004. PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. *J Neurochem* 90, 1068-1075.

Hansen, A.J., 1985. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65, 101-148.

Hara, K., Yasuhara, T., Matsukawa, N., Maki, M., Masuda, T., Yu, G., Xu, L., Tambrallo, L., Rodriguez, N.A., Stern, D.M., Kawase, T., Yamashima, T., Buccafusco, J.J., Hess, D.C., Borlongan, C.V., 2007. Hippocampal CA1 cell loss in a non-human primate model of transient global ischemia: a pilot study. *Brain Res Bull* 74, 164-171.

Hartman, R.E., Lee, J.M., Zipfel, G.J., Wozniak, D.F., 2005. Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1043, 48-56.

Hawk, T., Zhang, Y.Q., Rajakumar, G., Day, A.L., Simpkins, J.W., 1998. Testosterone increases and estradiol decreases middle cerebral artery occlusion lesion size in male rats. *Brain Res* 796, 296-298.

Hossmann, K.A., 2008. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 55, 257-270.

Jin, S.E., Son, Y.K., Min, B.S., Jung, H.A., Choi, J.S., 2012. Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots. *Arch Pharm Res* 35, 823-837.

Jover-Mengual, T., Miyawaki, T., Latuszek, A., Alborch, E., Zukin, R.S., Etgen, A.M., 2010. Acute estradiol protects CA1 neurons from ischemia-induced apoptotic cell death via the PI3K/Akt pathway. *Brain Res* 1321, 1-12.

Jover, T., Tanaka, H., Calderone, A., Oguro, K., Bennett, M.V., Etgen, A.M., Zukin, R.S., 2002. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J Neurosci* 22, 2115-2124.

Kirino, T., 1982. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239, 57-69.

Kwon, H.J., Hwang, I.K., An, H.J., Han, S.H., Yang, J.I., Shin, H.S., Yoo, I.D., Kang, T.C., 2003. Changes of glial Na⁺-K⁺ ATPase (alpha 1 subunit) immunoreactivity in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Brain Res* 987, 233-239.

Lakhan, S.E., Kirchgessner, A., Hofer, M., 2009. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 7, 97.

Lebesgue, D., Chevaleyre, V., Zukin, R.S., Etgen, A.M., 2009. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids* 74, 555-561.

Lephart, E.D., Thompson, J.M., Setchell, K.D., Adlercreutz, H., Weber, K.S., 2000. Phytoestrogens decrease brain calcium-binding proteins but do not alter hypothalamic androgen metabolizing enzymes in adult male rats. *Brain Res* 859, 123-131.

Li, J., Marionneau, C., Koval, O., Zingman, L., Mohler, P.J., Nerbonne, J.M., Anderson, M.E., 2007. Calmodulin kinase II inhibition enhances ischemic preconditioning by augmenting ATP-sensitive K⁺ current. *Channels (Austin)* 1, 387-394.

Liu, M.H., Tsuang, F.Y., Sheu, S.Y., Sun, J.S., Shih, C.M., 2011. The protective effects of coumestrol against amyloid-beta peptide- and lipopolysaccharide-induced toxicity on mice astrocytes. *Neurol Res* 33, 663-672.

Makela, S., Santti, R., Salo, L., McLachlan, J.A., 1995. Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7, 123-127.

McEwen, B., 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57, 357-384.

Miller, N.R., Jover, T., Cohen, H.W., Zukin, R.S., Etgen, A.M., 2005. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. *Endocrinology* 146, 3070-3079.

Mitani, A., Takeyasu, S., Yanase, H., Nakamura, Y., Kataoka, K., 1994. Changes in intracellular Ca²⁺ and energy levels during in vitro ischemia in the gerbil hippocampal slice. *J Neurochem* 62, 626-634.

Mitchell, J.H., Gardner, P.T., McPhail, D.B., Morrice, P.C., Collins, A.R., Duthie, G.G., 1998. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch Biochem Biophys* 360, 142-148.

Netto, C.A., Hodges, H., Sinden, J.D., Le Peillet, E., Kershaw, T., Sowinski, P., Meldrum, B.S., Gray, J.A., 1993. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. *Neuroscience* 54, 69-92.

Paxinos, G., Watson, C.R., Emson, P.C., 1980. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 3, 129-149.

Petito, C.K., Olarte, J.P., Roberts, B., Nowak, T.S., Jr., Pulsinelli, W.A., 1998. Selective glial vulnerability following transient global ischemia in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 231-238.

Picazo, O., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., 2003. Neuroprotective and neurotoxic effects of estrogens. *Brain Res* 990, 20-27.

Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10, 267-272.

Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., Plum, F., 1982. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11, 491-498.

Salazar, J.J., Ramirez, A.I., de Hoz, R., Rojas, B., Trivino, A., Ramirez, J.M., 2000. [Apoptosis in ischemic optic neuropathy]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 75, 819-824.

Samdani, A.F., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 1997. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28, 1283-1288.

Siesjo, B.K., 1988. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med* 16, 954-963.

Simao, F., Matte, A., Matte, C., Soares, F.M., Wyse, A.T., Netto, C.A., Salbego, C.G., 2011. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na⁽⁺⁾K⁽⁺⁾-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. *J Nutr Biochem* 22, 921-928.

Smith, B.R., 1984. Hypoxia-enhanced reduction and covalent binding of [2-³H]misonidazole in the perfused rat liver. *Biochem Pharmacol* 33, 1379-1381.

Stahl, S., Chun, T.Y., Gray, W.G., 1998. Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 152, 41-48.

Taraszevska, A., Zelman, I.B., Ogonowska, W., Chrzanowska, H., 2002. The pattern of irreversible brain changes after cardiac arrest in humans. *Folia Neuropathol* 40, 133-141.

Toung, T.J., Traystman, R.J., Hurn, P.D., 1998. Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke* 29, 1666-1670.

Toung, T.K., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Sieber, F.E., 2000. Estrogen decreases infarct size after temporary focal ischemia in a genetic model of type 1 diabetes mellitus. *Stroke* 31, 2701-2706.

Whitten, P.L., Patisaul, H.B., Young, L.J., 2002. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicol Teratol* 24, 47-54.

Wise, P.M., Dubal, D.B., Wilson, M.E., Rau, S.W., 2000. Estradiol is a neuroprotective factor in in vivo and in vitro models of brain injury. *J Neurocytol* 29, 401-410.

Wise, P.M., Dubal, D.B., Wilson, M.E., Rau, S.W., Bottner, M., 2001. Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. *Endocrinology* 142, 969-973.

Yang, S.H., Liu, R., Wu, S.S., Simpkins, J.W., 2003. The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1007, 101-107.

Zhan, L., Peng, W., Sun, W., Xu, E., 2011. Hypoxic preconditioning induces neuroprotection against transient global ischemia in adult rats via preserving the activity of Na(+)/K(+)-ATPase. *Neurochem Int* 59, 65-72.

Legends to Figures

Figure 1 - Effect of coumestrol pre-treatment on Na⁺, K⁺-ATPase activity in the hippocampus of male rats submitted to 10 min of cerebral global ischemia. Rats received one single icv injection of coumestrol or vehicle one hour before the ischemic insult; Na⁺, K⁺-ATPase activity was measured 1h and 24h after reperfusion. a) p<0,001 vs. sham operated animals; b) p<0,001 vs. the ischemia control groups; c) p<0,001 vs. sham operated groups. Bar represents the mean ± standard error of the mean (SEM). ANOVA followed by Duncan's test.

Figure 2 - Effect of coumestrol treatment on the number of surviving neurons in the hippocampus of male rats submitted to 10 min of cerebral global ischemia. Male rats underwent to global ischemia (10 min) or sham surgery and received a single icv infusion of 20 µg of coumestrol or vehicle 1h before ischemia or 0h, 3h, 6h and 24h after reperfusion. The ischemic groups had less surviving neurons in comparison with the sham groups. Coumestrol afforded significant neuroprotection in all times of administration after global ischemia induced. (a) difference vs. sham group; (b) difference vs. sham, ischemia, 3h and 6h groups; c) difference vs. the remaining groups; d) difference vs. the remaining groups. Bar represents the mean ± standard error of the mean (SEM). ANOVA followed by Duncan's post hoc test, p<0,001.

Figure 3 - Photomicrographs (40X) of the hippocampal CA1 region of male rats with or without 10-min global ischemia 7 days after reperfusion. Animals that underwent global ischemia (B) had significantly fewer surviving neurons in comparison to the sham-operated groups (A) (p<0,001). Coumestrol treatment strongly protected the CA1 hippocampal layer in all time points of administration (C). Scale bar=100µm.

Figure 1

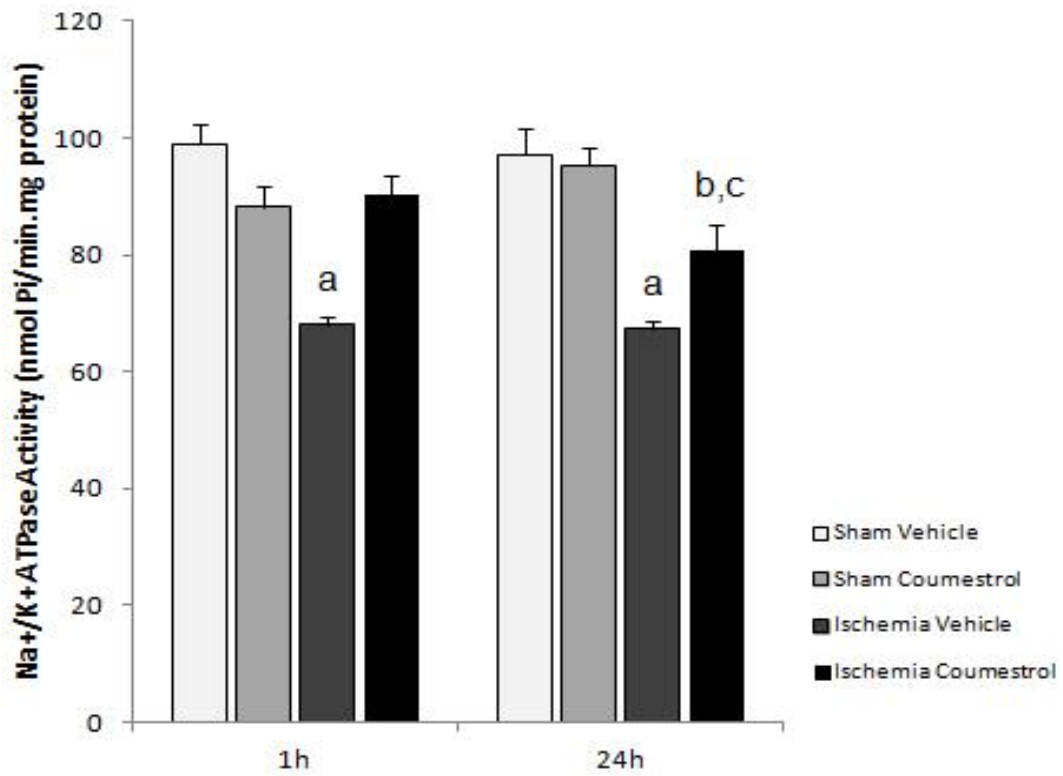


Figure 2

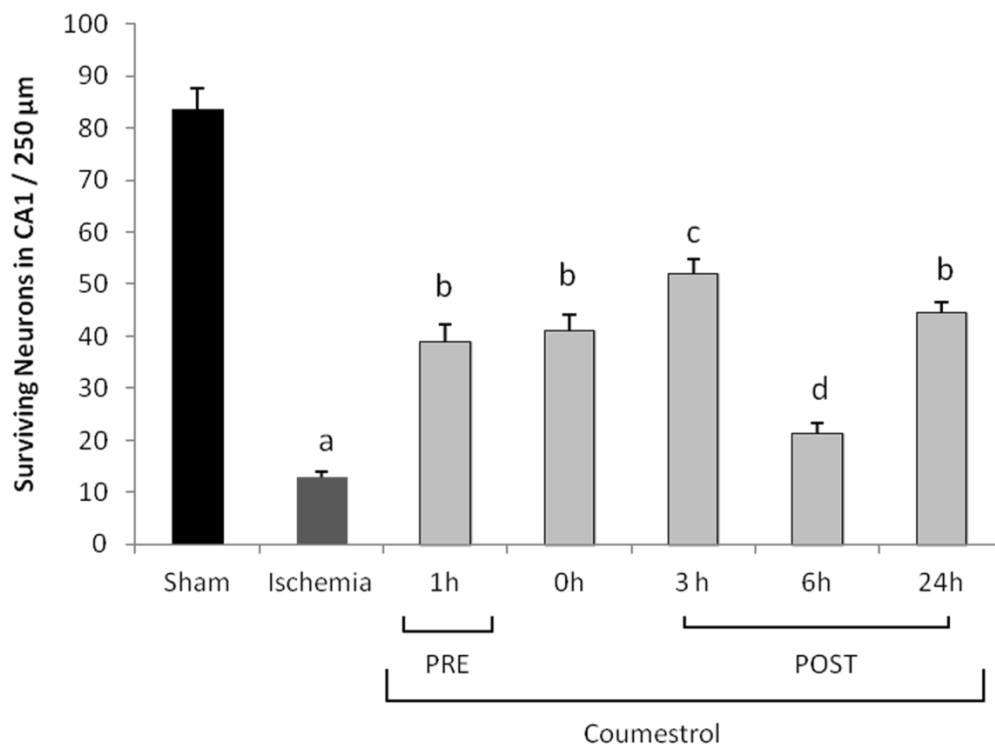
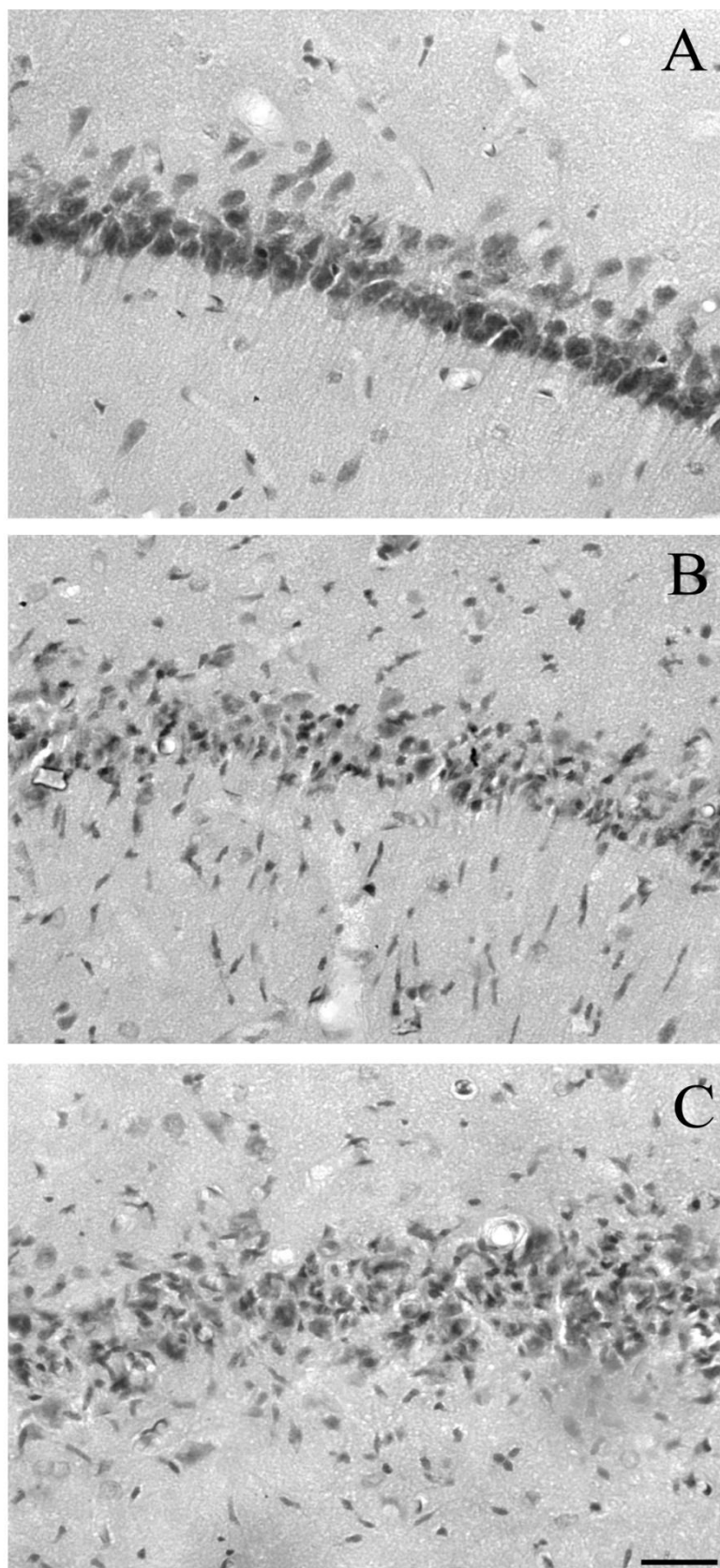


Figure 3



CAPÍTULO 3

***COUMESTROL PROTECTS AGAINST IN VIVO AND IN VITRO NMDA-
INDUCED EXCITOTOXICITY THROUGH GLUR2 ACTIVATION AND
PREVENTS MEMORY IMPAIRMENT IN MICE.***

Artigo a ser submetido à revista Hippocampus.

Coumestrol protects against *in vitro* and *in vivo* glutamatergic excitotoxicity through GluR2 activation and prevents memory impairment in mice

Cibele Canal Castro¹, George Umanah³, Aline S. Pagnussat², Senthil Kumar³, Carlos Alexandre Netto¹, Valina L. Dawson³

1. Biochemistry Department. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Physiotherapy Department. Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Neuroscience Department. Johns Hopkins University. Baltimore, MD, USA.

Corresponding author

Cibele Canal Castro

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos, 2600. 90035-003 / Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: + 55-51-3308 5568 / Fax: +55 51 3308 5540

Email: chodron@terra.com.br

Abstract

Transient global forebrain ischemia causes selective, delayed death of hippocampal CA1 pyramidal neurons. Excessive glutamate release leads to excitotoxicity and subsequent neurodegeneration, and regulation of the glutamatergic AMPA receptor GluR2 content is recognized as an important mediator of both neuronal plasticity and vulnerability to excitotoxic neuronal death. Global ischemia induces down-regulation of GluR2 mRNA and increased AMPA-induced Ca^{+2} influx in hippocampus before neurodegeneration. In this study, we investigated the neuroprotective mechanisms of coumestrol, an estrogenic compound, against ischemia-like induced excitotoxicity *in vivo* and *in vitro*, and if it could prevent memory deficits induced by global ischemia as well. Global ischemia, induced in C57BL/6 mice by 20 min of BCCAO, resulted in a significant decrease of GluR2 expression in hippocampus at 12h, 24h and 48h after reperfusion, and both coumestrol and estradiol administration were able to abolish the reduction of the GluR2 protein content at all times of administration. The exposure of hippocampal neurons to 500 μM of NMDA *in vitro* triggered a massive cell death as assessed by the microscopic analysis, and the treatment with coumestrol or estradiol significantly reduced neuronal death given either before or after the excitotoxic assay. Furthermore, in a behavior assessment, coumestrol pre treatment abrogated the memory deficits induced by the ischemic insult, indicating its involvement in improving spatial learning and memory. These collective data together suggest a potential role of coumestrol as a potent neuroprotective agent against neurodegeneration in global ischemia.

Key words: global ischemia, neuroprotection, coumestrol, GluR2, spatial memory.

1. Introduction

Cerebral global ischemia induces a selective pattern of neuronal loss in certain identifiable subsets of neurons, including CA1 pyramidal neurons in hippocampus and cortical projection neurons in layer 3 (Pulsinelli et al., 1982; Schmidt-Kastner and Freund, 1991; Wang et al., 2003). L-Glutamate, the major excitatory neurotransmitter in the brain, is known to be a great player in the pathophysiology of excitotoxic neuronal injury (Choi & Hartley, 1993; Rothstein, 1996). Excessive glutamate release leads to excitotoxicity, which has a prominent role in many disorders of the nervous system, including trauma and ischemia (Andrabi et al., 2011). AMPAR-(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid)-type glutamate receptors (AMPA_Rs) are a major subtype of glutamate receptors and are widely expressed throughout the Central Nervous System (CNS) both in neurons and glia (Belachew and Gallo, 2004; Wisden and Seeburg, 1993). They are made up of combinations of four subunits: GluR1-4 (Isaac et al., 2007) and implicated in glutamate excitotoxicity (Friedman et al., 1994; Pellegrini-Giampietro et al., 1997; Friedman, 1998). These receptor assemblies, when lacking the GluR2 subunit, are also highly permeable to Ca^{2+} (Hollmann et al., 1991; Hume et al., 1991), and considerable evidence indicates that Ca^{2+} -permeable GluR2-lacking AMPARs are related to ischemic cell death (Liu and Zukin, 2007; Noh et al., 2005; Soundarapandian et al., 2005). Several recent reports have demonstrated that cerebral global ischemia reduces both GluR2 mRNA and protein levels in CA1 hippocampal neurons (Liu and Zukin, 2007; Gorter et al., 1997; Bennet et al., 1996). This observation led to the “GluR2 hypothesis”, which postulates that reduced GluR2 expression allows Ca^{2+} entry through AMPARs channels, which, in turn, induces CA1 pyramidal cell death (Pellegrini-Giampietro et al., 1997; Tanaka et al., 2000; Oguro et al., 1999).

Thorase is a cytosolic and postsynaptic protein that colocalizes with AMPARs and interacts with GluR2. It has been recently demonstrated in a study conducted by Zhang and coworkers (2011) that Thorase overexpression decreases surface AMPARs and AMPA currents, and regulates AMPAR surface expression and internalization. In addition, the same study provided strong evidence that Thorase deficiency result in an increase in surface AMPARs and subsequently reduced endocytosis of AMPARs. Moreover, in an endogenous coimmunoprecipitation assay, GluR2 and Thorase coexisted as a complex *in vivo* and *in vitro*, and binding of Thorase to GluR2 is ATP hydrolysis sensitive. Furthermore, in a behavior assessment, they reported that Thorase knockout mice have profound effects on learning and memory, consistent with the effects of Thorase on AMPAR function (ZHANG et al., 2011).

A considerable body of work has demonstrated that the ovarian steroid hormone estrogen regulates a wide variety of nonreproductive functions in the CNS by interacting with several molecular and cellular processes. Estradiol, derived from endogenous or exogenous sources, has many enhancing effects on neuronal plasticity and behavior related to cognition and mood (Waters et al., 2009; Hajszan and MacLusky, 2006). In addition, estradiol has neuroprotective actions in models of ischemic brain injury, neurodegeneration, and aging (Jover et al., 2002; Brann et al., 2007; De Nicola et al., 2009). A growing literature reporting results obtained in rodent models suggests that 17- β -estradiol, the most potent of the biologically relevant estrogens, facilitates some forms of learning and memory, and in particular, those involving hippocampus-dependent tasks (Foy, 2010). In hippocampal neurons, estradiol acts as a neuroprotective agent *in vitro* (Friedman and Segal, 2010; Numakawa et al., 2007) and *in vivo* (Canal Castro et al., 2012; Jover et al., 2002; Lebesgue et al., 2009),

and activation of estrogen receptors (ERs – α and β) with estradiol or specific agonists has been implicated in learning and memory (Frye et al., 2007; Lebesgue et al., 2009).

Phytoestrogens are estrogen-like molecules found in many plants binding ERs. Some phytoestrogens exhibit estrogen agonist-like activities (Stahl et al., 1998; Makela et al., 1995) and have been extensively investigated in the recent years due they protective actions against many brain disorders (Castro et al., 2012; Lephart et al., 2000). Recently, the coumestan phytoestrogen coumestrol has gained place because its binding affinities for both ER- α and ER- β that are comparable to those of 17- β -estradiol (Canal Castro et al., 2012; Whitten et al., 2002). Recent studies from our laboratory revealed the neuroprotective actions of coumestrol in female and male rats, suggesting that this compound could be a tangible therapeutic strategy against global ischemia injury (Canal Castro et al., 2012).

The present study was undertaken to examine the possible role of coumestrol and estradiol at the level of GluR2 and Thorase expression in hippocampus of male mice against neuronal damage induced by global ischemia. We compared the effects of coumestrol and estradiol administration in different times of reperfusion on the GluR2 and Thorase protein levels at the same time points. In addition, being aware that excitotoxicity is one of the cellular mechanisms linked to cerebral ischemic neurodegeneration, we sought to determine if coumestrol could be neuroprotective *in vitro* as well, against a glutamatergic excitotoxicity in hippocampal neuronal culture. Also, we investigated if coumestrol administration could prevent the memory deficits induced by global ischemia in a behavior assessment. Our hypothesis is that coumestrol could be neuroprotective against neurodegeneration and a possible therapeutic agent versus excitotoxic events such as global ischemia.

2. Methods

2.1 Biochemical Analysis

2.1.1 Mice

All mice procedures were consistent with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Johns Hopkins University Animal Care and Use Committee.

2.1.2 Experimental Design and Drugs

The animals were randomized into six groups: vehicle-treated sham and ischemic, 17- β -estradiol-treated sham and ischemic and coumestrol-treated sham and ischemic. The number of animals was 4 per group. One hour before surgery, mice received intraperitoneal injections of 20 mg of coumestrol (Sigma) (diluted in 100% dimethylsulfoxide) (DMSO; Sigma), 20 mg of 17- β -estradiol (diluted in 0.9% saline solution containing 10% DMSO), used as a positive control. Sham animals were infused with vehicle (100% DMSO). The dose of 20 mg was selected on the basis of earlier reports, which demonstrated similar properties and actions of estradiol and coumestrol in the central nervous system (Canal Castro et al., 2012).

2.1.3 Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (BCCAO)

For the transient cerebral ischemia procedure, 8 week old C57BL/6 male mice weighing between 20 and 28 g were used. The animals (age: 8-12 weeks) were anesthetized with halothane (2-3% for induction, 1-1.5% for maintenance). Transient global ischemia was induced by performing bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) for 20 minutes followed by reperfusion using a curved bulldog artery clamp. The mice were kept on 37.5°C pad until they recovered from anesthesia. A consistent 70-75% decrease in blood flow was observed over the forebrain using Laser Doppler

flowmetry. The incision was sutured using a silk 5-0 suture (Ethicon,USA). Following complete recovery from anesthesia, the animals were returned to the cages and housed individually. At 12, 24 and 48 h following BCCAO, mice were sacrificed under decapitation and brain tissue was collected for biochemical analysis. The entire surgical procedure was performed except BCCAO in sham operated mice.

2.1.4 Preparation of Whole Tissue Extracts

At the specific time points (12, 24 or 48 hours after BCCAO) mice were quickly decapitated, and hippocampi were immediately dissected out and homogenized for 30 s in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and 1X protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN). Protein concentrations were determined by the BCA assay (Pierce, Rockford, IL). Protein samples were then resuspended in loading buffer (2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 0.003% bromophenol blue, and 5% 2-mercaptoethanol), incubated 15 min at 65°C, resolved on a SDS-PAGE gel, and subjected to western blot analysis.

2.1.5 SDS-PAGE and Western blot analysis

The protein extracts were size-separated through denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). For all blots, equal amounts of protein for each sample (50 µg) were loaded onto 10% polyacrylamide gels and run at 100 V using a Hoeffer model SE 600 electrophoresis unit. The proteins were then electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) in tris-glycine-methanol buffer for 2 hours at 0.3 A. The membrane was blocked for 1 hr at room temperature in PBS-T pH 7.5 (PBS 0.1% Tween-20) containing 5% nonfat dry milk. The membrane was then incubated overnight at 4 C with different primary antibodies in blocking solution: mouse anti-GLUR-2 1:1000 (NeuroMab, Davis, CA), mouse anti-Thorase 1:1000 (NeuroMab,

Davis, CA) mouse anti- β -actin 1:5000 (Sigma). The membrane was washed with blocking buffer 3×10 min and incubated for 1 hr at room temperature with the secondary goat anti-mouse 1:10000 (NeuroMab, Davis, CA). After that, membranes were washed 3×10 min with PBS-T, and then processed for chemiluminescence analysis using the Super Signal West Pico detection kit (Pierce). The films were scanned and band intensity was analyzed using Image J software (developed at the US National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>).

2.2 *In vitro* Experiments

2.2.1 Primary Neuronal Cultures

Primary neuronal cultures were prepared from gestational day (E17-E18) CD1 mouse embryos, and experiments were performed at day 14 *in vitro*. Timed pregnant mice were cervically dislocated according to NIH guidelines. Embryos were carefully removed and placed into a dissecting medium DMEM (GIBCO®) enriched with 20% of Fetal Bovine Serum (FBS). Hippocampi was dissected out and the cells dissociated by trituration in modified Eagle's medium, 20% horse serum, 25 mm glucose, and 2 mm l-glutamine, following a 10min digestion in TrypLE (Invitrogen). Tissue was then transferred to a flask containing Neurobasal Medium (GIBCO®) enriched with 2% of FBS, 1% of B-27 and 1% of L-glutamine (GIBCO®). Medium containing a density of 50,000 cells/well were plated in 12 well culture dishes, each well containing poly-l-lysine or poly ornithine coated coverglasses. Cells were left to grow in the incubator at 37 °C, 5% CO₂, for 3 days, the medium was then changed, and a mixture of 5-fluoro-2-deoxyuridine (5F2DO) (Sigma) was added to avoid glial cell proliferation. Under these conditions, neurons represent 90% of the cells in the culture. The medium was changed twice a week until the 14 day, when the excitotoxic assay was performed. On day 11,

primary neuronal cultures were transduced with Green Fluorescent Protein (GFP) through a FUGW lentiviral construct (GFP-FUGW). A pre-determined amount of concentrated lentivirus construct (5 μ l in each well, with identical amounts added to all wells) was then applied to neurons cultured *in vitro*.

2.2.2 Excitotoxic Assay

Briefly, NMDA excitotoxicity was induced by exposing primary hippocampal neurons to 500 μ M NMDA plus 10 μ M glycine in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, GIBCO®) for 5 min, and replaced with MEM, 10% horse serum, 25 mM glucose, and 2 mM L-glutamine to elicit cell death. The cultures were fixed in 4% PFA and stained 24 hrs later with 1 μ g/ml DAPI, which stain all cell nuclei, and 7 μ M propidium iodide (PI) (Invitrogen) that stains dead cell nuclei. Cell death assessment was determined as the ratio of live to dead cells compared to control. The numbers of total (DAPI) and dead (PI positive) cells were counted by automated computer assisted software (Axiovision 4.6, Zeiss, Germany). The raw counts are presented in an Excel file for generation of percent cell death and statistical analysis. Glial nuclei fluoresce at a lower intensity than neuronal nuclei and were gated out by the software program. Fluorescent photomicrographs were analyzed with Axiovision 6 software. GFP-expressing neurons with fragmented processes were excluded in the counting. The transduction with GFP was made in order to see the neurons and its connections more clearly in the photomicrographs. Coumestrol and estradiol treatment were conducted on day 14, before and after the NMDA-induced excitotoxicity. In brief, a dose of 10 μ M of both coumestrol and estradiol was added to each well 1h before or 0h, 1h, 3h and 6h after the excitotoxic insult.

2.3 Behavior Assessment

2.3.1 Animals and Surgical Procedures

Behavior experiments were performed in 60-days old CF-1 female mice obtained from the Central Animal House of the Biochemistry Department, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were maintained on a 12:12h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) colony room with food and water *ad libitum*, and kept in standard cages ($48 \times 26 \text{ cm}^2$) with five animals per cage. All experimental procedures were carried out in strict accordance with the National Institutes of Health regulations regarding the use and care for scientific purposes, and followed the guidelines of the Committee on Care and use of experimental Animal Resources, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in each experiment. Briefly, coumestrol was administered 1h before ischemia through an intraperitoneal dose of 20 mg/kg, and the transient global ischemia was induced as previously described by section 2.1.3. Animals were divided into 4 groups: sham vehicle and treated and ischemic vehicle and treated (n=9-11 per group). Sham animals underwent to the same surgical procedures, except the carotid occlusion. Four days after surgery, mice went through the behavior assessment.

2.3.2 Morris Water Maze – Reference Memory

The effect of coumestrol on spatial learning and memory in mice was determined using the Morris Water Maze test. As previously described by Muller et. al. (2010), the reference memory task was done in a circular pool (110 cm diameter) in a water temperature of $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Sham and ischemic mice were trained daily in a 4

trial water maze task for 3 consecutive days. Each trial last up to 60s and was followed by 20s of rest in a hidden black platform. During training, mice learned to escape from the water by finding a hidden platform submerged about 1cm bellow the water surface in a pre determined location. If the animal failed to find the platform in 60s, it was manually placed on the platform and allowed to rest for 20s. Each trial was separated by at least 12 min to avoid hypothermia and facilitate memory acquisition. The room where the maze apparatus was situated was supplied with visual stimuli hanging on the walls in order to provide spatial cues. Latency to find the platform during each trial was measured as an indicator of learning. A probe test without the platform was performed on the fourth day. The time spent in the target quadrant was measured as an indicator of memory retention.

3. Statistical Analysis

Data are presented as mean±standard error of the mean (SEM). Histological assessment was determined using one-way analysis of variance ANOVA. *Post hoc* Duncan test was utilized in order to analyze the differences collected at distinct time points from control values. For the water maze task and western blot data, two-way ANOVA followed by Duncan was utilized. All comparisons were performed using the SPSS software. In all cases, differences were considered significant if $p \leq 0.05$.

4. Results

4.1 Coumestrol Treatment Prevents the Post-Ischemic Decrease of GluR2 Expression in Hippocampus.

Male mice received an acute intraperitoneal injection of coumestrol or estradiol 1h before induction of ischemia, and hippocampi was removed after 12h, 24h and 48h of reperfusion for further western blot analysis. The two-way ANOVA did not detect

any differences between sham vehicle and sham treated operated groups at 12h, 24h or 48h after surgery, but revealed a significant effect of BCAA0 on hippocampal levels of GluR2 at all times of reperfusion when compared to sham operated animals: 12h, $F(5,23)=65.23$; 24h, $F(5,23)=2.93$; 48h, $F(5,23)=41.47$ ($p<0.001$) (Fig. 1B, a, b and c). Additionally, the *post hoc* Duncan analysis revealed a significant effect between ischemia vehicle and ischemia treated groups at 12h, 24h and 48h after reperfusion ($p<0.001$), (Fig. 1B, a, b and c). Further, the statistic analysis also detected significant difference between sham control groups and ischemia treated groups at 48h after ischemia ($p<0.001$). These results indicates that both coumestrol and estradiol administration were able to abolish the subsequent reduction in expression of GluR2 in hippocampus, suggesting a neuroprotective effect of both compounds against ischemia-induced GluR2 reduction.

4.2 Coumestrol Treatment Does Not Affect Thorase Expression in Hippocampus After BCAA0.

Thorase expression was evaluated by western blot analysis after BCCAO in the same specific time points examined in the GluR2 assay. The statistical analysis did not revealed significant differences between sham and ischemic groups at 12h, 24h and 48h after ischemia in Thorase expression after ischemia: 12h, $F(5,23)=1.41$; 24h, $F(5,23)=0.66$; 48h, $F(5,23)=1.20$, ($p>0.05$), and either revealed any effect of the both treatments in all times analyzed after reperfusion (Fig. 2B).

4.3 Coumestrol Treatment Provides In Vitro Neuroprotection Against NMDA-Induced Excitotoxicity.

The neuronal quantification revealed that only 12% of the adenovirus GFP-infected neurons survived the 500 μ M NMDA excitotoxicity treatment, indicating that a

massive cell death was induced by the excitotoxic assay, as confirmed by the statistical analysis $F(13,69)=327.48$, ($p<0.001$), (Fig. 3B), and by the confocal microscopy (Fig. 3A). Survival of coumestrol treated neurons was increased more than 3-fold at 1h before, 0h and 1h after NMDA treatment ($p<0.001$), (Fig. 3B), while no effect of coumestrol treatment was detected either at 3h or 6h after the excitotoxic insult, indicating that coumestrol neuroprotection *in vitro* is time-limited (Fig. 3B). In complement, estradiol treatment promoted more than 3-fold neuronal protection against NMDA-induced excitotoxicity in almost all times of administration ($p<0.001$), as confirmed by the one-way ANOVA analysis, ($p<0.001$) (Fig.3B), and by the confocal microscopy (Fig. 3A). However, after 6h from the NMDA assay, no protective effect was found under estradiol administration (Fig. 3B). These data together suggests that coumestrol and estradiol may be acting through different mechanisms regarding hippocampal neuronal survival *in vitro*, since time-specific differences related to neuroprotection were found in both two compounds treatment.

4.4 Coumestrol Treatment abrogates Memory Deficits Induced By BCCAO.

In order to address the question if coumestrol could abrogate the memory deficits induced by global ischemia, a maze task was used to evaluate spatial memory retention. Briefly, male mice were treated one hour before ischemia with 20 mg/kg of coumestrol, and 4 days after ischemia, the animals were submitted to a water maze test. The statistical analysis accused a significative difference between the sham and ischemia vehicle groups, indicating that the memory retention on the probe day was impaired in the ischemic animals in comparison with control values $F(1,34)=20.84$, ($p<0.001$) Fig. 4). No differences were detected between the sham groups, ($p>0.05$). In addition, one single dose of coumestrol administered one hour before ischemia was effective in preventing memory loss induced by global ischemia $F(1,34)=19.71$,

($p < 0.001$), indicating a possible involvement of coumestrol in improving spatial learning and memory in mice subjected to global ischemia. These collective data together suggest a potential role of coumestrol in preventing cognitive deficits in global ischemia.

5. Discussion

The present study was undertaken to examine possible mechanisms underlying ischemic neuroprotection under coumestrol administration. Here we report that 20min of transient global ischemia induced a high suppression of GluR2 protein in hippocampus of male mice, and the pre treatment with coumestrol and estradiol greatly attenuated ischemia-induced down-regulation of GluR2 protein at 12h, 24h and 48h after reperfusion. We also observed that the Thorase protein expression was not significantly altered after the ischemic insult in hippocampal tissue, and coumestrol or estradiol administration did not induce any changes in the protein levels either at 12h, 24h and 48h as well. Our *in vitro* experiments demonstrated that the excitotoxic insult produced by 500 μ M of NMDA treatment induced a massive neuronal death, and coumestrol and estradiol administration, either pre or early post the NMDA-induced excitotoxicity assay, were able to afford neuroprotection in primary hippocampal culture. In addition, we also investigated the possible role of coumestrol in preventing memory impairment induced by cerebral ischemia. In a water maze task, coumestrol prevented and improved memory loss produced by 20 min of global ischemia, indicating that coumestrol could be a potential agent against the cognitive deficits usually observed after ischemic-like insults. Taken together, the data suggest a critical role of this coumestrol against injurious mechanisms triggered by excitotoxic insults.

For over two decades, it has been known that excessive glutamate release activates ionotropic glutamate receptors, causing calcium entry, excitotoxicity, and neuronal death in vulnerable brain regions (Mehta et al., 2013; Kostandy, 2012; Lo et al., 2003). Excessive activation of glutamate receptors in pathological conditions, such as anoxia or ischemia, precipitates excitotoxic neuronal death in vulnerable neuronal types by allowing an excessive influx of Ca^{2+} , Na^+ , and Zn^{2+} ions into the cell (Lo et al., 2003). What has thus far remained unclear is the specific role of different types of Ca^{2+} -permeable glutamate receptor in precipitating cell death and why neurons in some regions of the brain, including hippocampal CA1 pyramidal neurons, are more vulnerable to glutamate mediated excitotoxicity than others (Kittler, 2006; Pellegrini-Giampietro et al., 1997; Lo et al., 2003). AMPARs are heteromeric assemblies of subunits GluR1–GluR4, and the presence of the GluR2 subunit confers impermeability to Ca^{2+} and Zn^{2+} . This Ca^{2+} -impermeability in GluR2-containing receptors is specified by the presence of an arginine (R) residue in transmembrane domain 2 of this subunit instead of the glutamine residue (Q) present in the GluR1, GluR3, and GluR4 subunits (Peng et al., 2006). Q/R editing influences assembly, membrane trafficking, and synaptic targeting of GluR2-containing receptors (Seeburg and Hartner, 2003; Greger et al., 2003). In addition, it has been well established by several studies that experimental cerebral ischemia triggers suppression of GluR2 gene expression and subunit abundance, and enhances AMPAR-mediated Ca^{2+} influx in vulnerable CA1 pyramidal neurons before cell death (Tanaka et al., 2000; Alsbo et al., 2001; Bell et al., 2009; Peng et al., 2006). This observation led to the “GluR2 hypothesis,” which proposed that decreased availability of Ca^{2+} -impermeable GluR2(R) protein after a neurological insult would lead to increased formation of Ca^{2+} -permeable AMPARs and consequently increased neurotoxic Ca^{2+} (and possibly Zn^{2+}) influx (Pellegrini-Giampietro et al.,

1997). Thus, because AMPARs lacking the GluR2 subunit contributes to delayed CA1 pyramidal cell death after ischemia and consequent neurodegeneration, it would be fruitful if we could find a plausible therapeutic agent able to intervene in the GluR2 reduction induced by global ischemia.

In this context, we examined if it could be a possible therapeutic strategy against GluR2 protein reduction after ischemia, based on previous reports where coumestrol demonstrated to be neuroprotective against ischemia-induced neurodegeneration. Our results are in agreement with other reports, where induction of global ischemia reduced the hippocampal GluR2 protein levels, suggesting that the ischemia/reperfusion challenge produced GluR2 internalization in hippocampus (Wang et al., 2011; Liu et al., 2004; Peng et al., 2006; Tanaka et al., 2001). Coumestrol pre-treatment was able to abrogate the hippocampal GluR2 reduction observed at 12h, 24h, and 48h after ischemia, coinciding with estradiol records as well. These results are the first demonstration of a possible mechanistic basis for the neuroprotective effects of coumestrol and estradiol against glutamate-mediated excitotoxicity in cerebral ischemia. The modulation of glutamatergic activity by estrogens may have functional implications related to neuroprotection and other neurodegenerative processes. Hence, it is possible that one of the mechanisms involved in the neuroprotective actions of estradiol involves the modulation of AMPA receptor by rescue the reduced GluR2 expression after ischemia, which may then modulate Ca^{2+} permeability. Considering coumestrol and estradiol similarity in structure and function in the CNS, it is reasonable to suggest that coumestrol may have suchlike estrogen mechanisms regarding GluR2 modulation after ischemia. Additionally, it is noteworthy to mention that after ischemia, expression of transcriptional factors, including products of immediate early genes, stress proteins and neurotrophic factors are also altered in CA1 neurons. These proteins are potential

candidates for downregulating GluR2 expression by reducing mRNA transcription or stability. Since one of the mechanisms involved in the neuroprotective actions of estradiol involves brain-derived neurotrophic factor (BDNF) modulation (Murphy et al., 1998; Scharfman and MacLusky, 2005), one possible explanation for the abrogation of GluR2 reduction promoted by estradiol and coumestrol treatment could be through activating transcriptional factors involved in neuronal survival such as BDNF. These evidences suggests that both coumestrol and estradiol administration may have an indirect effect in regulatory mechanisms after ischemia, modulating transcriptional factors and, therefore, promoting neuronal survival. Moreover, it is known that estrogens modulate the activity of glutamatergic systems in the hippocampus (for review see Cyr et al., 2000a; McEwen, 2002), therefore it is possible that coumestrol could modulate GluR2 transcription in the hippocampus as well. Together, our data suggests that both compounds play a critical role in GluR2-mediated excitotoxicity in global ischemia, and propose support for the concept of a novel mechanism of action in estrogenic neuroprotection. Additional experiments are required to elucidate the exact modulation mechanisms of these compounds on GluR2 subunit in hippocampus after cerebral ischemia.

Recently, a new gene was discovered from preconditioned neuronal tissue that provides protection against ischemic and excitotoxic insults. This gene encodes a 361 amino acid protein, Thorase, with heterogeneous expression in mouse brain and relatively high expression in hippocampal CA1 pyramidal cells. GST-pull down of Thorase with different C-terminal truncations of GluR2 indicates that Thorase interacts with amino acids 832–839 of the C-terminus of GluR2 and regulates AMPAR surface expression in an ATPase-dependent manner both *in vitro* and *in vivo* (Zhang et al., 2011). Here, we sought to evaluate the possible role of Thorase after a global ischemic

insult considering its neuroprotective potential against ischemic insults. No changes in hippocampal protein levels were detected in all time points analyzed after ischemia, and either no effect of the both treatments was observed in the Thorase protein levels. However, even with no detectable significant difference in the statistic analysis, the graphic demonstrates a subtle increase in Thorase expression after insult. It has been demonstrated that Thorase regulates AMPAR surface expression and internalization and interacts with GluR2. In addition, it has been well established by the current literature that after global ischemia, a massive GluR2 internalization is observed, which contributes to the delayed neurodegeneration. Taken these evidences together, and considering the subtle enhanced in Thorase protein levels observed in our data, we feel comfortable to suggest that this discreet increase detected indicates a difference in the Thorase biological activity after global ischemia, and it may be related with Thorase's role in GluR2 internalization. Although we didn't observe any significant change in the levels of Thorase protein after coumestrol or estradiol treatment it does not necessary suggest a non involvement of these compounds on Thorase regulation. Some compounds have significant effects on protein regulation and activities by changing their localization/distribution due to either (1) modification on the protein or (2) under/over expression of binding partners. Further research is required in order to determine the exact mechanisms of Thorase in global ischemia. Understanding the biologic actions of Thorase, the survival pathways that it mediates and identify its potential disease targets, brings tremendous potential to develop pharmaceutical treatments of patients at risk for ischemic injury and perhaps for treating chronic neurodegenerative diseases.

The excitatory amino acid, glutamate, plays important roles in neuronal development, synaptic plasticity and neurodegeneration through activation NMDA and

AMPA receptors (Zhang, et al., 2011; Besancon et al., 2008; Kessels and Malinow, 2009). One common mechanism for neuronal cell death in multiple neurodegenerative diseases is excitotoxicity. In primary neuronal cultures, exposure to lethal doses of NMDA causes excitotoxic cell death due to excessive calcium influx directly through the NMDA receptors. In this context, to determine whether coumestrol could reduce neuronal cell death *in vitro*, an excitotoxic assay was performed in primary hippocampal neurons. Our results demonstrated that pre and post incubation of cultured hippocampal neurons with coumestrol or estradiol at 10 μM greatly attenuated glutamate induced excitotoxicity, promoting significant neuronal survival in hippocampal cultures and suggesting a neuroprotective effect of these 2 compounds against NMDA excitotoxicity. However, coumestrol afforded neuroprotection only when the treatment was done next to the excitotoxic event, whereas the estradiol treatment promoted longer neuroprotection as compared with the coumestrol time points of administration. The estradiol longer neuroprotective effectiveness is consistent with previous studies, where estradiol demonstrated to be effective in preventing neuronal death against glutamate-induced excitotoxicity *in vitro* (Singer et al., 1996; Behl et al., 1997; Numakawa et al., 2007), supporting the role of estradiol as a neuroprotective agent. Estradiol is known to rapidly activate the MAPK survival signaling pathway through ERs, resulting in the prevention of glutamate-induced toxicity in cultured cortical neurons (Singer et al., 1999). Moreover, the dose of 10 μM is considered to be a high concentrated estradiol dose (Behl et al., 1995), which suggests that estradiol extended neuroprotection is dose-dependent. These evidences together provide important information concerning the longer neuroprotective effect of estradiol. To our knowledge, these are the first results regarding coumestrol neuroprotection against NMDA-induced excitotoxicity *in vitro*. Moreover, our data corroborates with our previous reports where coumestrol

demonstrated to be neuroprotective against ischemia-induced excitotoxicity *in vivo* (Canal Castro et al., 2012), when administered at the same time points here performed. However, in our *in vivo* experiments, coumestrol afforded neuroprotection in all times of administration, indicating that it has longer therapeutic window *in vivo* as compared with *in vitro*. It is known that following cerebral ischemia neuronal survival depends not only on neurons but also on glial cells, vascular smooth muscle, and endothelial cells (Kreutzberg, 1996). In our hippocampal cultures, we inhibit glial proliferation by using a mixture of 5-fluoro-2-deoxyuridine, where neurons represent 90% of the cells in the culture. Thus, considering that glial cells are barely present in our *in vitro* experiments and assuming their presence *in vivo*, this provide strong evidence of their participation in coumestrol longer neuroprotection against glutamatergic excitotoxic conditions. Furthermore, in a study involving amyloid-beta toxic effects *in vitro*, coumestrol demonstrated to be neuroprotective, by reducing the toxic effects in astrocytes cultures, corroborating with our hypothesis above suggested. We know that coumestrol is a phytoestrogen with potent antioxidant activities and high binding affinities for both estrogen receptors α and β that are comparable to those of estradiol. Although the structural similarity of both compounds being evident, we cannot expect suchlike actions, since biochemical parameters involved excitotoxicity are complex. Because we didn't perform any experiments relative the intracellular mechanisms regarding coumestrol neuroprotective effects against cell death, we shall not strongly suggest any role of coumestrol at this parameters. However, bases in the shorter neuroprotective effect seeing in our experiments, we presume that coumestrol mechanism to afford neuroprotection is other than the estrogens mechanisms. Additional research is needed to determine the molecular targets mediating the neuroprotective action of coumestrol and the therapeutic potential against excitotoxicity events.

Transient global ischemia induces selective, delayed cell death of pyramidal neurons in the CA1 hippocampus (Jover et al., 2002; Pulsinelli and Brierley, 1979) and causes functional deficits in the memory and learning of rats (Tanaka et al., 2002). Hippocampal long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) of synaptic transmission are types of synaptic plasticity that have been extensively studied, as they are considered as cellular models of memory formation in the brain (Foy et al., 2010; Bear and Malenka; 1994; Bliss and Collingridge, 1993). In CA1 area of the hippocampus, LTP requires NMDA receptor activation for its induction, and an increase in AMPA receptor function for its expression and maintenance (Lisman, 2003; Malenka and Nicoll, 1999; Stanton, 1996). The MWM task is thought to test spatial learning capability and reference memory (Morris 1984). Of the neighboring regions undergoing delayed cell death in response to ischemic insults induced by transient global ischemia, the most vulnerable are found in the hippocampus, which plays a major role in learning and memory (Butler et al. 2002). A growing literature reporting results obtained in rodent models suggests that 17beta-estradiol facilitates some forms of learning and memory, and in particular, those involving hippocampus-dependent tasks. Because coumestrol demonstrated to be neuroprotective *in vivo* and *in vitro*, and considering its similarity in several levels with estradiol, we came up with the hypothesis if coumestrol could reverse the cognitive impairments usually detected after ischemia. In this study we induced a transient global ischemia for 20 min to create severe injury in the hippocampus. As expected, the ischemic insult caused memory impairment in the spatial maze assessment, and caused massive neuronal death in the CA1 pyramidal neurons, confirmed by the histological analysis (data not shown). A single dose of coumestrol given 1h before ischemia rescued the memory impairment promoted by the ischemic insult, indicating the ability of coumestrol in preventing the ischemia-induced

memory impairment. LTP is a prominent form of long lasting enhancement of synaptic transmission, and a predominant cellular model of the learning and memory processes. A typical form of LTP induction requires an enhanced entry of Ca^{+2} through NMDARs. The Ca^{+2} within the dendritic spine binds to calmodulin to activate the Ca^{+2} calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) which phosphorylates AMPARs, increasing their channel open probability and/or postsynaptic number to produce LTP (Lisman et al., 2002; Malenka and Nicoll, 1999). There are several studies supporting the estradiol ability in recovering memory deficits and improving spatial learning after ischemia (Liu & Zukin, 2007; Gulinello et al., 2005; Plamondon et al., 2006; Sandstrom and Rowan, 2007). Moreover, several reports have provided evidence that the effects of estradiol on LTP induction are due to the activation of an intracellular cascade, leading to increased actin polymerization and increased numbers of AMPA receptors (Kramar et al., 2009; Zadran et al., 2009). Furthermore, a recent study revealed that LTP in the hippocampal CA1 region was inhibited as a result of transient global cerebral ischemia and this inhibition was considerably reversed by the one-time pre-administration of estradiol (Dai et al., 2007). In this line, one possible interpretation of the neuroprotective effect of coumestrol against the memory impairment would be in its capacity to enhance the hippocampal AMPA GluR2 protein levels after ischemia, as herein demonstrated. Our results provide strong evidence that coumestrol pre treatment up-regulated the GluR2 expression in hippocampus after ischemia. This observation led us to touch the possible involvement of the GluR2 in the neuroprotective effects of coumestrol against global ischemia-induced memory loss. In this context, if we can assume that the impaired memory and cell death due to transient ischemia share the reduction of GluR2, the effects of coumestrol against memory loss might involve, at least in part, an enhancement of the hippocampal GluR2 protein levels. In addition, taking into account

that the current literature strongly supports the E2 involvement in LTP enhancement thereby ameliorating memory deficits after ischemia (Smith and McMahon, 2005; Inagaki et al., 2012; Liu & Zukin, 2007; Dai et al., 2007), and considering coumestrol estrogen-like actions in the CNS, we presume that its actions could go through the same mechanisms to promote memory improvement by contributing to LTP enhancement and maintenance. Therefore, it is conceivable that the coumestrol ability in rescuing the impaired memory by ischemia seems to involve the above mentioned mechanisms regarding the LTP induction, which might be deteriorated due to ischemia.

6. Conclusions

In this study, we presented for the first time solid evidence of the neuroprotective mechanisms of coumestrol against glutamatergic excitotoxicity induced either by *in vitro* or *in vivo* experiments. The current results indicate a complete protective effect of coumestrol against excitotoxic events that lead to neurodegenerative consequences, and reveal a potential novel mechanism that contributes at least in part to this protection by the up-regulation of GluR2 AMPA receptor after ischemia. Furthermore, our findings provide new insight of a new mechanism by which coumestrol may influence synaptic plasticity in the hippocampus and ultimately in learning and memory. These findings have important implications for the therapeutic of global ischemia and imply coumestrol as a potential agent against neurodegeneration.

7. References

Alsbo CW, Wrang ML, Moller F, Diemer NH (2001) Is the AMPA receptor subunit GluR2 mRNA an early indicator of cell fate after ischemia? A quantitative single cell RT-PCR study. *Brain research* 894:101-108.

Andrabi SA, Kang HC, Haince JF, Lee YI, Zhang J, Chi Z, West AB, Koehler RC, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2011) Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly(ADP-ribose) polymer-induced cell death. *Nature medicine* 17:692-699.

Bear MF, Malenka RC (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current opinion in neurobiology* 4:389-399.

Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Molecular pharmacology* 51:535-541.

Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F (1995) 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 216:473-482.

Belachew S, Gallo V (2004) Synaptic and extrasynaptic neurotransmitter receptors in glial precursors' quest for identity. *Glia* 48:185-196.

Bell JD, Park E, Ai J, Baker AJ (2009) PICK1-mediated GluR2 endocytosis contributes to cellular injury after neuronal trauma. *Cell death and differentiation* 16:1665-1680.

Bennett MV, Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Aronica E, Connor JA, Zukin RS (1996) The GluR2 hypothesis: Ca⁺⁺-permeable AMPA receptors in delayed neurodegeneration. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 61:373-384.

Besancon E, Guo S, Lok J, Tymianski M, Lo EH (2008) Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends in pharmacological sciences* 29:268-275.

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM (2007) Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 72:381-405.

Butler TL, Kassed CA, Sanberg PR, Willing AE, Pennypacker KR (2002) Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion. *Brain research* 929:252-260.

Canal Castro C, Pagnussat AS, Orlandi L, Worm P, Moura N, Etgen AM, Alexandre Netto C (2012) Coumestrol has neuroprotective effects before and after global cerebral ischemia in female rats. *Brain research* 1474:82-90.

Choi DW, Hartley DM (1993) Calcium and glutamate-induced cortical neuronal death. *Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease* 71:23-34.

Cyr M, Calon F, Morissette M, Grandbois M, Di Paolo T, Callier S (2000) Drugs with estrogen-like potency and brain activity: potential therapeutic application for the CNS. *Current pharmaceutical design* 6:1287-1312.

Dai X, Chen L, Sokabe M (2007) Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation of rat hippocampal CA1 neurons. *Neuropharmacology* 52:1124-1138.

De Nicola AF, Pietranera L, Beauquis J, Ferrini MG, Saravia FE (2009) Steroid protection in aging and age-associated diseases. *Experimental gerontology* 44:34-40.

Foy MR (2011) Ovarian hormones, aging and stress on hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of learning and memory* 95:134-144.

Foy MR, Baudry M, Akopian GK, Thompson RF (2010) Regulation of hippocampal synaptic plasticity by estrogen and progesterone. *Vitamins and hormones* 82:219-239.

Friedman LK (1998) Selective reduction of GluR2 protein in adult hippocampal CA3 neurons following status epilepticus but prior to cell loss. *Hippocampus* 8:511-525.

Friedman LK, Pellegrini-Giampietro DE, Sperber EF, Bennett MV, Moshe SL, Zukin RS (1994) Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABAA receptor gene expression in adult rat hippocampus: an in situ hybridization study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14:2697-2707.

Friedman LK, Segal M (2010) Early exposure of cultured hippocampal neurons to excitatory amino acids protects from later excitotoxicity. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 28:195-205.

Frye CA, Duffy CK, Walf AA (2007) Estrogens and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task. *Neurobiology of learning and memory* 88:208-216.

Gorter JA, Petrozzino JJ, Aronica EM, Rosenbaum DM, Opitz T, Bennett MV, Connor JA, Zukin RS (1997) Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:6179-6188.

Greger IH, Khatri L, Kong X, Ziff EB (2003) AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* 40:763-774.

Gulinello M, Lebesgue D, Jover-Mengual T, Zukin RS, Etgen AM (2006) Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. *Hormones and behavior* 49:246-260.

Hajszan T, MacLusky NJ (2006) Neurologic links between epilepsy and depression in women: is hippocampal neuroplasticity the key? *Neurology* 66:S13-22.

Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853.

Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253:1028-1031.

Inagaki T, Kaneko N, Zukin RS, Castillo PE, Etgen AM (2012) Estradiol attenuates ischemia-induced death of hippocampal neurons and enhances synaptic transmission in aged, long-term hormone-deprived female rats. *PloS one* 7:e38018.

Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 54:859-871.

Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MV, Etgen AM, Zukin RS (2002) Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:2115-2124.

Kessels HW, Malinow R (2009) Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61:340-350.

Kittler JT (2006) Censoring the editor in transient forebrain ischemia. *Neuron* 49:646-648.

Kostandy BB (2012) The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 33:223-237.

Kramar EA, Chen LY, Brandon NJ, Rex CS, Liu F, Gall CM, Lynch G (2009) Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12982-12993.

Kreutzberg GW (1996) Principles of neuronal regeneration. *Acta neurochirurgica Supplement* 66:103-106.

Lebesgue D, Chevalyere V, Zukin RS, Etgen AM (2009) Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids* 74:555-561.

Lephart ED, Thompson JM, Setchell KD, Adlercreutz H, Weber KS (2000) Phytoestrogens decrease brain calcium-binding proteins but do not alter hypothalamic androgen metabolizing enzymes in adult male rats. *Brain research* 859:123-131.

Lisman J (2003) Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 358:829-842.

Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature reviews Neuroscience* 3:175-190.

Liu S, Lau L, Wei J, Zhu D, Zou S, Sun HS, Fu Y, Liu F, Lu Y (2004) Expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron* 43:43-55.

Liu SJ, Zukin RS (2007) Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends in neurosciences* 30:126-134.

Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature reviews Neuroscience* 4:399-415.

Makela S, Santti R, Salo L, McLachlan JA (1995) Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environmental health perspectives* 103 Suppl 7:123-127.

Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285:1870-1874.

McEwen B (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent progress in hormone research* 57:357-384.

Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL (2013) Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European journal of pharmacology* 698:6-18.

Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* 11:47-60.

Muller AP, Gnoatto J, Moreira JD, Zimmer ER, Haas CB, Lulhier F, Perry ML, Souza DO, Torres-Aleman I, Portela LV (2011) Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus* 21:1082-1092.

Murphy DD, Cole NB, Segal M (1998) Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:11412-11417.

Noh KM, Yokota H, Mashiko T, Castillo PE, Zukin RS, Bennett MV (2005) Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:12230-12235.

Numakawa Y, Matsumoto T, Yokomaku D, Taguchi T, Niki E, Hatanaka H, Kunugi H, Numakawa T (2007) 17beta-estradiol protects cortical neurons against oxidative stress-

induced cell death through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase and in the accumulation of intracellular calcium. *Endocrinology* 148:627-637.

Oguro K, Oguro N, Kojima T, Grooms SY, Calderone A, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS (1999) Knockdown of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:9218-9227.

Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS (1997) The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends in neurosciences* 20:464-470.

Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, Zhu D, Lau L, Liu S, Liu F, Lu Y (2006) ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* 49:719-733.

Plamondon H, Morin A, Charron C (2006) Chronic 17beta-estradiol pretreatment and ischemia-induced hippocampal degeneration and memory impairments: a 6-month survival study. *Hormones and behavior* 50:361-369.

Pulsinelli WA, Brierley JB (1979) A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 10:267-272.

Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F (1982) Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals of neurology* 11:491-498.

Rothstein JD (1996) Excitotoxicity hypothesis. *Neurology* 47:S19-25; discussion S26.

Sandstrom NJ, Rowan MH (2007) Acute pretreatment with estradiol protects against CA1 cell loss and spatial learning impairments resulting from transient global ischemia. *Hormones and behavior* 51:335-345.

Scharfman HE, Maclusky NJ (2005) Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue? *Trends in neurosciences* 28:79-85.

Schmidt-Kastner R, Freund TF (1991) Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40:599-636.

Seeburg PH, Hartner J (2003) Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. *Current opinion in neurobiology* 13:279-283.

Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:2455-2463.

Singer CA, Rogers KL, Strickland TM, Dorsa DM (1996) Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neuroscience letters* 212:13-16.

Smith CC, McMahon LL (2005) Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:7780-7791.

Soundarapandian MM, Tu WH, Peng PL, Zervos AS, Lu Y (2005) AMPA receptor subunit GluR2 gates injurious signals in ischemic stroke. *Molecular neurobiology* 32:145-155.

Stahl S, Chun TY, Gray WG (1998) Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line. *Toxicology and applied pharmacology* 152:41-48.

Stanton PK (1996) LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus* 6:35-42.

Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS (2000) The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. *Brain research* 886:190-207.

Tanaka H, Katoh A, Oguro K, Shimazaki K, Gomi H, Itohara S, Masuzawa T, Kawai N (2002) Disturbance of hippocampal long-term potentiation after transient ischemia in GFAP deficient mice. *Journal of neuroscience research* 67:11-20.

Wang H, Luo M, Li C, Wang G (2011) Propofol post-conditioning induced long-term neuroprotection and reduced internalization of AMPAR GluR2 subunit in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion. *Journal of neurochemistry* 119:210-219.

Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y (2003) Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nature neuroscience* 6:1039-1047.

Waters EM, Simerly RB (2009) Estrogen induces caspase-dependent cell death during hypothalamic development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:9714-9718.

Whitten PL, Patisaul HB, Young LJ (2002) Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicology and teratology* 24:47-54.

Wisden W, Seeburg PH (1993) Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Current opinion in neurobiology* 3:291-298.

Zadran S, Qin Q, Bi X, Zadran H, Kim Y, Foy MR, Thompson R, Baudry M (2009) 17-Beta-estradiol increases neuronal excitability through MAP kinase-induced calpain activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:21936-21941.

Zhang J, Wang Y, Chi Z, Keuss MJ, Pai YM, Kang HC, Shin JH, Bugayenko A, Wang H, Xiong Y, Pletnikov MV, Mattson MP, Dawson TM, Dawson VL (2011) The AAA+ ATPase Thorase regulates AMPA receptor-dependent synaptic plasticity and behavior. *Cell* 145:284-299.

Legends to Figures

Figure 1. Effect of coumestrol and estradiol treatment on hippocampal protein levels of the AMPA GluR2 in different times after BCCAO. (a) Western blot analysis showed pools of the GluR2 subunit at 12h, 24h and 48h after reperfusion. (b) Quantification of the hippocampal GluR2 protein levels at 12h, 24h and 48h after reperfusion. Bar represent mean \pm SE (n=3-4/group). ANOVA with Duncan *post hoc* test, * $p<0.05$ versus sham operated group. ** $p<0.05$ versus ischemia vehicle group. a) ischemic treated groups at 12h after reperfusion; b) ischemic treated groups at 24h after reperfusion; c) ischemic treated groups at 48h after reperfusion.

Figure 2. Effect of coumestrol and estradiol treatment on hippocampal protein levels of Thorase in different times after BCCAO. (a) Western blot analysis showed pools of Thorase at 12h, 24h and 48h after reperfusion. (b) Quantification of the hippocampal protein levels of Thorase at 12h, 24h and 48h after reperfusion. Bar represent mean \pm SEM (n=3-4/group), ANOVA with Duncan *post hoc* test, $p>0.05$.

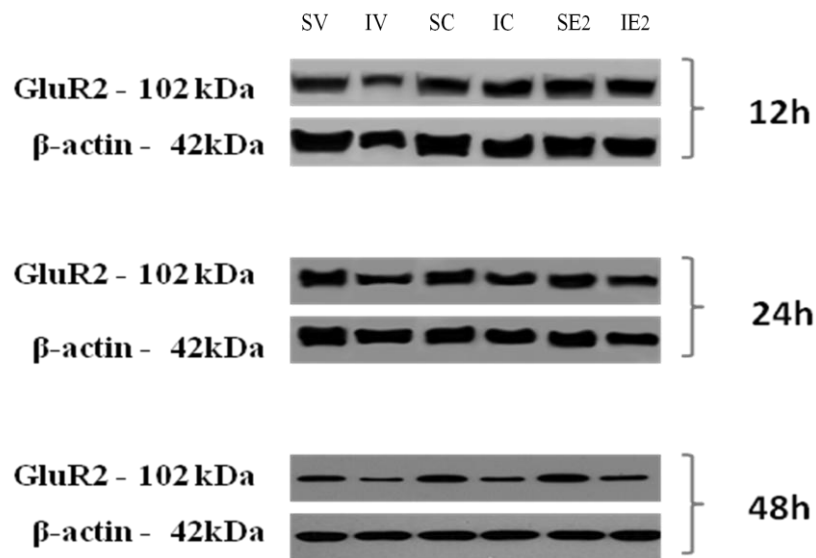
Figure 3. (a) Representative photomicrographs of hippocampal culture neurons exposed to 500 μ M of NMDA transduced with GFP, magnification (40X), counter-stained for DAPI and PI. $n = 5$; scale bar, 50 μ m. a) Control healthy neurons with no NMDA treatment. b) NMDA challenge alone increased the number of dying neurons. c) Neuroprotection effect of coumestrol in reducing the cell death induced by the NMDA treatment. d) Neuroprotection effect of estradiol in reducing the cell death induced by the NMDA treatment. ANOVA with Duncan *post hoc* test, $p<0.05$. (b) Quantification of 500 μ M NMDA-induced cell death in primary hippocampal neurons transiently transduced to express GFP. Cells with fragmented processes were considered dead. Bar represent means \pm SEM of 8 averaged fields from 4-6 coverslips per group. ANOVA

with Duncan *post hoc* test, * $p < 0.05$ versus sham group, *# $p < 0.05$ versus NMDA group.

Figure 4. Effect of coumestrol treatment on Morris Water Maze test. Data are expressed as mean \pm SEM (n=9-11/group). ANOVA with Duncan *post hoc* test, * $p < 0.05$ versus sham operated group. *# $p < 0.05$ versus ischemia vehicle group.

Figure 1

(A)



(B)

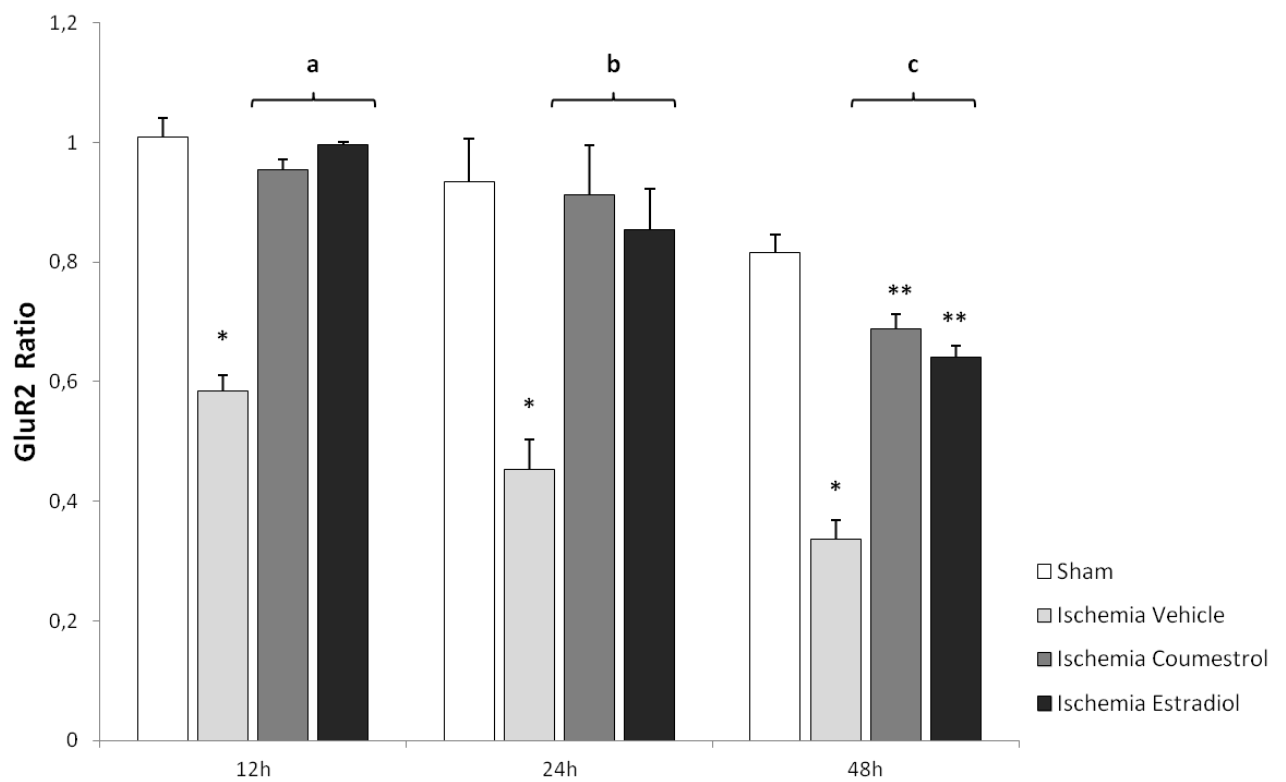


Figure 2

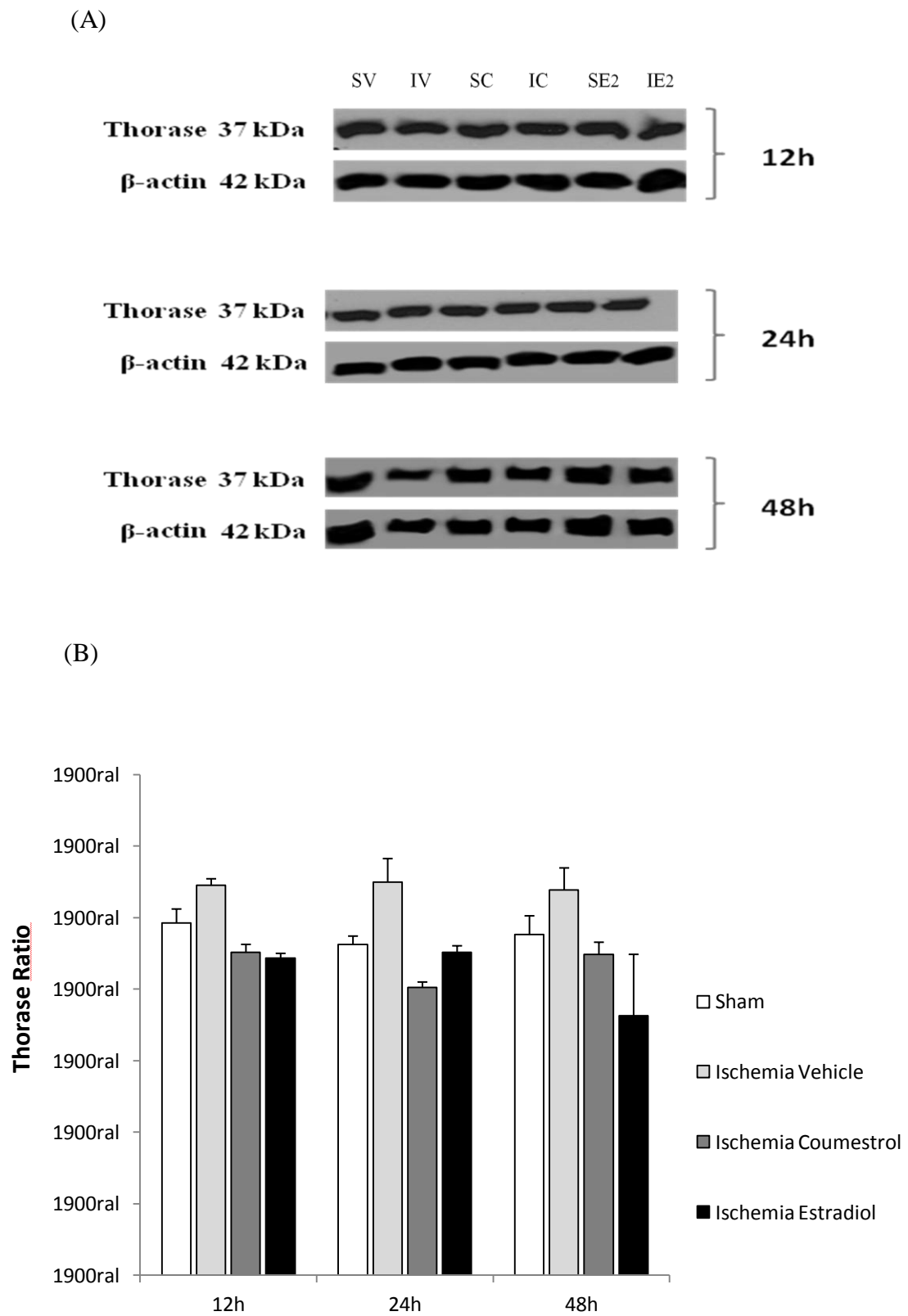
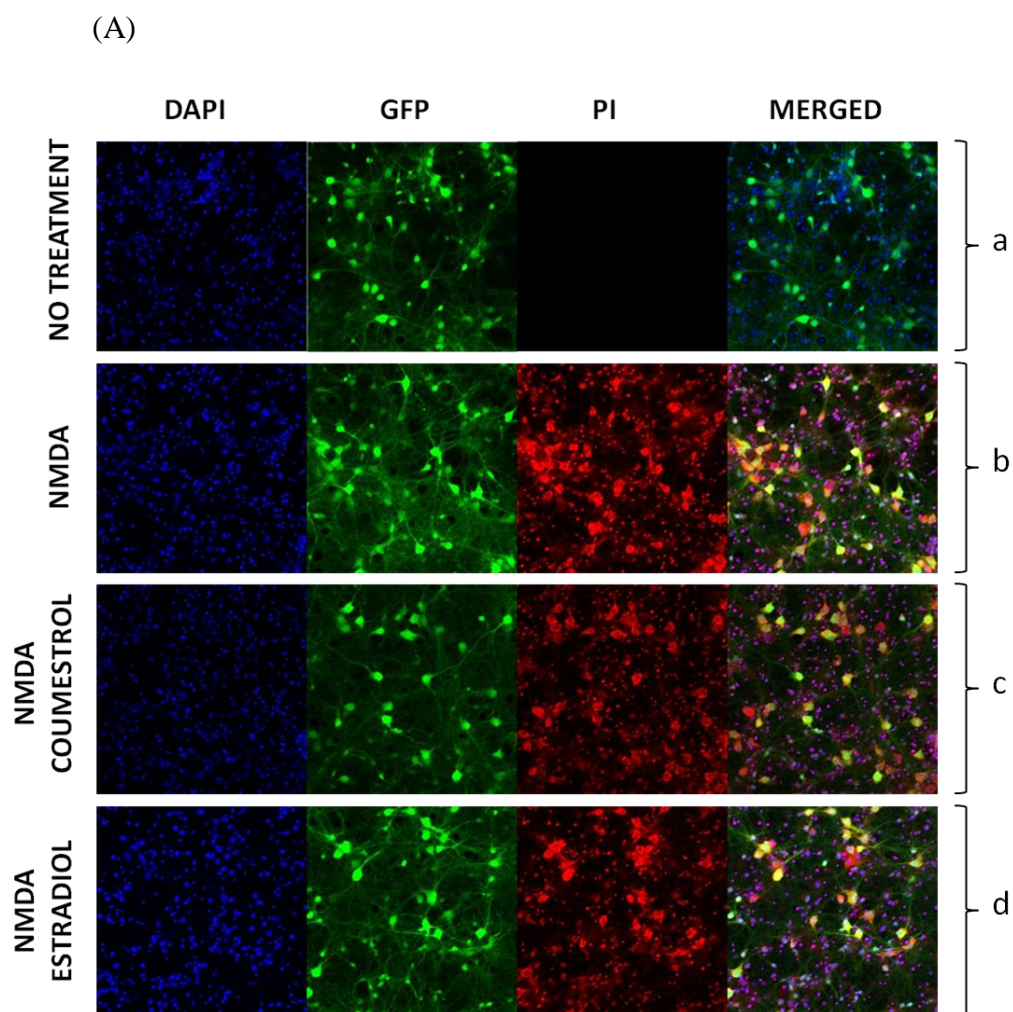


Figure 3



(B)

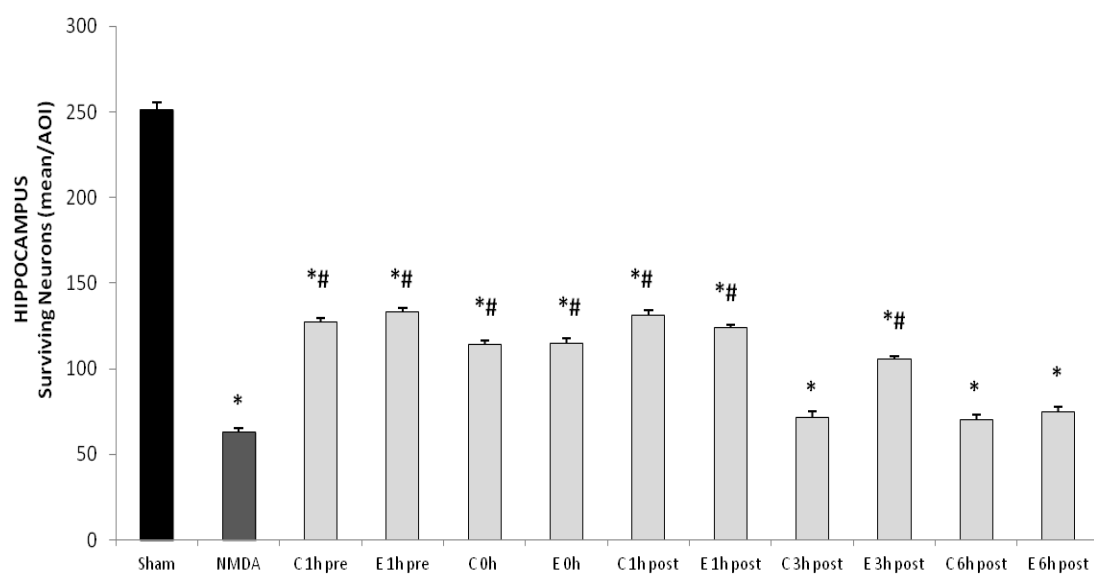
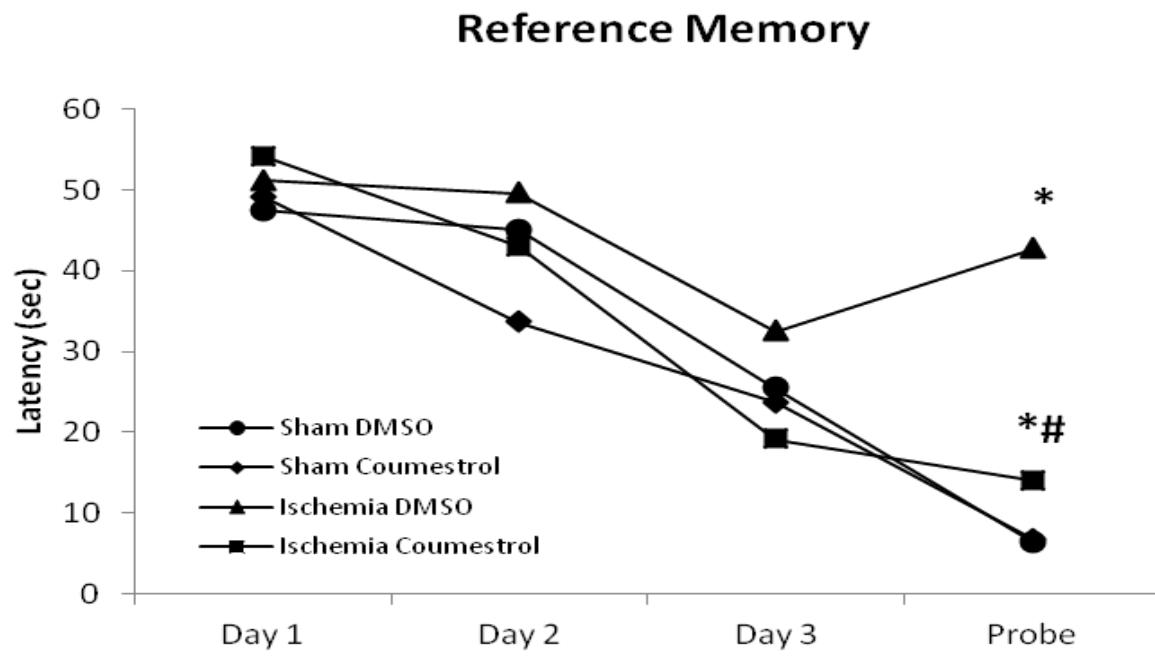


Figure 4



DISCUSSÃO

O acidente vascular encefálico (AVE) constitui atualmente um dos maiores problemas de saúde pública mundial, sendo uma das maiores causas de morte e incapacitação em adultos no mundo. A maioria dos casos é devido à estase ou diminuição do fluxo sanguíneo na área tecidual irrigada pela artéria acometida, o que é denominado de AVE isquêmico. Dentre as vítimas que não vão a óbito, a maioria terá como seqüela alguma deficiência física. Portanto, o problema desta enfermidade não se encontra apenas na mortalidade, mas também na incapacitação que impõe ao indivíduo, como não se alimentar ou locomover independentemente, além de problemas de interação social (GINSBERG, 2008).

Apesar dos avanços no entendimento da patofisiologia da isquemia cerebral, as opções terapêuticas para o tratamento desta enfermidade permanecem muito limitadas. Somente uma droga está aprovada clinicamente para o tratamento da isquemia nos Estados Unidos, o ativador de plasminogênio tecidual recombinante. Porém, levando em consideração que a maior parte dos pacientes que sofrem uma isquemia não consegue chegar ao hospital dentro de três horas, a maioria não recebe este tratamento. Conseqüentemente, o tratamento bem sucedido da isquemia permanece um dos maiores desafios na medicina clínica (LAKHAN et al., 2009; FURLAN, et al., 2003).

Estrógenos são hormônios monofenólicos que exercem numerosas atividades clássicas bem documentadas em todo o organismo. O estrógeno mais potente de ocorrência natural nos seres humanos é o 17- β -estradiol, seguido pela estrona e estriol (principal forma de excreção do hormônio). No Sistema Nervoso Central (SNC), o estradiol que chega aos neurônios é proveniente de três principais fontes: (1) pode chegar diretamente a partir da circulação, origem significativa nas mulheres (2) pela conversão da testosterona proveniente da periferia pelos astrócitos, importante nos homens (3) após a conversão da testosterona recém produzida nos astrócitos (síntese

local), acontecendo em ambos os sexos (GARCIA-SEGURA et al., 2001). Evidências consistentes têm sido acumuladas ao longo dos últimos anos demonstrando a eficácia do estradiol em reduzir o dano cerebral seguido de um AVE em ambos os sexos. Adicionalmente, doses fisiológicas e farmacológicas deste hormônio demonstram exercer neuroproteção quando administradas antes de um insulto isquêmico focal ou global (BAGETTA et al., 2004; DUBAL et al., 1998; SIMPKINS et al., 1997). Além disso, muitos estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado a eficácia do estrogênio contra a neurodegeneração em vários modelos neuropatológicos (RAVAL et al., 2006; VISCOLI et al., 2001). Contudo, resultados de testes clínicos tem sido desapontadores até o momento, devido aos inúmeros efeitos colaterais causados pela sua administração crônica no tratamento da isquemia. Com base nisso, um novo paradigma de intervenção farmacológica estrogênica surge, com o objetivo de evitar os efeitos adversos que o tratamento crônico, ao mesmo tempo proporcionando proteção neurológica contra insultos isquêmicos.

Os fitoestrógenos são compostos difenólicos, não esteroidais, derivados de plantas e com atividade estrogênica. Assim como os estrógenos endógenos, entram no ambiente lipofílico do cérebro e se ligam em receptores de estrogênio (ERs) (LIU et al., 2011; LEPHART et al., 2002), desencadeando muitas respostas biológicas que são causadas por níveis endógenos de estrogênio sem os efeitos colaterais indesejados. Nesta linha, o fitoestrógeno coumestrol ganha proeminência devido a sua alta atividade estrogênica e grande similaridade estrutural com a molécula do estradiol, despertando interesse em avaliar seu potencial neuroprotetor contra doenças neurodegenerativas.

A principal proposta desta tese foi estudar o efeito neuroprotetor do coumestrol contra os efeitos deletérios encontrados após um insulto isquêmico global. Para isto, utilizamos modelos de isquemia *in vivo* e *in vitro* previamente padronizados e já bem

estabelecidos na literatura científica. No primeiro capítulo deste trabalho buscamos avaliar o efeito neuroprotetor do coumestrol contra a morte celular induzida na região CA1 hipocampal, característica peculiar de modelos isquêmicos globais, e determinar se seus efeitos neuroprotetores seriam mediados pelos clássicos receptores estrogênicos, através de uma abordagem fármaco-antagonista. Para isso, tratamos ratas previamente ovariectomizadas com coumestrol, ou com seu análogo estrutural 17- β -estradiol, em diferentes tempos pré e pós-isquemia (1h antes, 0h, 3h, 6h e 24h), seguido ou não da administração antagonista, e avaliamos histologicamente o efeito de sua administração na sobrevivência neuronal em CA1. Os resultados desta investigação demonstraram que o tratamento com coumestrol foi capaz de promover uma significativa redução da morte neuronal induzida pela isquemia global em todos os tempos de administração. Uma vez que coumestrol demonstrou ser neuroprotetor em ratas fêmeas, surgiu a próxima hipótese de trabalho: se o tratamento com coumestrol seria igualmente neuroprotetor em ratos machos, e se este poderia reverter a redução da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase, um dos prejuízos celulares provocados pela isquemia global. Confirmamos nossa hipótese ao observar a neuroproteção promovida por coumestrol na avaliação histológica e bioquímica decorrentes da administração do coumestrol em relação aos grupos-controle, como apresentado no segundo capítulo desta Tese. Levando em consideração que a intervenção farmacológica oferece estratégias terapêuticas que antagonizam ou interrompem uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares prejudiciais desencadeados pela isquemia, buscamos aprofundar o conhecimento dos mecanismos neuroprotetores do coumestrol no terceiro capítulo, tanto em ensaios *in vivo* quanto em ensaios *in vitro*. Os resultados obtidos neste terceiro momento investigativo ofereceram novas perspectivas subjacentes aos possíveis mecanismos

celulares que o coumestrol possa estar utilizando para promover neuroproteção na isquemia cerebral global.

Em uma avaliação mais minuciosa do primeiro capítulo, onde tanto a administração local como periférica foram hábeis em promover sobrevivência neuronal significativa na região CA1 hipocampal, alguns aspectos relevantes se mostram passíveis de consideração: o primeiro se deve ao fato de que compostos estrogênicos, tanto endógenos quanto exógenos, exercerem profundos efeitos neuroprotetores em modelos animais de isquemia experimental e produzirem suas ações celulares através de sua afinidade por receptores estrogênicos clássicos (ER- α e ER- β) (ETGEN et al., 2010; GIBSON et al., 2006). Em nosso estudo, buscamos elucidar inicialmente o possível papel neuroprotetor de um composto altamente correlato ao 17- β -estradiol, o coumestrol (KUIPER et al., 1998), contra a morte celular tardia na região CA1 hipocampal, e se esta neuroproteção estaria sendo mediada pelos receptores clássicos de estrogênio.

Nossa hipótese de neuroproteção foi confirmada com a avaliação histológica sete dias após a administração de coumestrol em todos os tempos de administração, através da contagem de neurônios piramidais sobreviventes na região CA1 hipocampal, onde coumestrol demonstrou ser neuroprotetor, inclusive 24h pós isquemia. Contudo, a hipótese da neuroproteção mediada pelos receptores de estrogênio foi parcialmente confirmada, devido aos nossos resultados demonstrarem que a administração do antagonista não foi capaz de bloquear totalmente a neuroproteção promovida pelo tratamento com o coumestrol. Isto nos levou a crer na possibilidade de coumestrol estar agindo por vias distintas às do estradiol. Ainda, o fato de esta neuroproteção ter sido de longo alcance em comparação com seu controle positivo estradiol, que demonstrou alcance neuroprotetor somente até seis horas pós-isquemia, nos levou a crer que, apesar da similaridade estrutural entre estes dois compostos, isto não significa que estes

estejam agindo através das mesmas rotas de sinalização celular para promover neuroproteção.

Outro ponto relevante a ser considerado seria a atividade antioxidante relacionada ao coumestrol. É bem fundamentado na literatura que fitoestrógenos são potentes antioxidantes capazes de abrandar a injúria cerebral após eventos isquêmicos e outras doenças de cunho neurodegenerativo (AL-NAKKASH et al., 2009; DONZELLI et al., 2010; KIM et al., 2009). Ademais, compostos ricos em fitoestrógenos têm demonstrado serem neuroprotetores em modelos de isquemia cerebral global (HONG et al., 2001; SCHREIHOFER et al., 2005) por atenuarem o estresse oxidativo, peroxidação lipídica e a cascata sinalizadora que leva à morte celular apoptótica, promovendo sobrevivência neuronal (CAI et al., 1997; MITCHELL et al., 1998). Em estudos sobre propriedades antioxidantes de fitoestrógenos, coumestrol demonstrou ser um potente antioxidante, com uma alta capacidade de doação de elétrons (MITCHELL et al., 1998). Com base nisso, poderíamos atribuir a neuroproteção conferida por coumestrol em nossos estudos devido à sua alta capacidade antioxidante. Contudo, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) após um insulto isquêmico permanece por um período curto de tempo na célula (THIYAGARAJAN et al., 2004; KLEINSCHNITZ et al., 2010), levando-nos a inferir que, talvez, a neuroproteção observada após 6h pós isquemia possa não estar relacionada com as propriedades antioxidantes de coumestrol devido ao tempo-limite relacionado à presença intracelular de ROS.

Adicionalmente, outro aspecto relevante nesta discussão, seria a possibilidade de coumestrol estar conferindo neuroproteção através de um terceiro mecanismo diferenciado, recrutando outras vias celulares além das acima citadas. Recentes estudos revelam a existência de receptores transmembrana capazes de responder a esteroides com ativação celular. Um exemplo seria o GPR30, um membro da família dos

receptores acoplados à proteína G, que media ações dependentes e independentes relacionadas ao estradiol, sendo amplamente expressado no cérebro, com especial destaque para o hipocampo (FILARDO et al., 2002; FILARDO & THOMAS et al., 2005; PROSSNITZ et al., 2007, 2008). O estradiol exibe uma afinidade similar pelo GPR30 comparável com a sua pelos seus receptores clássicos, e sua ligação ao GPR30 estimula a produção de AMPc, mobilização de cálcio e ativa a sinalização de fatores de crescimento (ETGEN et al., 2010). Ainda, há evidências fortes que GPR30 poderia estar atuando concomitantemente com os ERs a fim de ativar vias de sinalização relacionadas com a sobrevivência neuronal após uma isquemia cerebral global (LEBESGUE et al., 2009). Nesse contexto, coumestrol poderia estar atuando por esta via alternativa de sinalização celular para promover neuroproteção contra a morte celular hipocampal em CA1. Determinar se a neuroproteção promovida por compostos estrogênicos seguido de isquemia global é mediada por ERs, ou por outros receptores de membrana, é de grande interesse para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas hábeis em reverter o processo neurodegenerativo subjacente à morte neuronal tardia.

Considerando os resultados promissores do primeiro capítulo, avançamos ao próximo capítulo, onde os passos dados foram em direção à hipótese de coumestrol ser igualmente neuroprotetor em machos. A partir disso, utilizando o mesmo modelo experimental de isquemia global, executamos os experimentos em ratos machos seguindo exatamente o mesmo protocolo utilizado na experimentação com fêmeas. Considerando que inúmeros estudos fundamentam a ideia do dano neuronal isquêmico estar associado com um desequilíbrio na homeostase iônica e subsequente diminuição da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase (WYSE et al., 2000; SIESJO, BK, 1988), estimamos a possibilidade do tratamento com coumestrol poder reverter este processo

degenerativo, já que o reestabelecimento da enzima Na^+/K^+ -ATPase está relacionado com neuroproteção celular (DALLAPORTA et al., 1998).

Nossos resultados revelaram que a administração de coumestrol, em todos os tempos de administração, foi capaz de reduzir significativamente a morte neuronal na região CA1 hipocampal induzida pela isquemia global em ratos machos, confirmando nossa hipótese inicial. A neuroproteção promovida pelo estradiol em ratos machos já está bem demonstrada na literatura, tanto em isquemia focal como global (HAWK et al., 1998; TOUNG et al., 1998) e em gerbilos (JOVER et al., 2002). Contudo, a janela terapêutica relativa ao estradiol é limitada até 6h pós-insulto (YANG et al., 2000; 2003), o que difere da terapia com coumestrol, tanto em fêmeas quanto em machos. Apesar de a análise estatística ter demonstrado significância em todos os tempos de administração, observamos um decréscimo na proteção celular às 6h pós-isquemia, o que nos levou a considerar a possibilidade do coumestrol estar agindo por cascatas de sinalização intracelulares, que são ativadas neste tempo específico de reperfusão após a isquemia em machos, mas não em fêmeas, resultando em morte celular. Como não executamos nenhum experimento relativo a mecanismos de sinalização intracelular em relação às ações de coumestrol, não devemos sugerir fortemente nenhum papel de coumestrol nesses parâmetros. Porém, estudos publicados na literatura relacionados à ação de estradiol nas mesmas condições experimentais nos permitem levantar uma possível explicação para tal decréscimo. Nesses estudos (BAGETTA et al., 2004; JOVER et al., 2002), a neuroproteção promovida pela terapia com estradiol no tempo de reperfusão 6h pós isquemia global em machos foi atribuída devido a sua interferência na cascata de sinalização que envolve o recrutamento da enzima caspase-3, seguida de clivagem da PARP-1, cascata sinalizadora considerada uma das mais reconhecidas envolvendo mecanismos de morte celular programada (DAWSON & DAWSON, 2004).

Nesse contexto, considerando que a terapia com estradiol foi capaz de minimizar a morte neuronal no mesmo tempo de reperfusão em que coumestrol não demonstrou consistência neuroprotetora, e que os mecanismos envolvendo esta neuroproteção implicam a cascata apoptótica acima mencionada, parece-nos plausível inferir que, apesar de serem compostos muito similares, coumestrol e estradiol parecem não estar agindo pela mesma via sinalizadora neste tempo de reperfusão. Além disso, uma vez que 6h é o ponto de ativação da caspase-3 (JOVER et al., 2002) e, considerando que este tempo específico está de acordo com o tempo em que observamos uma diminuição na neuroproteção celular, parece-nos plausível considerar um possível papel deste composto na via de regulação da morte celular apoptótica em machos. Os trabalhos publicados sobre diferenças relacionadas ao sexo em isquemia cerebral e ativação da PARP-1 (BAGETTA et al., 2004) corroboram com nossa hipótese acima levantada sobre coumestrol interferir na via da PARP-1 e de isto estar relacionado ao gênero.

Uma vasta gama de estudos reportam que a injúria neuronal causada na isquemia cerebral global está intimamente associada a um desequilíbrio na homeostase iônica celular, produzindo excessiva produção de EROs, moléculas diretamente envolvidas no dano celular oxidativo, e consequente morte celular. A Na^+/K^+ -ATPase é uma proteína transmembrana que tem um papel vital na manutenção da homeostase iônica e sua atividade se encontra severamente comprometida sob circunstâncias isquêmicas, devido à massiva presença de EROs. Portanto, abordagens antioxidantes podem desempenhar um papel crucial na prevenção do dano oxidativo neste contexto. A hipótese de que coumestrol poderia restaurar a atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase se deu a partir do paradigma antioxidante que este composto demonstra exercer, levantando a possibilidade de sua administração minimizar os prejuízos homeostáticos causados pela isquemia global. Nossos resultados demonstram que os 10 minutos de isquemia global

causaram significativa diminuição na atividade geral da bomba Na^+/K^+ -ATPase, tanto em 1h como em 24h após o insulto isquêmico, corroborando com os estudos de (WYSE et al., 2000; SIMÃO et al., 2011) dentro desta mesma linha. A administração de coumestrol 1h pré-isquemia demonstrou restaurar a atividade da enzima em ambos os tempos de reperfusão (1h e 24h), sugerindo o papel neuroprotetor de coumestrol contra a inibição induzida por isquemia da Na^+/K^+ -ATPase.

Os compostos antioxidantes são conhecidos por diminuírem o acúmulo de EROs, protegendo a integridade da membrana celular e, conseqüentemente, promovendo sobrevivência neuronal (CAI et al., 1997; MITCHELL et al., 1998). Adicionalmente, estudos prévios demonstraram as propriedades antioxidantes de coumestrol (GELINAS & MARTINOLI, 2002; JIN et al., 2012) e sua capacidade neuroprotetora contra eventos de cunho excitotóxicos (LIU et al., 2011). Com base nestas evidências, sugerimos, primeiramente, o possível envolvimento de coumestrol na preservação da atividade enzimática da Na^+/K^+ -ATPase através de seus mecanismos antioxidantes. Nesse contexto, sua administração poderia estar de alguma maneira prevenindo a geração de EROs contribuindo para a manutenção da membrana plasmática e integridade da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase. Ademais, vários estudos apontam que a enzima Na^+/K^+ -ATPase possa ser um importante alvo para o 17- β -estradiol e moléculas com estruturas químicas semelhantes, fornecendo evidências consistentes da estimulação da enzima pela administração de E2 (CHEN et al., 2006; MELIS et al., 1990; DZURBA et al., 1997). Ainda, E2 demonstrou antagonizar a depressão da atividade enzimática da bomba Na^+/K^+ -ATPase causada pela isquemia, corroborando com os estudos acima mencionados sobre a estimulação da bomba por E2. Essas evidências parecem se encaixar com a possibilidade de coumestrol ter restaurado a atividade da Na^+/K^+ -ATPase não só pela sua atividade antioxidante, mas também

devido a sua semelhança com a molécula de E2 e possível atividade estrogênica estimulante. Concluindo, este segundo capítulo coloca o coumestrol em um contexto mais amplo relacionado a mecanismos neuroprotetores dentro da isquemia cerebral e sugerem que sua terapêutica em ambos os sexos é promissora, no sentido de propiciar um maior alcance temporal contra a morte neuronal em relação ao estradiol, habilitando-nos a sugerir que este composto pode ser uma estratégia terapêutica verossímil contra a isquemia global.

A isquemia cerebral transiente ou global, induzida em animais ou ocorrendo em humanos como resultado de uma parada cardíaca, é seguida de neurodegeneração tardia em populações neuronais específicas. Neurônios piramidais da região CA1 são particularmente vulneráveis (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991). Durante um breve episódio de isquemia global (5-10 min) em ratos ou em gerbilos, concentrações extracelulares de glutamato e potássio e níveis intracelulares de cálcio aumentam por todo o encéfalo e neurônios despolarizam e se tornam inexcitáveis. Contudo, dentro de minutos após a reperfusão sanguínea, o ambiente é reestabelecido, os níveis citoplasmáticos de cálcio retornam ao nível de repouso e os neurônios podem novamente gerar potenciais de ação (SILVER & ERECINSKA, 1992; TORP et al., 1993; XU & PULSINELLI, 1996). Na região CA1 hipocampal, este reestabelecimento é transiente e, após vários dias, é seguido por extensiva degeneração dos neurônios piramidais (PULSINELLI et al., 1982; KIRINO, 1982).

Dentro das inúmeras consequências neurodegenerativas associadas à isquemia global, está a regulação do RNA mensageiro do GluR2, localizado na região vulnerável CA1 antes da morte celular detectável por histologia (LIU & ZUKIN, 2007; PENG et al., 2006; SEEBURG & HARTNER, 2003). Receptores AMPA que não possuem a subunidade GluR2 na sua estrutura são permeáveis a cálcio e zinco. A observação que

os níveis proteicos estão especificamente reduzidos na região CA1 hipocampal após a isquemia global levou a ‘hipótese do GluR2’, que propõe que o decréscimo de disponibilidade proteica de GluR2 após o insulto isquêmico global levaria à formação de receptores AMPA permeáveis a cálcio e, conseqüentemente, a um aumento de influxo excitotóxico de cálcio (e possivelmente zinco) (PELLEGRINI-GIAMPIETRO et al., 1997; LIU et al., 2004). Em concordância com essa hipótese, neurônios CA1 pós-isquêmicos exibem um grande aumento de influxo de cálcio através de receptores AMPA em relação aos neurônios-controle, e este aumento no influxo de cálcio ocorre obviamente antes da degeneração e morte neuronal (ARONICA et al., 1998; BENNETT et al., 1996; LIU et al., 2006). Neste sentido, seria extremamente proveitoso se pudéssemos encontrar um agente terapêutico hábil em interferir na redução de GluR2 induzida pela isquemia global. Portanto, baseado em nossos estudos prévios, onde o coumestrol demonstrou ser neuroprotetor contra a neurodegeneração induzida por isquemia global, levantamos a hipótese de seu tratamento ser uma estratégia contra a redução proteica de GluR2 geralmente detectada pós-isquemia, o que proporcionou o desenvolvimento do terceiro capítulo desta tese. O principal objetivo aqui foi investigar os possíveis mecanismos que coumestrol possa estar utilizando para promover neuroproteção.

Em um primeiro momento, avaliamos os efeitos da pré-administração de coumestrol e estradiol em diferentes tempos de reperfusão (12h, 24h, 48h) em relação aos níveis proteicos de GluR2 hipocampal em camundongos machos submetidos à vinte minutos de isquemia global. Nossos resultados demonstraram que o insulto isquêmico global suprimiu significativamente os níveis de GluR2 hipocampal em todos os tempos de reperfusão avaliados, corroborando com estudos prévios onde a isquemia cerebral global, sendo ela em ratos, gerbilos ou camundongos, produziu diminuição do conteúdo

proteico de GluR2 (PENG et al., 2006; GORTER et al., 1997; PU et al., 2005). O pré-tratamento com coumestrol foi capaz de prevenir a redução proteica de GluR2 observada em todos os tempos de reperfusão pós-isquêmica, coincidindo com os registros da administração de E2. No intuito de explicar essa habilidade de coumestrol em retroceder este mecanismo de regulação característico da isquemia global, direcionamos nosso raciocínio para os mecanismos associados ao E2 na tentativa de achar uma explicação plausível para tal.

Partindo da premissa de que estes resultados são os primeiros na literatura a demonstrarem os efeitos do E2 contra a redução de GluR2 pós-isquemia global, inferimos a possibilidade de um novo mecanismo de ação associado aos mecanismos do E2 contra os efeitos deletérios relativos à excitotoxicidade glutamatérgica e morte neuronal na isquemia global. Em relação a este, é válido apontar para seu possível papel na regulação da atividade glutamatérgica no hipocampo (CYR et al., 2000; MCEWEN, 2002), frequentemente associada às suas ações neuroprotetoras e a processos neurodegenerativos. Nesta linha, levando em consideração que a ativação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um dos principais mecanismos celulares associados à neuroproteção mediada por estradiol (MURPHY et al., 1998; SCHARFMAN & MACLUSKY, 2005), uma possível explicação para os resultados obtidos neste estudo, poderia ser de a ativação de BDNF desencadeada por E2 estar exercendo uma atividade regulatória oblíqua sobre a expressão de GluR2, contribuindo para a sobrevivência neuronal em CA1. Considerando a similaridade existente em estrutura e função entre E2 e coumestrol, é razoável sugerir que coumestrol possa estar agindo através de mecanismos semelhantes em relação à regulação de GluR2 pós-isquemia. As similaridades obtidas nos nossos resultados em relação à análise quantitativa proteica desses dois compostos permitem-nos sugerir que ambos os

compostos possam exercer um efeito ‘indireto’ no mecanismo regulatório do GluR2, modulando fatores transcricionais e, desta maneira, promovendo sobrevivência neuronal. Neste sentido, surge um conceito paralelo associado a um novo mecanismo de ação relativo à neuroproteção estrogênica na isquemia global, considerando o papel crítico que tanto o coumestrol como E2 desempenham dentro do contexto de morte neuronal da isquemia global.

Ainda dentro dos mecanismos associados à neuroproteção conferida a partir de pré-condicionamento isquêmico, avaliamos o possível papel de uma proteína associada ao GluR2 dentro do contexto da isquemia global. Thorase é uma proteína com expressão heterogênea cerebral com alta expressão em células piramidais da região CA1 hipocampal e desempenha um papel neuroprotetor contra insultos isquêmicos e excitotóxicos. Ela demonstrou interagir com a parte C-terminal do receptor GluR2 e regular a expressão de superfície dos receptores AMPA tanto em ensaios *in vitro* como em ensaios *in vivo* (ZHANG et al., 2011). Considerando sua ativa interação com o GluR2 e a massiva internalização observada pós-isquemia deste receptor, visamos avaliar o possível papel da Thorase dentro do contexto da isquemia cerebral global, investigando se sua atividade estaria relacionada com a redução de GluR2 nos mesmos tempos de reperfusão avaliados no ensaio com GluR2 e, no caso positivo, se coumestrol ou estradiol poderiam reverter tal processo. Nenhuma alteração nos níveis proteicos hipocampais foi detectada em todos os tempos de avaliação pós-isquemia, tanto nos animais-controle quanto nos animais-tratados, o que sugere que a atividade biológica da Thorase não está relacionada com a internalização de GluR2 observada nos tempos de reperfusão pós-isquêmicos. Contudo, mesmo com a análise estatística sendo não significativa, observamos no gráfico relativo à avaliação quantitativa proteica da Thorase um aumento sutil na expressão da enzima pós-isquemia, o que sugere uma

atividade biológica discreta, porém detectável, da enzima em um contexto isquêmico. Embora não tenhamos observado nenhuma mudança significativa nos níveis proteicos da Thorase sob a administração de coumestrol e E2, isso não sugere necessariamente um não envolvimento destes compostos na regulação da Thorase. Alguns compostos produzem efeitos significativos na regulação/atividade proteica, por mudarem sua localização/distribuição ou: (1) através de uma modificação alostérica na estrutura da proteína ou (2) através da expressão de proteínas vinculadas às suas estruturas. Futuras investigações sobre os mecanismos da Thorase propiciariam um melhor entendimento de sua ação biológica dentro do contexto da isquemia global, trazendo um grande potencial no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

O aminoácido glutamato desempenha um importante papel no desenvolvimento neuronal, plasticidade sináptica e neurodegeneração através da ativação de receptores NMDA e AMPA (ZHANG et al., 2011; BESANCON et al., 2008; KESSELS & MALINOW, 2009). Um mecanismo comum para a morte celular em doenças neurodegenerativas é a excitotoxicidade. Em culturas neuronais primárias, a exposição a doses letais de NMDA causa morte celular por excitotoxicidade devido ao influxo excessivo de cálcio diretamente através de receptores NMDA. Neste contexto, para determinar se coumestrol poderia reduzir a morte celular *in vitro*, um ensaio excitotóxico foi realizado em culturas primárias hipocampais, onde coumestrol e estradiol foram administrados em diferentes tempos (pré e pós excitotoxicidade induzida por glutamato).

Nossos resultados demonstraram que a administração de ambos os compostos diminuiu significativamente a morte neuronal induzida, suscitando a sobrevivência neuronal nas culturas hipocampais, sugerindo mais uma vez que a administração de

coumestrol promove neuroproteção neuronal contra a morte celular induzida por excitotoxicidade glutamatérgica. Contudo, coumestrol demonstrou uma janela terapêutica de menor alcance em comparação com E2, onde este último conferiu maior eficiência acerca do alcance temporal. A maior eficácia na neuroproteção conferida por E2 está em concordância com estudos prévios nesta mesma linha, onde este demonstrou exibir atividade neuroprotetora contra a excitotoxicidade glutamatérgica *in vitro* (SINGER et al., 1996; BEHL et al., 1997; NUMAKAWA et al., 2007). O estradiol é conhecido por ativar rapidamente a via de sinalização associada à sobrevivência neuronal dependente de MAPK através de ERs, resultando em prevenção de morte neuronal em culturas neuronais (SINGER et al., 1999).

Estes resultados são os primeiros da literatura em relação às atividades neuroprotetoras de coumestrol realizados dentro de um contexto excitotóxico induzido por NMDA *in vitro*. Adicionalmente, estes mesmos resultados corroboram parcialmente com os dados até agora obtidos *in vivo* contra excitotoxicidade induzida por isquemia dentro deste trabalho, considerando a coincidência precisa dos tempos de administração em ambos os ensaios. A diferença relativa ao tempo de alcance terapêutico de coumestrol é evidente nas duas avaliações, uma vez que este demonstrou ter maior eficácia neuroprotetora quando *in vivo*, à medida que falhou em exercer um alcance maior em longo prazo quando *in vitro*, sugerindo diferentes mecanismos dentro de dois contextos metodológicos investigativos. Uma possível explicação para tal diferença seria a escassa presença de células gliais nas culturas hipocâmpais, uma vez que inibimos sua proliferação através da administração de um inibidor de proliferação glial. Admitindo a presença não significativa de células gliais em nosso ensaio *in vitro* e assumindo a sua presença *in vivo* nos levou a considerar a possível participação das células da glia no contexto da neuroproteção promovida por coumestrol a longo prazo,

uma vez que os astrócitos exercem uma função protetora fundamental contra o estresse oxidativo relacionado à neuroproteção contra a excitotoxicidade glutamatérgica (LIU et al., 2011). Além disso, em um estudo envolvendo toxicidade induzida por beta-amiloide *in vitro* em cultura de astrócitos, a administração de coumestrol conferiu neuroproteção, reduzindo os efeitos tóxicos induzidos, corroborando com nossa hipótese acima sugerida (LIU et al., 2011). Concluindo, tanto os ensaios realizados *in vitro* como os ensaios realizados *in vivo* deste presente trabalho convergem para uma sustentação mais consistente de nossa hipótese relativa à atividade neuroprotetora de coumestrol, permitindo-nos sugerir com mais firmeza sua participação benéfica dentro de um contexto excitotóxico.

O teste do Labirinto Aquático de Morris (LAM) foi originalmente desenvolvido para testar a habilidade de ratos em aprender, lembrar e ir a um lugar no espaço definido somente pela sua posição relativa às pistas externas ao labirinto. Devido ao fato do rato ser geralmente colocado dentro de uma piscina com uma variedade de pontos de partida, e, por consequência de não existirem pistas internas dentro desta piscina que guiem o rato à plataforma de destino, a aquisição do conhecimento é baseada a partir da plataforma de origem. Em comparação com outros testes comportamentais que examinam também a habilidade de aprendizado e memória de roedores, o LAM apresenta algumas vantagens que facilitam a execução e interpretação: (1) o LAM suporta a possibilidade de diferenciar “processo cognitivo” (aprendizado e memória) e desempenho motor (2) devido ao fato de o teste ocorrer na água, distúrbios relacionados a traços de odores não estão presentes (3) uma dieta especial não é necessária, como no teste do labirinto de oito braços. Além disso, o LAM revela um prejuízo no aprendizado e memória espacial, que pode ser facilmente quantificado. Em vista disso, este teste

parece ser adequado para investigar se estratégias neuroprotetoras que reduzem o dano neuronal também levariam ao melhoramento funcional.

Levando em consideração que a isquemia global leva à morte neuronal seletiva na região CA1 hipocampal e a um déficit no aprendizado e memória espacial (MORRIS et al., 1982, 1986; MOSER et al., 1993; ZOLA-MORGAN & SQUIRE, 1986), pode-se assumir que este dano hipocampal pode ser a base para distúrbios funcionais. Ademais, vários estudos vêm demonstrando que estratégias neuroprotetoras resultam na redução do dano hipocampal paralela à diminuição do déficit de aprendizado e memória espacial (BLOCK, 1998; ARONICA et al., 1998, WANG et al., 2011). Neste contexto, partindo da premissa de que coumestrol demonstrou ser neuroprotetor nas hipóteses anteriormente levantadas neste trabalho, consideramos a possibilidade de sua terapêutica ser efetiva em reverter os prejuízos cognitivos geralmente detectados após um insulto isquêmico global. Para isto, induzimos 20 minutos de isquemia global em camundongos-fêmeas previamente ovariectomizadas e administramos uma única dose de 20mg intraperitoneal 1h antes de a isquemia ser efetivada.

Como esperado, o insulto isquêmico induziu prejuízo no aprendizado e memória nos animais-controle, confirmado posteriormente pela massiva morte neuronal na região CA1 hipocampal observada através de análise histológica, ratificando prévios estudos já publicados nesta linha. A dose de coumestrol administrada 1h antecedente à isquemia foi efetiva em reduzir os déficits cognitivos relacionados ao aprendizado e memória observados nos animais-controle, indicando a habilidade de coumestrol em prevenir o déficit de memória induzido pela isquemia. Já é bem estabelecido no meio científico que a Potenciação de Longa Duração (LTP) é uma forma proeminente de aumento duradouro da transmissão sináptica e um modelo celular predominante no processo de aprendizado e memória. O cálcio dentro dos espinhos dendríticos se liga à calmodulina

e ativa a quinase dependente de calmodulina (CaMKII), que por sua vez fosforila os receptores AMPA, aumentando a probabilidade de abertura de seus canais e ou densidade pós-sináptica destes, induzindo a LTP (LISMAN et al., 2002; MALENKA & NICOLL, 1999). Existem vários estudos que apoiam a habilidade do E2 em reduzir os déficits de memória associados à isquemia global, melhorando o aprendizado espacial (LIU & ZUKIN, 2007; GULINELLO et al., 2005; PLAMONDON et al., 2006; SANDSTROM & ROWAN, 2007). Ainda, inúmeros estudos proporcionam evidências sugerindo que o efeito do E2 na indução da LTP seria devido à ativação de uma cascata intracelular levando a um aumento no número de receptores AMPA (KRAMAR et al., 2009; ZADRAN et al., 2009). Além disso, um estudo recente revelou que a LTP na região CA1 foi inibida como resultado de uma isquemia cerebral global induzida e que esta inibição foi consideravelmente revertida por uma única pré-administração de E2 (DAI et al., 2007). Nesta linha, uma possível explicação para nossos resultados com coumestrol, seria de que este poderia estar atuando de modo similar ao E2, ativando as mesmas vias de sinalização, aumentando o número de receptores AMPA e facilitando a aquisição de memória através da indução de LTP. Contudo, nenhum experimento em nível de mecanismo intracelular foi realizado neste sentido, não nos permitindo sugerir concretamente quaisquer evidências relacionadas a isso; porém, devido à similaridade estrutural e biológica existente entre estes dois compostos e, com base nos nossos resultados até então apresentados neste trabalho e na literatura, faz com que esta possibilidade seja considerada.

Outra explicação plausível de consideração nesse âmbito, seria a possibilidade de coumestrol exercer ação protetora e restauradora através do aumento dos receptores AMPA GluR2 pós isquemia global, como demonstrado anteriormente aqui neste capítulo. Nossos resultados forneceram evidências consistentes no sentido de

coumestrol atuar na regulação deste receptor no hipocampo pós-isquemia, o que nos levou a levantar a possibilidade de este aumento da expressão de GluR2 promovido por coumestrol estar associado à sua capacidade de prevenção de perda de memória. Mudanças a longo prazo na transmissão sináptica, como a LTP, são sabidas por serem o substrato para a aquisição da memória e aprendizado (CALABRESI et al., 2003; MALENKA & NICOLL, 1999; MARTIN & SHAPIRO, 2000). Por esta razão, entender os mecanismos envolvidos na LTP é de fundamental importância, não somente no estudo da neurociência, mas também no estudo da patofisiologia das desordens neurológicas. Muitos dos processos moleculares envolvidos na indução e manutenção da LTP são os mesmos ativados na excitotoxicidade (MCEACHERN & SHAW, 1996; CHAN & MATTSON, 1999; HUGHES et al., 1999). Então, uma associação entre LTP e neuropatologia é sugerida neste contexto.

A composição das subunidades dos receptores AMPA tem um importante papel nas mudanças na força sináptica como a LTP. Por exemplo, a LTP nas sinapses excitatórias nas células CA1 hipocámpais é pensado em ser primeiramente devido à inserção de subunidades contendo GluR2 em suas estruturas (MALINOW & MALENKA, 2002). Estudos recentes sugerem que a adição de subunidades contendo GluR2 em sua estrutura podem estabilizar a remodelação estrutural da LTP (YANG et al., 2009). Ainda nesta linha, um recente estudo publicado por WILTGEN et al. (2010) demonstrou que a depleção de GluR2 na região CA1 é crucial para o aprendizado e memória na tarefa do LAM, e que os camundongos geneticamente modificados (ou *knockout*) para GluR2 foram inábeis em aprender e reter a memória espacial. Eles sugerem que essa inabilidade seja devido à não presença do receptor GluR2 e que isso pode romper a manutenção da LTP por períodos longos, fazendo com que haja um prejuízo na manutenção do aprendizado e memória. Seguindo este raciocínio,

assumindo que o déficit de memória e a perda neuronal devido à isquemia global foram abrandados pela administração de coumestrol, e que esta ação neuroprotetora foi proporcionada pela regulação de GluR2 hipocampal promovida pela sua administração, pode-se sugerir que os efeitos de coumestrol contra os efeitos deletérios cognitivos envolvem, em parte, a regulação de GluR2 promovida pelo coumestrol. Considerando que a indução e manutenção da LTP estão prejudicadas durante a isquemia, podemos sugerir que a habilidade do coumestrol em resgatar o déficit de memória causado pela isquemia parece envolver mecanismos mencionados acima relacionados com a manutenção da LTP. Contudo, mais estudos relativos a este tema são necessários no sentido de entendermos os exatos mecanismos envolvidos nessas circunstâncias experimentais.

Concluindo, este terceiro capítulo apresentou os possíveis mecanismos envolvidos na neuroproteção mediada por coumestrol contra a excitotoxicidade glutamatérgica na isquemia global, em parte por sua possível regulação sobre os receptores GluR2 após a isquemia e, adicionalmente, através de sua ação benéfica contra o déficit de memória e aprendizado no contexto da isquemia global. Estes achados denotam implicações importantes na terapêutica da isquemia cerebral global e permitem inserir o coumestrol dentro de um contexto mais amplo, como sendo uma possível estratégia neuroprotetora contra a neurodegeneração.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho permitem-nos concluir que:

1. A administração de coumestrol preveniu a morte neuronal em longo prazo na região CA1 hipocampal em ratas fêmeas ovariectomizadas submetidas a 10 minutos de isquemia cerebral global.
2. A administração de coumestrol demonstrou ser neuroprotetora contra a isquemia induzida em ratos machos, e sua pré-administração foi capaz de prevenir a inibição da atividade da bomba de Na^+/K^+ -ATPase, inibida pelo insulto isquêmico global de 10 minutos.
3. A administração de coumestrol demonstrou conferir neuroproteção *in vitro* contra a excitotoxicidade glutamatérgica induzida.
4. Reverteu a redução proteica de GluR2 observada em todos os tempos de reperfusão pós-isquêmica.
5. A isquemia cerebral induzida não alterou significativamente os níveis proteicos da proteína Thorase e a administração de coumestrol não alterou estatisticamente os níveis proteicos desta proteína.
6. A administração de coumestrol reduziu os déficits cognitivos relacionados à aquisição de memória espacial e aprendizado.

Esses resultados em conjunto sugerem a ação neuroprotetora de coumestrol contra os mecanismos deletérios associados à isquemia cerebral global, sugerindo o potencial neuroprotetor inerente ao coumestrol contra a neurodegeneração provocada por eventos isquêmicos globais.

PERSPECTIVAS

Trabalharemos com as seguintes hipóteses futuras:

1. Se coumestrol possa ser igualmente neuroprotetor no contexto da isquemia cerebral focal;
2. Se sua ação antioxidante possa estar relacionada com a redução de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e peroxidação lipídica;
3. Se as vias associadas à neuroproteção estrogênica (ERK/MAPK, PI3-K/Akt, CREB) possam ser as mesmas vias ativadas na neuroproteção mediada por coumestrol;

REFERÊNCIAS

AL-NAKKASH, L., B. MARKUS, K. BOWDEN, L. M. BATIA, W. C. PROZIALECK *et al.*, 2009 Effects of acute and 2-day genistein treatment on cardiac function and ischemic tolerance in ovariectomized rats. *Gend Med* **6**: 488-497.

ALKAYED, N. J., S. J. MURPHY, R. J. TRAYSTMAN, P. D. HURN and V. M. MILLER, 2000 Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke* **31**: 161-168.

ALLEN, C. L., and U. BAYRAKTUTAN, 2009 Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* **4**: 461-470.

AMARAL, D. G., and M. P. WITTER, 1989 The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**: 571-591.

ARAI, T., I. TSUKAHARA, K. DOTE, K. KUZUME and H. IMON, 1986 A new model for total cerebral ischemia in dogs. *Resuscitation* **13**: 233-242.

ARONICA, E. M., J. A. GORTER, S. GROOMS, J. A. KESSLER, M. V. BENNETT *et al.*, 1998 Aurintricarboxylic acid prevents GLUR2 mRNA down-regulation and delayed neurodegeneration in hippocampal CA1 neurons of gerbil after global ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7115-7120.

AURIEL, E., and N. M. BORNSTEIN, 2010 Neuroprotection in acute ischemic stroke--current status. *J Cell Mol Med* **14**: 2200-2202.

BACIGALUPPI, M., G. COMI and D. M. HERMANN, 2010 Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. *Open Neurol J* **4**: 34-38.

BAGETTA, G., O. CHIAPPETTA, D. AMANTEA, M. IANNONE, D. ROTIROTI *et al.*, 2004 Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat. *Neurosci Lett* **368**: 87-91.

BAYER, S. A., 1985 Neuron production in the hippocampus and olfactory bulb of the adult rat brain: addition or replacement? *Ann N Y Acad Sci* **457**: 163-172.

BEHL, C., T. SKUTELLA, F. LEZOUALC'H, A. POST, M. WIDMANN *et al.*, 1997 Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* **51**: 535-541.

BENNETT, M. V., D. E. PELLEGRINI-GIAMPIETRO, J. A. GORTER, E. ARONICA, J. A. CONNOR *et al.*, 1996 The GluR2 hypothesis: Ca(++)-permeable AMPA receptors in delayed neurodegeneration. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **61**: 373-384.

BENVENISTE, H., J. DREJER, A. SCHOUSBOE and N. H. DIEMER, 1984 Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* **43**: 1369-1374.

BESANCON, E., S. GUO, J. LOK, M. TYMIANSKI and E. H. LO, 2008 Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 268-275.

BICKOFF, E. M., A. N. BOOTH, R. L. LYMAN, A. L. LIVINGSTON, C. R. THOMPSON *et al.*, 1957 Coumestrol, a new estrogen isolated from forage crops. *Science* **126**: 969-970.

BLOCK, F., and M. SCHWARZ, 1998 Global ischemic neuronal damage relates to behavioural deficits: a pharmacological approach. *Neuroscience* **82**: 791-803.

CAI, Q., R. O. RAHN and R. ZHANG, 1997 Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Lett* **119**: 99-107.

CALABRESI, P., D. CENTONZE, A. PISANI, L. CUPINI and G. BERNARDI, 2003 Synaptic plasticity in the ischaemic brain. *Lancet Neurol* **2**: 622-629.

CAPLAN, L. R., 2001 Protecting the brains of patients after heart surgery. *Arch Neurol* **58**: 549-550.

CHAN, P. H., 1996 Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* **27**: 1124-1129.

CHAN, S. L., and M. P. MATTSON, 1999 Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res* **58**: 167-190.

CHEN, J. Q., R. G. CONTRERAS, R. WANG, S. V. FERNANDEZ, L. SHOSHANI *et al.*, 2006 Sodium/potassium ATPase (Na⁺, K⁺-ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: A new paradigm for development of anti- breast cancer drugs? *Breast Cancer Res Treat* **96**: 1-15.

CHOI, D. W., 1988 Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**: 623-634.

CHOI, D. W., 1992 Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* **23**: 1261-1276.

CHOI, D. W., and J. Y. KOH, 1998 Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci* **21**: 347-375.

CHOI, S. Y., T. Y. HA, J. Y. AHN, S. R. KIM, K. S. KANG *et al.*, 2008 Estrogenic activities of isoflavones and flavones and their structure-activity relationships. *Planta Med* **74**: 25-32.

CIMAROSTI, H., SIQUEIRA, I.R., ZAMIN, L.L., BALK, R., FROZZA, R., DALMAZ, C., NETTO, C.A., SALBEGO, C. 2005 Neuroprotection and protein damage prevention by estradiol replacement in rat hippocampal slices exposed to oxigen-glucose deprivation. *Neurochem Res* 30:(4): 583-9.

CRAIG, A. M., C. D. BLACKSTONE, R. L. HUGANIR and G. BANKER, 1993 The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* **10**: 1055-1068.

CYR, M., O. GHRIBI and T. DI PAOLO, 2000 Regional and selective effects of oestradiol and progesterone on NMDA and AMPA receptors in the rat brain. *J Neuroendocrinol* **12**: 445-452.

DAI, C., D. LIANG, H. LI, M. SASAKI, T. M. DAWSON *et al.*, 2010 Functional identification of neuroprotective molecules. *PLoS One* **5**: e15008.

DALLAPORTA, B., T. HIRSCH, S. A. SUSIN, N. ZAMZAMI, N. LAROCLETTE *et al.*, 1998 Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *J Immunol* **160**: 5605-5615.

DAWSON, V. L., and T. M. DAWSON, 2004 Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* **36**: 287-294.

DAWSON, V. L., and T. M. DAWSON, 2006 Mining for survival genes. *Biochem Soc Trans* **34**: 1307-1309.

DE LA OSSA, N. P., J. SANCHEZ-OJANGUREN, E. PALOMERAS, M. MILLAN, J. F. ARENILLAS *et al.*, 2008 Influence of the stroke code activation source on the outcome of acute ischemic stroke patients. *Neurology* **70**: 1238-1243.

DE SOUZA WYSE, A. T., E. L. STRECK, P. WORM, A. WAJNER, F. RITTER *et al.*, 2000 Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* **25**: 971-975.

DEAN, R. T., 1987 Free radicals, membrane damage and cell-mediated cytolysis. *Br J Cancer Suppl* **8**: 39-45.

DHANDAPANI, K. M., and D. W. BRANN, 2002 Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain. *Biol Reprod* **67**: 1379-1385.

DIEMER, N. H., F. F. JOHANSEN, H. BENVENISTE, T. BRUHN, M. BERG *et al.*, 1993 Ischemia as an excitotoxic lesion: protection against hippocampal nerve cell loss by denervation. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **57**: 94-101.

DINGLEDINE, R., K. BORGES, D. BOWIE and S. F. TRAYNELIS, 1999 The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**: 7-61.

DIRNAGL, U., C. IADECOLA and M. A. MOSKOWITZ, 1999 Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**: 391-397.

DONG, H., R. J. O'BRIEN, E. T. FUNG, A. A. LANAHAN, P. F. WORLEY *et al.*, 1997 GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature* **386**: 279-284.

DONZELLI, A., D. BRAIDA, A. FINARDI, V. CAPURRO, A. E. VALSECCHI *et al.*, 2010 Neuroprotective effects of genistein in Mongolian gerbils: estrogen receptor-beta involvement. *J Pharmacol Sci* **114**: 158-167.

DUBAL, D. B., M. L. KASHON, L. C. PETTIGREW, J. M. REN, S. P. FINKLESTEIN *et al.*, 1998 Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**: 1253-1258.

DUGAN, L. L., and D. W. CHOI, 1994 Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann Neurol* **35 Suppl**: S17-21.

DZURBA, A., A. ZIEGELHOFFER, N. VRBJAR, J. STYK and J. SLEZAK, 1997 Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma. *Mol Cell Biochem* **176**: 113-118.

ETGEN, A. M., T. JOVER-MENGUAL and R. S. ZUKIN, 2011 Neuroprotective actions of estradiol and novel estrogen analogs in ischemia: translational implications. *Front Neuroendocrinol* **32**: 336-352.

FARBER, J. L., 1981 The role of calcium in cell death. *Life Sci* **29**: 1289-1295.

FAROOQUI, A. A., and L. A. HORROCKS, 1994 Excitotoxicity and neurological disorders: involvement of membrane phospholipids. *Int Rev Neurobiol* **36**: 267-323.

FILARDO, E. J., J. A. QUINN, A. R. FRACKELTON, JR. and K. I. BLAND, 2002 Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and

cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* **16**: 70-84.

FILARDO, E. J., and P. THOMAS, 2005 GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab* **16**: 362-367.

FONNUM, F., 1984 Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* **42**: 1-11.

FRIED, R. L., and T. S. NOWAK, JR., 1987 Opioid peptide levels in gerbil brain after transient ischemia: lasting depletion of hippocampal dynorphin. *Stroke* **18**: 765-770.

FURLAN, A. J., I. L. KATZAN and L. R. CAPLAN, 2003 Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* **5**: 171-180.

GARCIA-SEGURA, L. M., I. AZCOITIA and L. L. DONCARLOS, 2001 Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* **63**: 29-60.

GAZZALEY, A. H., N. G. WEILAND, B. S. MCEWEN and J. H. MORRISON, 1996 Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. *J Neurosci* **16**: 6830-6838.

GEIGER, J. R., T. MELCHER, D. S. KOH, B. SAKMANN, P. H. SEEBURG *et al.*, 1995 Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* **15**: 193-204.

GELINAS, S., and M. G. MARTINOLI, 2002 Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* **70**: 90-96.

GIBSON, C. L., L. J. GRAY, S. P. MURPHY and P. M. BATH, 2006 Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**: 1103-1113.

GIDDAY, J. M., 2006 Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* **7**: 437-448.

GINSBERG, M. D., 1997 The new language of cerebral ischemia. *AJNR Am J Neuroradiol* **18**: 1435-1445.

GINSBERG, M. D., 2008 Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* **55**: 363-389.

GIULIANI, D., C. MIONI, D. ALTAVILLA, S. LEONE, C. BAZZANI *et al.*, 2006 Both early and delayed treatment with melanocortin 4 receptor-stimulating melanocortins produces neuroprotection in cerebral ischemia. *Endocrinology* **147**: 1126-1135.

GORTER, J. A., J. J. PETROZZINO, E. M. ARONICA, D. M. ROSENBAUM, T. OPITZ *et al.*, 1997 Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci* **17**: 6179-6188.

GOULD, E., C. S. WOOLLEY, M. FRANKFURT and B. S. MCEWEN, 1990 Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* **10**: 1286-1291.

GULINELLO, M., D. LEBESGUE, T. JOVER-MENGUAL, R. S. ZUKIN and A. M. ETGEN, 2006 Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. *Horm Behav* **49**: 246-260.

HANLEY, J. G., 2008 PICK1: a multi-talented modulator of AMPA receptor trafficking. *Pharmacol Ther* **118**: 152-160.

HARUKUNI, I., and A. BHARDWAJ, 2006 Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin* **24**: 1-21.

HAWK, T., Y. Q. ZHANG, G. RAJAKUMAR, A. L. DAY and J. W. SIMPKINS, 1998 Testosterone increases and estradiol decreases middle cerebral artery occlusion lesion size in male rats. *Brain Res* **796**: 296-298.

HERTZ, L., 2008 Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology* **55**: 289-309.

HOGERVORST, E., T. SADJIMIM, A. YESUFU, P. KREAGER and T. B. RAHARDJO, 2008 High tofu intake is associated with worse memory in elderly Indonesian men and women. *Dement Geriatr Cogn Disord* **26**: 50-57.

HONG, J. T., S. R. RYU, H. J. KIM, J. K. LEE, S. H. LEE *et al.*, 2001 Protective effect of green tea extract on ischemia/reperfusion-induced brain injury in Mongolian gerbils. *Brain Res* **888**: 11-18.

HUGHES, P. E., T. ALEXI, M. WALTON, C. E. WILLIAMS, M. DRAGUNOW *et al.*, 1999 Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog Neurobiol* **57**: 421-450.

ITO, U., M. SPATZ, J. T. WALKER, JR. and I. KLATZO, 1975 Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol* **32**: 209-223.

JIN, S. E., Y. K. SON, B. S. MIN, H. A. JUNG and J. S. CHOI, 2012 Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots. *Arch Pharm Res* **35**: 823-837.

JOVER-MENGUAL, T., R. S. ZUKIN and A. M. ETGEN, 2007 MAPK signaling is critical to estradiol protection of CA1 neurons in global ischemia. *Endocrinology* **148**: 1131-1143.

JOVER, T., H. TANAKA, A. CALDERONE, K. OGURO, M. V. BENNETT *et al.*, 2002 Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents

activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J Neurosci* **22**: 2115-2124.

KESSELS, H. W., and R. MALINOW, 2009 Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* **61**: 340-350.

KIM, J. W., Y. C. JIN, Y. M. KIM, S. RHIE, H. J. KIM *et al.*, 2009 Daidzein administration in vivo reduces myocardial injury in a rat ischemia/reperfusion model by inhibiting NF-kappaB activation. *Life Sci* **84**: 227-234.

KIRINO, T., 1982 Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* **239**: 57-69.

KIRINO, T., A. TAMURA and K. SANO, 1984 Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* **64**: 139-147.

KLEINSCHNITZ, C., H. GRUND, K. WINGLER, M. E. ARMITAGE, E. JONES *et al.*, 2010 Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* **8**.

KOH, J. Y., S. W. SUH, B. J. GWAG, Y. Y. HE, C. Y. HSU *et al.*, 1996 The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* **272**: 1013-1016.

KRAMAR, E. A., L. Y. CHEN, C. S. REX, C. M. GALL and G. LYNCH, 2009 Estrogen's Place in the Family of Synaptic Modulators. *Mol Cell Pharmacol* **1**: 258-262.

KRIEGLSTEIN, K., S. RICHTER, L. FARKAS, N. SCHUSTER, N. DUNKER *et al.*, 2000 Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death. *Nat Neurosci* **3**: 1085-1090.

KUDO, T., M. TAKEDA, S. TANIMUKAI and T. NISHIMURA, 1993 Neuropathologic changes in the gerbil brain after chronic hypoperfusion. *Stroke* **24**: 259-264; discussion 265.

KUIPER, G. G., P. J. SHUGHRUE, I. MERCHENTHALER and J. A. GUSTAFSSON, 1998 The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* **19**: 253-286.

LAKHAN, S. E., A. KIRCHGESSNER and M. HOFER, 2009 Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* **7**: 97.

LEBESGUE, D., A. REYNA-NEYRA, X. HUANG and A. M. ETGEN, 2009 GPR30 differentially regulates short latency responses of luteinising hormone and prolactin secretion to oestradiol. *J Neuroendocrinol* **21**: 743-752.

LEPHART, E. D., K. D. SETCHELL and T. D. LUND, 2005 Phytoestrogens: hormonal action and brain plasticity. *Brain Res Bull* **65**: 193-198.

LEPHART, E. D., T. W. WEST, K. S. WEBER, R. W. RHEES, K. D. SETCHELL *et al.*, 2002 Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicol Teratol* **24**: 5-16.

LIAO, E. Y., X. H. LUO, X. G. DENG and X. P. WU, 2001 Effects of 17beta-estradiol on the expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-2 in human osteoblastic MG-63 cell cultures. *J Endocrinol Invest* **24**: 876-881.

LISMAN, J., H. SCHULMAN and H. CLINE, 2002 The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* **3**: 175-190.

LIU, B., M. LIAO, J. G. MIELKE, K. NING, Y. CHEN *et al.*, 2006 Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J Neurosci* **26**: 5309-5319.

LIU, M. H., F. Y. TSUANG, S. Y. SHEU, J. S. SUN and C. M. SHIH, 2011 The protective effects of coumestrol against amyloid-beta peptide- and lipopolysaccharide-induced toxicity on mice astrocytes. *Neurol Res* **33**: 663-672.

LIU, S., L. LAU, J. WEI, D. ZHU, S. ZOU *et al.*, 2004 Expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron* **43**: 43-55.

LIU, S. J., and R. S. ZUKIN, 2007 Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci* **30**: 126-134.

LO, E. H., T. DALKARA and M. A. MOSKOWITZ, 2003 Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* **4**: 399-415.

LUND, T. D., T. ROVIS, W. C. CHUNG and R. J. HANDA, 2005 Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology* **146**: 797-807.

LYDEN, P. D., and J. A. ZIVIN, 1993 Hemorrhagic transformation after cerebral ischemia: mechanisms and incidence. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **5**: 1-16.

MALENKA, R. C., and R. A. NICOLL, 1999 Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* **285**: 1870-1874.

MALINOW, R., and R. C. MALENKA, 2002 AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* **25**: 103-126.

MARTIN, D. A., B. COMBADIERE, F. HORNUNG, D. JIANG, H. MCFARLAND *et al.*, 1998 Molecular genetic studies in lymphocyte apoptosis and human autoimmunity. *Novartis Found Symp* **215**: 73-82; discussion 82-91.

MARTIN, P. D., and M. L. SHAPIRO, 2000 Disparate effects of long-term potentiation on evoked potentials and single CA1 neurons in the hippocampus of anesthetized rats. *Hippocampus* **10**: 207-212.

MCCULLOUGH, L. D., and P. D. HURN, 2003 Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends Endocrinol Metab* **14**: 228-235.

MCEACHERN, J. C., and C. A. SHAW, 1996 An alternative to the LTP orthodoxy: a plasticity-pathology continuum model. *Brain Res Brain Res Rev* **22**: 51-92.

MCEWEN, B., 2002 Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* **57**: 357-384.

MELLER, R., SIMON, R.P. 2013 Tolerance to ischemia - an increasingly complex. *Transl stroke Res* 4(1): 40-50

MELIS, M. G., C. TROFFA, P. MANUNTA, P. PINNA PARGAGLIA, A. SORO *et al.*, 1990 [Effect of menstrual cycle hormones on cation transport in the red-cell membrane]. *Boll Soc Ital Biol Sper* **66**: 679-684.

MITANI, A., H. YANASE, K. SAKAI, Y. WAKE and K. KATAOKA, 1993 Origin of intracellular Ca²⁺ elevation induced by in vitro ischemia-like condition in hippocampal slices. *Brain Res* **601**: 103-110.

MITCHELL, J. H., P. T. GARDNER, D. B. MCPHAIL, P. C. MORRICE, A. R. COLLINS *et al.*, 1998 Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch Biochem Biophys* **360**: 142-148.

MITRA, S. W., E. HOSKIN, J. YUDKOVITZ, L. PEAR, H. A. WILKINSON *et al.*, 2003 Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* **144**: 2055-2067.

MORRIS, R. G., P. GARRUD, J. N. RAWLINS and J. O'KEEFE, 1982 Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**: 681-683.

MORRIS, R. G., J. J. HAGAN and J. N. RAWLINS, 1986 Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. *Q J Exp Psychol B* **38**: 365-395.

MOSER, E., M. B. MOSER and P. ANDERSEN, 1993 Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* **13**: 3916-3925.

MURAKAMI, K., T. KONDO, M. KAWASE and P. H. CHAN, 1998 The development of a new mouse model of global ischemia: focus on the relationships between ischemia duration, anesthesia, cerebral vasculature, and neuronal injury following global ischemia in mice. *Brain Res* **780**: 304-310.

MURPHY, D. D., N. B. COLE and M. SEGAL, 1998 Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11412-11417.

NEUMANN, J. T., C. H. COHAN, K. R. DAVE, C. B. WRIGHT and M. A. PEREZ-PINZON, 2012 Global Cerebral Ischemia: Synaptic and Cognitive Dysfunction. *Curr Drug Targets*.

NEWPHER, T. M., and M. D. EHLERS, 2008 Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron* **58**: 472-497.

NICHOLLS, M. G., and A. M. RICHARDS, 1999 The salt dilemma: some answers, many questions. *Med J Aust* **170**: 178-180.

NIKONENKO, A. G., L. RADENOVIC, P. R. ANDJUS and G. G. SKIBO, 2009 Structural features of ischemic damage in the hippocampus. *Anat Rec (Hoboken)* **292**: 1914-1921.

NITATORI, T., N. SATO, S. WAGURI, Y. KARASAWA, H. ARAKI *et al.*, 1995 Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* **15**: 1001-1011.

NUMAKAWA, Y., T. MATSUMOTO, D. YOKOMAKU, T. TAGUCHI, E. NIKI *et al.*, 2007 17beta-estradiol protects cortical neurons against oxidative stress-induced cell death through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase and in the accumulation of intracellular calcium. *Endocrinology* **148**: 627-637.

NYAKAS, C., B. BUWALDA and P. G. LUITEN, 1996 Hypoxia and brain development. *Prog Neurobiol* **49**: 1-51.

OGURO, K., N. OGURO, T. KOJIMA, S. Y. GROOMS, A. CALDERONE *et al.*, 1999 Knockdown of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons. *J Neurosci* **19**: 9218-9227.

OLNEY, J. W., 1969 Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* **28**: 455-474.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E., M. V. BENNETT and R. S. ZUKIN, 1992 Are Ca(2+)-permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain? *Neurosci Lett* **144**: 65-69.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E., J. A. GORTER, M. V. BENNETT and R. S. ZUKIN, 1997 The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* **20**: 464-470.

PENG, P. L., X. ZHONG, W. TU, M. M. SOUNDARAPANDIAN, P. MOLNER *et al.*, 2006 ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* **49**: 719-733.

PEREZ, S. E., E. Y. CHEN and E. J. MUFSON, 2003 Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* **145**: 117-139.

PETITO, C. K., E. FELDMANN, W. A. PULSINELLI and F. PLUM, 1987 Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* **37**: 1281-1286.

PLAMONDON, H., A. MORIN and C. CHARRON, 2006 Chronic 17beta-estradiol pretreatment and ischemia-induced hippocampal degeneration and memory impairments: a 6-month survival study. *Horm Behav* **50**: 361-369.

PORTERA-CAILLIAU, C., D. L. PRICE and L. J. MARTIN, 1997 Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol* **378**: 70-87.

PRICE, C. J., C. J. MUMMERY, C. J. MOORE, R. S. FRAKOWIAK and K. J. FRISTON, 1999 Delineating necessary and sufficient neural systems with functional imaging studies of neuropsychological patients. *J Cogn Neurosci* **11**: 371-382.

PROSSNITZ, E. R., J. B. ARTERBURN and L. A. SKLAR, 2007 GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol* **265-266**: 138-142.

PROSSNITZ, E. R., J. B. ARTERBURN, H. O. SMITH, T. I. OPREA, L. A. SKLAR *et al.*, 2008a Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* **70**: 165-190.

PROSSNITZ, E. R., L. A. SKLAR, T. I. OPREA and J. B. ARTERBURN, 2008b GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 116-123.

PU, F., K. MISHIMA, N. EGASHIRA, Y. AKIYOSHI, A. X. LIU *et al.*, 2005 Post-ischemic treatment with toki-shakuyaku-san (tang-gui-shao-yao-san) prevents the impairment of spatial memory induced by repeated cerebral ischemia in rats. *Am J Chin Med* **33**: 475-489.

PULSINELLI, W. A., and J. B. BRIERLEY, 1979 A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* **10**: 267-272.

PULSINELLI, W. A., J. B. BRIERLEY and F. PLUM, 1982 Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* **11**: 491-498.

RAVAL, A. P., H. BRAMLETT and M. A. PEREZ-PINZON, 2006 Estrogen preconditioning protects the hippocampal CA1 against ischemia. *Neuroscience* **141**: 1721-1730.

ROSENBERG, N., M. CHEN and S. PRABHAKARAN, 2010 New devices for treating acute ischemic stroke. *Recent Pat CNS Drug Discov* **5**: 118-134.

SANDSTROM, N. J., and M. H. ROWAN, 2007 Acute pretreatment with estradiol protects against CA1 cell loss and spatial learning impairments resulting from transient global ischemia. *Horm Behav* **51**: 335-345.

SCHARFMAN, H. E., and N. J. MACLUSKY, 2005 Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue? *Trends Neurosci* **28**: 79-85.

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

SCHREIHOFFER, D. A., K. D. DO and A. M. SCHREIHOFFER, 2005 High-soy diet decreases infarct size after permanent middle cerebral artery occlusion in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**: R103-108.

SEEBURG, P. H., and J. HARTNER, 2003 Regulation of ion channel/neurotransmitter receptor function by RNA editing. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 279-283.

SHELDON, R. A., J. J. HALL, L. J. NOBLE and D. M. FERRIERO, 2001 Delayed cell death in neonatal mouse hippocampus from hypoxia-ischemia is neither apoptotic nor necrotic. *Neurosci Lett* **304**: 165-168.

SHENG, M., and C. C. HOOGENRAAD, 2007 The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* **76**: 823-847.

SHEPHERD, J. D., and R. L. HUGANIR, 2007 The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 613-643.

SHUAIB, A., and M. S. HUSSAIN, 2008 The past and future of neuroprotection in cerebral ischaemic stroke. *Eur Neurol* **59**: 4-14.

SIESJO, B. K., 1988 Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med* **16**: 954-963.

SILVER, I. A., and M. ERECINSKA, 1992 Ion homeostasis in rat brain in vivo: intra- and extracellular $[Ca^{2+}]$ and $[H^+]$ in the hippocampus during recovery from short-term, transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **12**: 759-772.

SIMON, R. P., T. GRIFFITHS, M. C. EVANS, J. H. SWAN and B. S. MELDRUM, 1984 Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **4**: 350-361.

SIMPKINS, J. W., G. RAJAKUMAR, Y. Q. ZHANG, C. E. SIMPKINS, D. GREENWALD *et al.*, 1997 Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J Neurosurg* **87**: 724-730.

SINGER, C. A., X. A. FIGUEROA-MASOT, R. H. BATCHELOR and D. M. DORSA, 1999 The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* **19**: 2455-2463.

SINGER, C. A., K. L. ROGERS, T. M. STRICKLAND and D. M. DORSA, 1996 Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett* **212**: 13-16.

SMITH, M. L., G. BENDEK, N. DAHLGREN, I. ROSEN, T. WIELOCH *et al.*, 1984 Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* **69**: 385-401.

SOMMER, B., M. KOHLER, R. SPRENGEL and P. H. SEEBURG, 1991 RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* **67**: 11-19.

SOMMER, B., and P. H. SEEBURG, 1992 Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 291-296.

TANAKA, H., H. YOKOTA, T. JOVER, I. CAPPUCIO, A. CALDERONE *et al.*, 2004 Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. *J Neurosci* **24**: 2750-2759.

THIYAGARAJAN, M., and S. S. SHARMA, 2004 Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci* **74**: 969-985.

TORP, R., B. ARVIN, E. LE PEILLET, A. G. CHAPMAN, O. P. OTTERSEN *et al.*, 1993 Effect of ischaemia and reperfusion on the extra- and intracellular distribution of glutamate, glutamine, aspartate and GABA in the rat hippocampus, with a note on the effect of the sodium channel blocker BW1003C87. *Exp Brain Res* **96**: 365-376.

TOUNG, T. J., R. J. TRAYSTMAN and P. D. HURN, 1998 Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke* **29**: 1666-1670.

TRAYSTMAN, R. J., 2003 Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* **44**: 85-95.

VISCOLI, C. M., L. M. BRASS, W. N. KERNAN, P. M. SARREL, S. SUISSA *et al.*, 2001 A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke. *N Engl J Med* **345**: 1243-1249.

WAHLGREN, N. G., and N. AHMED, 2004 Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* **17 Suppl 1**: 153-166.

WANG, H., M. LUO, C. LI and G. WANG, 2011 Propofol post-conditioning induced long-term neuroprotection and reduced internalization of AMPAR GluR2 subunit in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Neurochem* **119**: 210-219.

WEIGL, M., G. TENZE, B. STEINLECHNER, K. SKHIRTADZE, G. REINING *et al.*, 2005 A systematic review of currently available pharmacological neuroprotective agents as a sole intervention before anticipated or induced cardiac arrest. *Resuscitation* **65**: 21-39.

WEIR, N. U., and M. S. DENNIS, 1997 Meeting the challenge of stroke. *Scott Med J* **42**: 145-147.

WEISS, J. H., and S. L. SENSI, 2000 Ca²⁺-Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci* **23**: 365-371.

WENTHOLD, R. J., R. S. PETRALIA, J. BLAHOS, II and A. S. NIEDZIELSKI, 1996 Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* **16**: 1982-1989.

WHITE, B. C., J. M. SULLIVAN, D. J. DEGRACIA, B. J. O'NEIL, R. W. NEUMAR *et al.*, 2000 Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* **179**: 1-33.

WHITTEN, P. L., H. B. PATISAUL and L. J. YOUNG, 2002 Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicol Teratol* **24**: 47-54.

WILTGEN, B. J., G. A. ROYLE, E. E. GRAY, A. ABDIPRANOTO, N. THANGTHAENG *et al.*, 2010 A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS One* **5**.

WOOLLEY, C. S., and B. S. MCEWEN, 1994 Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *J Neurosci* **14**: 7680-7687.

XU, Z. C., and W. A. PULSINELLI, 1996 Electrophysiological changes of CA1 pyramidal neurons following transient forebrain ischemia: an in vivo intracellular recording and staining study. *J Neurophysiol* **76**: 1689-1697.

YANG, S. H., R. LIU, S. S. WU and J. W. SIMPKINS, 2003 The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci* **1007**: 101-107.

YANG, S. H., J. SHI, A. L. DAY and J. W. SIMPKINS, 2000 Estradiol exerts neuroprotective effects when administered after ischemic insult. *Stroke* **31**: 745-749; discussion 749-750.

YANG, Y., K. TAKEUCHI, A. RODENAS-RUANO, Y. TAKAYASU, M. V. BENNETT *et al.*, 2009 Developmental switch in requirement for PKA RIIbeta in NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses. *Neuropharmacology* **56**: 56-65.

YANO, S., M. MORIOKA, K. FUKUNAGA, T. KAWANO, T. HARA *et al.*, 2001 Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**: 351-360.

ZADRAN, S., Q. QIN, X. BI, H. ZADRAN, Y. KIM *et al.*, 2009 17-Beta-estradiol increases neuronal excitability through MAP kinase-induced calpain activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 21936-21941.

ZEMKE, D., J. L. SMITH, M. J. REEVES and A. MAJID, 2004 Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology* **25**: 895-904.

ZHAN, R. Z., C. WU, H. FUJIHARA, K. TAGA, S. QI *et al.*, 2001 Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c From mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**: 529-540.

ZHANG, J., Y. WANG, Z. CHI, M. J. KEUSS, Y. M. PAI *et al.*, 2011 The AAA+ ATPase Thorase regulates AMPA receptor-dependent synaptic plasticity and behavior. *Cell* **145**: 284-299.

ZHAO, Q., M. L. SMITH and B. K. SIESJO, 1994 The omega-conopeptide SNX-111, an N-type calcium channel blocker, dramatically ameliorates brain damage due to transient focal ischaemia. *Acta Physiol Scand* **150**: 459-461.

ZOLA-MORGAN, S., and L. R. SQUIRE, 1986 Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behav Neurosci* **100**: 155-160.