

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

***EFEITO NEUROPROTETOR DO RESVERATROL NO MODELO DE
DEMÊNCIA POR HIOPERFUSÃO ENCEFÁLICA CRÔNICA EM RATOS***

Janine Beatriz Ramos Anastácio

Porto Alegre

2012

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

***EFEITO NEUROPROTETOR DO RESVERATROL NO MODELO DE
DEMÊNCIA POR HIPOPERFUSÃO ENCEFÁLICA CRÔNICA EM RATOS***

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

Janine Beatriz Ramos Anastácio

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline de Souza Pagnussat

Porto Alegre

2012

Dedico este trabalho aos meus maiores mestres, meus pais José e Derli

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo incentivo, apoio e paciência em todos os momentos difíceis, pelo amor incondicional que me fortalece e por acreditarem nesse sonho junto comigo. Nunca mediram esforços e abdicaram de muitos dos seus desejos para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigada pelo exemplo de dedicação e sábias lições de perseverança. Amo vocês!

A minha irmã Vivian Elisandra por muitas vezes despende seu restrito tempo para me auxiliar com seu excelente conhecimento em língua inglesa. Obrigada pelo carinho e colaboração!

A co-orientadora Prof^a. Dr^a Aline Pagnussat pelo esplêndido conhecimento compartilhado, por despertar cada dia mais o meu interesse pela pesquisa, por acreditar em mim, pela paciência e incentivo nos diversos momentos e, sobretudo, pela sua amizade essencial. Minha referência profissional!

Ao orientador Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto pela sabedoria, disponibilidade, incentivo à pesquisa, pela oportunidade, amizade e orientação ao longo destes anos!

Aos colegas e professores colaboradores deste trabalho: Prof^a. Dr^a Carla Dalmaz, Cristie Noschang e Rachel Krolow.

Aos colegas de laboratório que se revelaram grandes amigos e parceiros ao longo dessa trajetória: Débora Abreu, Eduardo Sanches (obrigada pelos ensinamentos e auxílios nas avaliações comportamentais), Cibele Castro, Régis Mestriner, Lígia Boisserand, Jaqueline Carletti, Fernanda Cechetti, Nathália Moura, Daniele Ferreira. Obrigada pelo auxílio, convívio e aprendizado!

Aos meus fiéis e amados bichinhos de estimação Tyson e Zuk pelo companheirismo. Obrigada pelas incansáveis esperas na porta e pela companhia deitados aos meus pés em muitos dos meus momentos de estudo! Sempre me divertindo com suas travessuras e me confortando com seus carinhos incondicionais. Amigos pra cachorro!

Agradeço à UFRGS (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Demência.....	1
1.2 Modelos animais.....	4
1.3 Trans-resveratrol (3,5,4,'-tri-hidroxi-estilbeno) (RSV).....	11
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. ARTIGO.....	16
3.1 Resveratrol Treatment has neuroprotective effects and reduces cognitive impairment after chronic cerebral hypoperfusion – Submetido ao European Journal of Neuroscience.....	16
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÕES.....	46
6. PERSPECTIVAS.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

DV – Demência Vascular

FSC – Fluxo Sanguíneo Cerebral

HCC – Hipoperfusão Cerebral Crônica

MCAO – Oclusão da Artéria Cerebral Média

NAD – Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NF-kB – Fator de transcrição nuclear kappa B

NGF – Fator de Crescimento do Nervos

NO – Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico Sintase

PI3K – Fosfatidilinositol 3-Quinase

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RSV – Trans resveratrol

SNC – Sistema Nervoso Central

TrKA – Tirosina Quinase A

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

2VO – Oclusão de 2 Vasos

4VO – Oclusão de 4 Vasos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases sucessivas da hipoperfusão cerebral crônica	6
Figura 2. Vias de sinalização do NGF (Fator de crescimento do nervo).....	10
Figura 3. Estrutura química dos isômeros do resveratrol.....	12
Figura 4. Vias de sinalização do RSV (Trans resveratrol).....	13
ARTIGO	
Figura 1. Linha do tempo ilustrando os eventos experimentais.....	36
Figura 2. Desempenho no protocolo de Memória de Referência na tarefa do Labirinto Aquático de Morris.....	37
Figura 3. Desempenho no protocolo de Memória de Trabalho na tarefa do 38 Labirinto Aquático de Morris.....	
Figura 4. Representação fotomicrográfica da região CA1 do hipocampo....	39
Figura 5. Densidade de neurônios sobreviventes.....	40
Figura 6. Análise da expressão de NGF (Fator de crescimento do nervo)..	41

RESUMO

A hipoperfusão cerebral crônica (HCC) é um importante fator de risco para o declínio cognitivo e outras disfunções cerebrais, tais como Doença de Alzheimer e Demência Vascular. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito neuroprotetor do Resveratrol (RSV), avaliando parâmetros comportamentais, bioquímicos e morfológicos, em um modelo experimental de Demência Vascular. Ratos Wistar adultos foram submetidos ao modelo modificado da HCC através da oclusão permanente de 2 vasos (2VO) e tratamento diário, iniciado uma hora após oclusão permanente dos vasos, com injeções intraperitoneais (20 mg/kg) de RSV durante 7 dias. Os testes comportamentais foram realizados entre o 35° e 45° dias após a cirurgia - 2VO, através da tarefa do labirinto aquático de Morris, na qual os animais foram avaliados quanto ao desempenho da memória espacial. Ao final dos testes comportamentais, um grupo dos animais foi perfundido transcárdiacamente para análise histológica, outro grupo foi submetido à eutanásia em 3 tempos (3, 14 e 45 dias após a lesão isquêmica) para avaliação da expressão de NGF (fator de crescimento do nervo). Os resultados demonstraram que o tratamento com RSV atenuou significativamente a morte das células piramidais na região CA1 do hipocampo e preveniu o déficit da memória espacial. O aumento da expressão de NGF foi evidenciado no 3° dia após indução da HCC em todos os animais isquêmicos e no 45° dia após indução da HCC nos animais tratados com RSV. Com base nesses dados, hipotetizamos que o aumento, em longo prazo, na expressão de NGF no hipocampo após a HCC pode caracterizar uma das vias envolvidas nos mecanismos neuroprotetores do RSV.

Palavras-chave: demência vascular, hipoperfusão cerebral crônica, resveratrol

ABSTRACT

Chronic cerebral hypoperfusion (CCH) is an important risk factor for cognitive decline and other brain dysfunctions, such as Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. The aim of the present study was to investigate the neuroprotective effect of Resveratrol (RSV) on behavioral, biochemical and morphological parameters in an experimental model of Vascular Dementia. Adult Wistar rats were submitted to the CCH modified model by means of permanent 2-vessel occlusion (2VO) and daily treatment, initiated one hour after permanent vessel occlusion, with intraperitoneal injections (20 mg/kg) of RSV for 7 days. Behavioral testing was performed between the 35th and the 45th day after 2VO surgery in the Morris Water Maze task, allowing for the evaluation of spatial memory function. At the end of the behavioral assessment, half of the animals were transcardially perfused for histological analysis and the remaining were euthanized in 3 times (3, 14 and 45 days after ischemic injury) for NGF expression evaluation (neural growth factor). Results demonstrate that the treatment with RSV significantly attenuated pyramidal cell death in CA1 hippocampal field and prevented spatial memory impairment. The increase of NGF expression was evidenced on the 3rd day after CCH induction in all ischemic animals and on the 45th day after CCH induction in animals treated with RSV. On the basis of these data, we hypothesize that the long term increase in NGF expression in the hippocampus after CCH may characterize one pathway involved in the neuroprotective mechanisms of RSV.

Keywords: vascular dementia, chronic cerebral hypoperfusion, resveratrol

1. INTRODUÇÃO

1.1 Demência

A demência é um termo genérico que descreve disfunções crônicas ou progressivas da função cortical e subcortical que resulta em um complexo declínio cognitivo. As mudanças cognitivas são comumente acompanhadas por distúrbios de humor, comportamento e personalidade. Essas mudanças tendem a aumentar ao longo dos anos em decorrência do aumento da longevidade e alterações dos fatores de risco decorrentes dos cuidados com a saúde e estilo de vida (SKOOG *et al.*, 2012). Em relação aos fatores de risco associados às demências, podemos classificá-los em modificáveis, incluindo hipertensão, tabagismo e desordens do metabolismo lipídico, e não modificáveis, incluindo idade, sexo e etnia (CHUI, 2012; JEDRZIEWSKI *et al.*, 2005).

A síndrome clínica da demência consiste em alguns subtipos que são distintos em sua etiologia, quadro clínico e tratamento, dentre eles, a Demência Vascular (DV) (ALLADI *et al.*, 2011). A DV é usualmente descrita como uma doença de comprometimento cognitivo resultante de acometimentos cerebrovasculares e lesões cerebrais isquêmicas ou hemorrágicas (IEMOLO *et al.*, 2009), o que determina uma condição clínica e anatomicamente heterogênea e com uma progressão de acordo com a sua patologia de base. Essa heterogeneidade deriva de aspectos fisiopatológicos, tais como: presença de lesão intracerebral isquêmica ou hemorrágica encontradas em artérias de grande ou pequeno calibre (ENGELHARDT *et al.*, 2011), local e tamanho da lesão, todos aspectos culminando em perda neuronal e déficits cognitivos

(DESMOND, 2004). As duas principais causas da DV são o estresse oxidativo e a isquemia. O estresse oxidativo pode ser tanto a causa quanto a consequência da isquemia cerebral (LI *et al.*, 2009) que, eventualmente, leva a redução de proteínas essenciais para o processo de aprendizado e memória, os quais estão prejudicados conforme a evolução da demência (BELL *et al.*, 2009).

A DV, após a Doença de Alzheimer que é a forma mais comum das demências cerebrais e que afeta aproximadamente 5% da população com idade entre 65 anos (SAHATEVAN *et al.*, 2012), é a segunda causa mais comum de demências, atinge cerca de 10 a 50% dentre todas elas e também prevalece em indivíduos acima de 65 anos (ZHANG *et al.*, 2012; DESMOND, 2004; ROCKWOOD *et al.*, 2000).

A DV e a Doença de Alzheimer são consideradas as causas mais frequentes de declínio cognitivo em idosos (NELSON, 2007). De fato, existe uma correlação entre a gravidade da disfunção da memória e a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral na DV (OHTA *et al.*, 1997).

Na patogênese da disfunção cognitiva, a associação de fatores vasculares e neurodegenerativos indicam um papel importante de anormalidades hemodinâmicas incluindo a hipoperfusão cerebral. Estudos sugerem que a combinação de hipoperfusão encefálica, que culmina em patologias vasculares, e a senescência levam a uma crise energética neuroglial, formação de placas amilóides, diminuição na efetividade sináptica e perda neuronal (SERRANO-POZO *et al.*, 2011).

Algumas formas de insuficiência vascular cerebral, tais como redução do suprimento sanguíneo cerebral ou rompimento da integridade microvascular

podem iniciar uma cadeia de eventos que irão culminar em declínio cognitivo, por exemplo, a vasoconstrição tem papel importante sob os vasos cerebrais, a taxa de perfusão pode diminuir consideravelmente, causar danos vasculares estruturais, queda na utilização de glicose cerebral e, conseqüentemente, dano neuronal (FARKAS & LUITEN, 2001). Embora o mecanismo de morte neuronal não seja claramente demonstrado na isquemia, o estresse oxidativo e a toxicidade glutamatérgica tem sido apontados por envolvimento com a morte celular induzida pela isquemia (RODRIGO *et al.*, 2005).

Há evidências de que o estresse oxidativo de origem vascular leva a alterações profundas na regulação cerebrovascular, por exemplo, em roedores, a hipoperfusão cerebral crônica (HCC) pode levar à disfunção mitocondrial e inibição da síntese proteica, efeito que pode perturbar o equilíbrio das antioxidases e espécies reativas de oxigênio produzindo o dano oxidativo (LEES, 1993). A enzima Na^+/K^+ ATPase, localizada na membrana citoplasmática, é responsável pelo transporte ativo de sódio e potássio, mantendo o gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal e regulação do volume celular neuronal. Alguns estudos têm demonstrado que a atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase está diminuída em diversas desordens neurodegenerativas crônicas (LEES, 1993).

O dano oxidativo das células endoteliais vasculares, células gliais e neurônios prejudicam a função vascular e o acoplamento neurovascular resultando em um ciclo vicioso de redução adicional da perfusão cerebral (LIU & ZHANG, 2012). É cada vez mais reconhecido que a resposta neurovascular desempenha um papel crítico na capacidade de recuperação cerebral após isquemia. Inicialmente, acreditava-se que a redução crônica no fluxo sanguíneo

cerebral era a responsável por induzir o processo neurodegenerativo. Em contrapartida, demonstrou-se que a morte precoce de células neuronais ocasionava redução na perfusão, uma vez que havia menor necessidade de substrato energético. Com a inserção do conceito de 'unidade neurovascular', a controvérsia foi esclarecida: o dano a qualquer um dos elementos resulta no comprometimento total desta unidade (FARKAS *et al.*, 2007).

1.2 Modelos animais

Uma vez que a redução da taxa de fluxo sanguíneo e/ou conteúdo arterial de oxigênio pode afetar gravemente a função cerebral, ocasionar alterações bioquímicas e moleculares e manifestar-se como sequela neurológica (RODRIGO *et al.*, 2005), o reconhecimento dessa cadeia de eventos relacionados à hipoperfusão cerebral crônica e consequente declínio cognitivo pode identificar alvos potenciais para terapias eficazes.

Diversos modelos experimentais de HCC tem sido desenvolvidos para reproduzir a condição patológica que ocorre em humanos em decorrência da demência vascular e incluem a oclusão bilateral da artéria carótida comum ou oclusão de 2 vasos (2VO) em ratos, estenose da artéria carótida comum em gerbilos ou camundongos (SHIBATA *et al.*, 2004), e oclusão unilateral da artéria carótida comum em camundongos (YOSHIZAKI *et al.*, 2008). Dentre estes, o modelo 2VO tem sido frequentemente utilizado (JIWA *et al.*, 2010), pois resulta em processos neurodegenerativos e comprometimento cognitivo (CECHETTI *et al.*, 2010), além disso, tem rápida recuperação pós-cirúrgica e

não causa dano encefálico severo, tampouco comprometimento motor subsequente (FARKAS *et al.*, 2007).

Modelos de DV são caracterizados pela perda da reatividade vasomotora de pequenos vasos, dano à barreira hematoencefálica e ativação glial (MARSHALL & LAZAR, 2011; PANTONI, 2010). A redução do fluxo sanguíneo cerebral varia aproximadamente de 35-45% na área cortical e 60% no hipocampo quando comparados a níveis controle (ULRICH *et al.*, 1998). Esses valores tendem a passar por uma crescente reversão decorrida 1 semana do procedimento cirúrgico, permanecem significativamente reduzidos após 4 semanas e atingem valores próximos à normalidade depois de 3 a 6 meses da oclusão vascular (OTORI *et al.*, 2003).

Em relação ao estado metabólico e homeostático do tecido, as mudanças no fluxo sanguíneo cerebral podem ser divididas em três fases no modelo animal, com transição gradual entre elas (Fig. 1): 1) Fase aguda, imediatamente após o início da oclusão, com duração de 2-3 dias. Nessa fase, o fluxo sanguíneo cerebral cai drasticamente e se mantém muito baixo neste período criando condições hipóxico-isquêmicas que podem comprometer a atividade eletrofisiológica do tecido nervoso. 2) Fase crônica, com duração de 8 semanas a 3 meses, onde o tecido sofre uma moderada hipoglicemia somada a uma oliguemia. Esta é a fase que mais se assemelha com a redução do fluxo sanguíneo cerebral na demência humana. 3) Fase final, de restituição, onde o fluxo sanguíneo cerebral retorna ao estado basal e a hipoperfusão vai cessando gradualmente (MAROSE *et al.*, 2006).

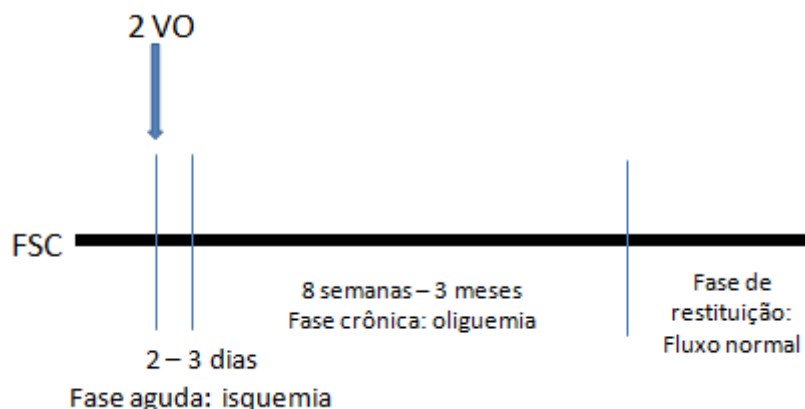


Figura 1 – Modelo de DV em ratos: fases sucessivas da hipoperfusão cerebral crônica induzida pela oclusão permanente, bilateral das artérias carótidas comuns (Adaptado de FARKAS *et al.*, 2007). FSC (fluxo sanguíneo cerebral); 2VO (oclusão de 2 vasos).

O modelo convencional de 2VO, no qual a oclusão permanente das carótidas é realizada simultaneamente (FARKAS *et al.*, 2007), apresenta redução do fluxo sanguíneo cerebral de forma abrupta e, secundariamente, demência vascular. Entretanto, este modelo tem uma baixa taxa de sobrevivência quando comparado a outros métodos de lesão isquêmica frequentemente utilizados, tais como isquemia por oclusão de 4 vasos – 4VO (oclusão permanente de ambas carótidas e oclusão transitória de ambas vertebrais) (VALENTIM *et al.*, 1999).

No intuito de avaliar os efeitos da HCC em longo prazo e minimizar o número de animais utilizados para o experimento, adaptações ao protocolo convencional foram desenvolvidas. No procedimento modificado a hipoperfusão cerebral é gradual, pois a oclusão das artérias carótidas é realizada com uma semana de intervalo entre cada artéria. O déficit cognitivo é

semelhante ao encontrado no protocolo original, entretanto, a taxa de sobrevivência é significativamente superior (CECHETTI *et al.*, 2010).

No envelhecimento e na demência, a sequência de eventos entre a hipoperfusão cerebral e a neurodegeneração tem sido foco de debate. Experimentalmente, as consequências cognitivas e teciduais da HCC podem ser divididas de acordo com o tempo de restrição da perfusão. Os sinais cognitivos de déficit de aprendizado e memória são observados nas tarefas comportamentais, de forma mais pronunciada, 4 semanas após a oclusão permanente das carótidas e apresentam padrão crescente e gradativo em relação ao tempo (FARKAS *et al.*, 2007).

O hipocampo possui relação com os processos de aprendizado e memória espacial e é uma das estruturas que apresenta maior vulnerabilidade mediante diminuição do fluxo sanguíneo cerebral (NAKAZAWA *et al.*, 2004; GEMMELL *et al.*, 2012). A atrofia hipocampal, intimamente relacionada com a perda de memória, é considerada um sensível marcador para neurodegeneração na Doença de Alzheimer e subtipos de demência, incluindo a DV (FRISONI *et al.*, 2010). Os testes de aprendizagem e capacidade de memória dos animais 2VO e a detecção do dano neuronal preenchem um dos principais campos de investigação das características neurodegenerativas como consequência da HCC (KESNER *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2010).

A HCC está relacionada ao acentuado déficit em tarefas cognitivas complexas tais como habilidades que incluem atenção, memória e processamento viso-espacial. A memória espacial de trabalho indica memória instantânea que uma pessoa ou um animal opera durante o processo de aprendizagem de novas informações sobre o espaço ao seu redor (CONRAD,

2010). A memória espacial de referência, por outro lado, geralmente se refere à atividade cerebral requerida pelo sujeito para relembrar informações já consolidadas como lugares e posições espaciais (CECHETTI *et al.*, 2010).

Déficits da memória espacial de referência e de trabalho podem ser bem avaliados pela tarefa do labirinto aquático de Morris (MORRIS, 1984; VORHEES & WILLIAMS, 2006). Este é um teste de aprendizado e memória para roedores, composto por pistas viso-espaciais e motivação aversiva (água). O bom desempenho nesta tarefa está relacionado com integridade hipocampal (JIWA *et al.*, 2010). Estudos utilizando o labirinto aquático de Morris têm demonstrado os efeitos negativos da HCC no que diz respeito ao aprendizado viso-espacial em ratos em curto e longo prazo (FARKAS & LUITEN, 2001; LIU *et al.*, 2005; CECHETTI *et al.*, 2010). O envelhecimento está associado ao aumento progressivo de anormalidades na plasticidade microvascular que afetam a função da barreira hematoencefálica (AMENTA *et al.*, 1995). Tais anormalidades incluem irregularidades da superfície capilar (LEE *et al.*, 2000), espessamento da membrana basal, depósito de fibras colágenas na parede capilar (BURNS *et al.*, 1981; KEUKER *et al.*, 2000) e decréscimo da densidade vascular (BROWN & THORE, 2011). Estas alterações podem diminuir a perfusão cerebral, levando a uma diminuição no suprimento de oxigênio e nutrientes e que podem estar relacionadas com o comprometimento cognitivo (FARKAS & LUITEN, 2001). Além disso, o envelhecimento reduz a plasticidade microvascular e a habilidade dos vasos de responder apropriadamente às mudanças na demanda metabólica. Esta perda de plasticidade microvascular tem um significado para a sinalização neuronal, uma vez que a neurogênese é regulada coordenadamente com o crescimento capilar (RIDDLE *et al.*, 2003).

A hipoperfusão induz a expressão de fatores neurotróficos, tal como o fator de crescimento do nervo (NGF) (NAKAMURA *et al.*, 2011). O NGF é uma neurotrofina crucial na regulação da angiogênese, tanto em condições normais quanto patológicas, é capaz de estimular a migração e proliferação de células endoteliais, atuar na remodelação da matriz extracelular e maturação funcional dos vasos sanguíneos recém formados (NICO *et al.*, 2008). Estudos prévios demonstram que após insulto isquêmico existe uma super-regulação de NGF, a qual pode ser benéfica por atuar na reparação da capilarização e fornecer, assim, uma proteção às células neuronais (EMANUELI, 2002).

O NGF e seus receptores (TrKA e p75) estão envolvidos na regulação da sobrevivência e diferenciação celular durante o período de desenvolvimento e na manutenção funcional de neurônios adultos (HUANG & REICHARDT, 2001). Parte dos efeitos neurotróficos ocorridos durante o desenvolvimento são mediados via receptor TrKA. A sinalização através do receptor p75, na ausência ou baixa expressão de TrKA, medeia apoptose, enquanto a sinalização através de TrKA bloqueia este efeito apoptótico e aumenta a sobrevivência neuronal (BARRET, 2000). A via de sinalização do NGF através do receptor TrKA ativa proteínas quinases como fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a via de sinalização Ras, ambas implicando a participação de segundos mensageiros envolvidos na transmissão de sinal anti-apoptótico (Fig.2) (ZHU *et al.*, 2004).

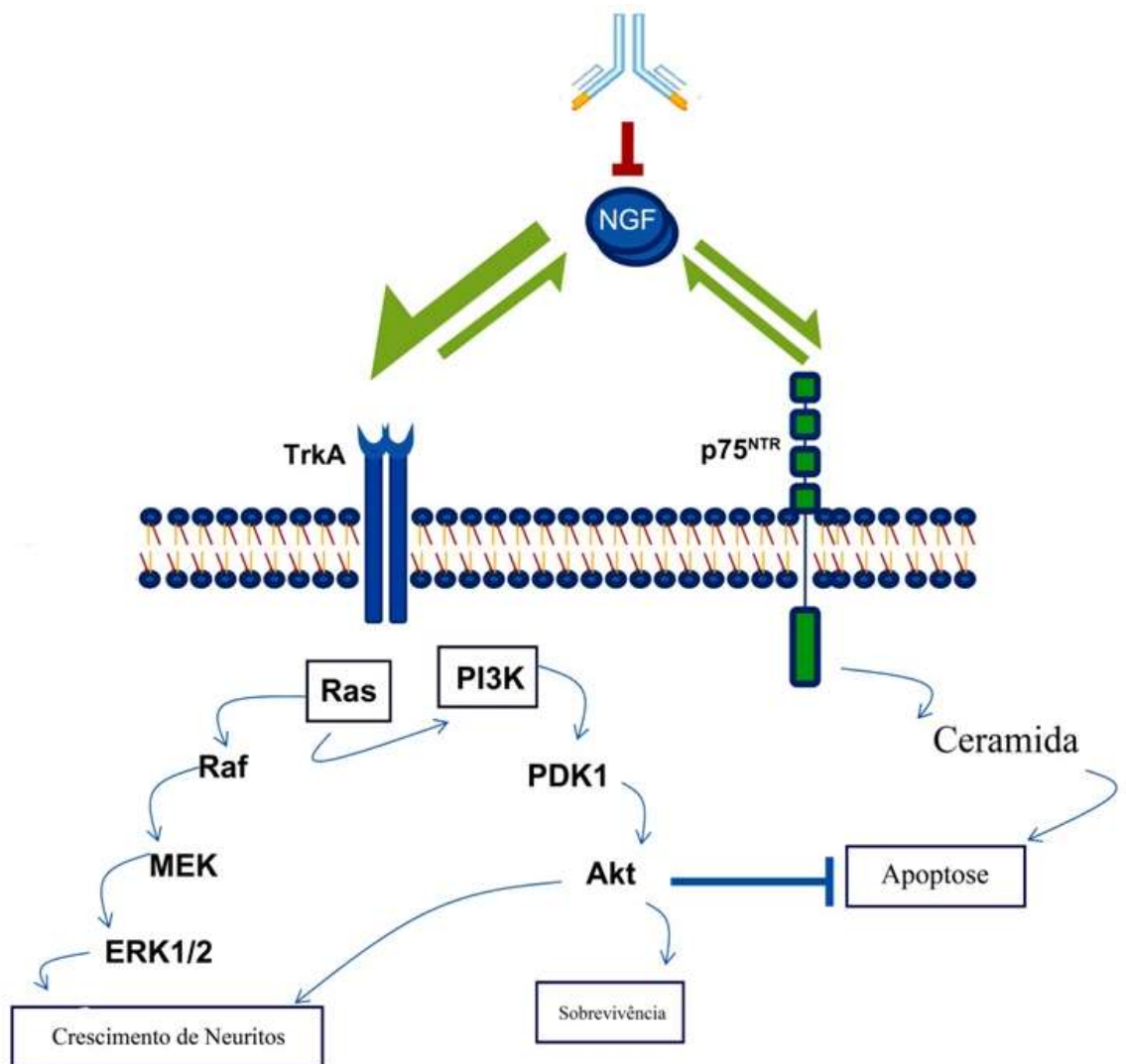


Figura 2 – Vias de sinalização do NGF na mediação de efeitos neurotróficos (Adaptado de KUMAR & MAHAL, 2012).

Durante o desenvolvimento, o NGF regula a morte celular de ocorrência natural, a conectividade sináptica, a orientação das fibras e a morfologia dendrítica (THOENEN, 1995). Além disso, tem um papel na plasticidade cerebral, estando envolvido na plasticidade neuronal atividade-dependente (SMITH *et al.*, 1995; THOENEN, 1995; CASTREN, 2005). Substratos de

neurogênese e neuroplasticidade estão altamente co-regulados com a angiogênese e o remodelamento vascular (ALVAREZ-BUYLLA *et al.*, 2000), há evidências de que vasos angiogênicos podem fornecer suporte neurotrófico aos neurônios recém-formados (LEVENTHAL *et al.*, 1999) e neuroblastos podem ser encontrados concentrados aos redor dos vasos sanguíneos após isquemia (YAMASHITA *et al.*, 2006). Estudos prévios com objetivo de verificar neuroplasticidade e consequente recuperação motora após isquemia induzida por oclusão da artéria cerebral média analisaram parâmetros envolvendo o aumento da expressão de NGF e angiogênese e verificaram que esses dados estavam correlacionados com diminuição do volume de infarto e recuperação funcional (MATSUDA *et al.*, 2011).

Além de um possível papel terapêutico relacionado a doenças neurodegenerativas, o NGF pode representar uma terapia neuroprotetora eficaz e segura nas vias neurológicas residuais viáveis após lesão hipóxico-isquêmica (CHIARETTI *et al.*, 2011).

1.3 Trans resveratrol (3, 5, 4'-tri-hidroxi-estilbeno) (RSV)

O RSV é uma fitoalexina produzida em aproximadamente 31 gêneros de plantas, dentre elas uvas vermelhas, amendoins e ameixas, cuja função biológica é a proteção contra agentes potencialmente lesivos à estrutura da planta e a estresses ambientais. Trata-se de um composto polifenólico derivado da fenilalanina, o qual contém dois anéis aromáticos com hidroxilas reativas em sua estrutura e que pode se apresentar sob duas formas isoméricas: *cis* e *trans*-resveratrol (Fig.3) (SAUTTER *et al.*, 2005).

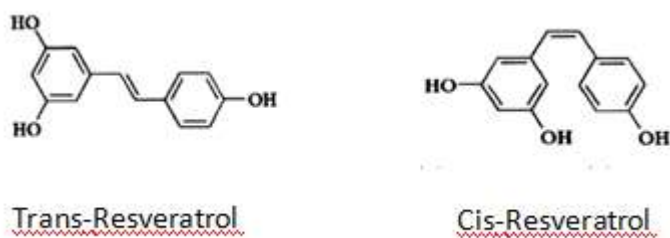


Figura 3 - Estrutura química dos isômeros do RSV (SAUTTER *et al*, 2005).

Por ser uma fitoalexina, o conteúdo de RSV presente nas diferentes fontes pode variar amplamente, dependendo de fatores que podem gerar mais ou menos estresse, tais como: ambiente de cultivo, clima, exposições a patógenos e, no caso dos vinhos, método de produção (SIGNORELLI & GHIDONI, 2005).

Atualmente, muitos estudos sobre RSV são direcionados aos vinhos (em especial, ao vinho tinto) e apontam a presença da molécula nessa bebida, sob suas duas formas isoméricas, *cis* e *trans*-resveratrol (PERVAIZ, 2003). O efeito do RSV já foi testado e se mostrou benéfico na prevenção e tratamento de uma série de doenças, dentre elas câncer, diabetes, distúrbios cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, auto-imunes e metabólicas. Dentre os efeitos farmacológicos do RSV destacam-se suas propriedades anti-inflamatórias, modulação do metabolismo lipídico, inibição da agregação plaquetária (WALLERATH *et al.*, 2002) e efeito vasodilatador (SHIGEMATSU *et al.*, 2003). Sua ação anti-inflamatória está relacionada à inibição da oxidação, *priming* leucocitário e expressão de mediadores inflamatórios. O mecanismo responsável pela ação vasodilatadora pode ser atribuído pela estimulação do óxido nítrico (NO), uma vez que estudos fisiológicos indicam maior produção de

NO *in vivo* e *in vitro* em resposta ao tratamento agudo com RSV (WALLERATH *et al.*, 2002).

Estudos experimentais têm demonstrado que o tratamento com RSV é capaz de induzir neuroproteção em modelos de isquemia. O mecanismo protetor poderia estar relacionados à inibição da agregação plaquetária, vasodilatação, ação antioxidante (HUANG *et al.*, 2001), e manutenção da atividade da Na⁺/K⁺ATPase (SIMÃO *et al.*, 2011).

Por outro lado, o RSV seria capaz de mimetizar os efeitos da restrição calórica e disparar a atividade de uma classe de proteínas envolvidas no retardo do envelhecimento, as sirtuínas (SIRT). As SIRT são histonas desacetilases dependentes de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD) que participam na fisiopatologia de uma série de modificações relacionadas à idade e que, de acordo com estudos experimentais, estariam associadas à longevidade (ANEKONDA, 2006) e ativação de genes relacionados à proteção neuronal (Fig. 4) (RAVAL *et al.*, 2008; ARAKI *et al.*, 2004; BEDALOV & SIMON, 2004).

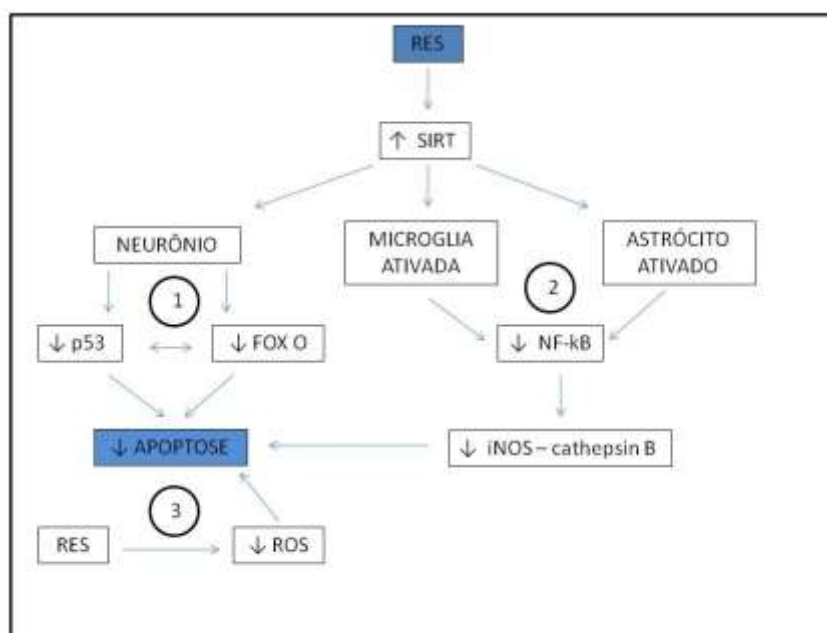


Figura 4. Mecanismos Moleculares da proteção neuronal do RSV sobre a expressão de SIRT. (1) Em neurônios, o RSV induz a expressão de SIRT que reprimem a atividade apoptótica dos fatores de transcrição p53 e FOXO e promovem sobrevivência neuronal; (2) Em microglia e astrócitos ativados, o RSV induz a expressão de SIRT inibindo a atividade do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) e com subsequente redução da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) e catepsina B, dois fatores tóxicos que medeiam a neurodegeneração; (3) O RSV, com sua função antioxidante, previne a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e consequente neurodegeneração (ANEKONDA, 2006).

Os efeitos benéficos do RSV, na prevenção da morte neuronal mediante insultos isquêmicos cerebrais, tem sido demonstrados em diversas doses (10 - 40mg/kg) (LIU *et al*, 2007) bem como em diversos tempos de administração, tanto pré (SINHA *et al*, 2002; GAO *et al.*, 2006; SIMÃO *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011) ou pós isquemia (GIRBOVAN *et al.*, 2012).

Considerando-se o envolvimento da excitotoxicidade do modelo de 2VO e o potencial efeito benéfico do RSV, objetivamos investigar o efeito neuroprotetor do RSV na prevenção do déficit da memória espacial e perda neuronal e associação com a expressão de NGF em ratos submetidos à HCC. Correlacionando a ação benéfica da expressão de neurotrofinas após insulto isquêmico (WANG *et al.*, 2006) e o perfil temporal das alterações do fluxo sanguíneo cerebral estabelecido após a isquemia cerebral, no presente estudo, investigamos a expressão de NGF na fase aguda (3 dias após HCC), subaguda (14 dias após HCC) e crônica da HCC (45 dias após HCC) (FARKAS *et al*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

No presente trabalho estudamos o possível efeito neuroprotetor, morfológico e funcional do tratamento com resveratrol em ratos submetidos ao modelo de demência cerebral por hipoperfusão crônica após a oclusão das 2 artérias carótidas comuns.

2.2 Objetivos Específicos

Considerando a importância da relação entre hipoperfusão, neurodegeneração e desempenho cognitivo no desenvolvimento da DV, os objetivos específicos são verificar o efeito da administração do RSV sobre:

1. a prevenção do dano cognitivo através do desempenho na tarefa do labirinto aquático de *Morris*;
2. a prevenção da morte de neurônios piramidais do hipocampo através da contagem bidimensional de neurônios 45 dias após o início da lesão;
3. a expressão de NGF no hipocampo, em 3 tempos (3 dias, 14 dias e 45 dias) após a indução da HCC.

Resveratrol treatment has neuroprotective effects and prevents cognitive impairment after chronic cerebral hypoperfusion

Anastácio, J.R.^{1,3}; Castro, C.C.³; Sanches, E.F.³; Ferreira, D.C.⁴; Noschang, C.³; Krolow, R.³; Dalmaz, C.^{1,3}; Netto, C.A.^{1,3}; Pagnussat, A.S.^{2,4}

¹ Programa de Pós-graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

² Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

³ Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

⁴ Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

Corresponding author:

Aline de Souza Pagnussat

Departamento de Fisioterapia

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Rua Sarmiento Leite, 245

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: + 55-51-3303 8776

Email: alinespagnussat@gmail.com

Total number of pages: 25

Total number of figures: 6

Number of words in:

(i) the whole manuscript: 5.562

(ii) the Abstract: 249

(iii) the Introduction: 543

Running Title: RSV neuroprotective effects in brain hypoperfusion

Keywords: Vascular dementia, Chronic cerebral hypoperfusion, Resveratrol, Neuroprotection

Abstract

Chronic cerebral hypoperfusion (CCH) is an important risk factor for cognitive decline and other brain dysfunctions such as Alzheimer's disease and vascular dementia. Resveratrol (RSV) is a polyphenolic compound widely known by its therapeutic potential against many disorders. The present study investigated the neuroprotective effects of (RSV) in rats submitted to CCH in a model of permanent 2-vessel occlusion (2VO). For this purpose, animals received daily intraperitoneal injections of RSV (20 mg/kg) for seven days, starting one hour after the 2VO procedure. Behavioral testing was run between the 30th and 45th days after the 2VO surgery. Accordingly, spatial working memory function in the Morris Water Maze was evaluated. At the end of the behavioral assessment (45th day) part of experimental animals underwent transcardiac perfusion for histological analysis. Another group was euthanized on the 3rd, 14th and 45th days after the 2VO surgery for NGF (Nerve Growth Factor) evaluation. Administration of RSV along 7 days after CCH significantly attenuated pyramidal cell death in CA1 hippocampal subfield and prevented spatial working memory impairment. Our results revealed NGF enhanced expression 3 days after CCH in all ischemic animals. A late increase in hippocampal NGF levels was detected after 45 days only in CCH -RSV treated animals. Results here presented show morphological and functional neuroprotective actions of RSV treatment for chronic cerebral hypoperfusion, as well as support the inducing effects of RSV on the expression of NGF and its possible association to the neuroprotective action in this rodent model of vascular dementia.

Introduction

Disorders of the cerebral circulation are the main cause of numerous neurological and psychiatric diseases. A sudden disruption of blood supply to distinct brain regions leads to stroke, while a moderate but persistent reduction in regional cerebral flow causes memory impairment and contributes to development and progression of dementia (Farkas *et al.*, 2007). The permanent and bilateral occlusion of the common carotid arteries of rats (2-vessel occlusion, 2VO) is widely accepted as a suitable experimental procedure to model chronic cerebral hypoperfusion (CCH), as it occurs in human aging and Alzheimer's disease (AD) (Farkas *et al.*, 2007; Cechetti *et al.*, 2010; Cechetti *et al.*, 2012). The cascade of events eventually leading to neuronal cell death in CCH begins with neuronal energy failure due to the blood flow reduction and the consequent oxygen and glucose deficiency (Otori *et al.*, 2003; Farkas *et al.*, 2007) and continues with accumulation of extracellular glutamate (Chao *et al.*, 2010) which increases calcium influx and triggers several intracellular processes causing cell death (Lau & Tymianski, 2010).

The hippocampus is a brain structure playing an important role in spatial navigation learning, memory, and performance. Spatial memory tasks are presumably depend on the hippocampal integrity and the most common behavioral test of hippocampus-dependent, spatial learning and memory is the Morris water task (Morris, 1984). Working spatial memory is the process by which memory information is coded and actively maintained for posterior retrieve (Rypma & D'Esposito, 2000). It declines with age and is disrupted in rats submitted to CCH model (Cechetti *et al.*, 2012).

The brain carries a number of growth factors, collectively termed neurotrophins (NTs). These proteins control synaptic function and plasticity and sustain neuronal cell survival, morphology, and differentiation (Skaper, 2008; Berry *et al.*, 2012). The list of known NTs includes nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor

(BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF); and neurotrophins generically labeled NT-3, NT-4/5 and NT-6. They tend to be up-regulated after brain injury, ischemia and exercise (Kidd, 2009) and down-regulated by stress (Aloe *et al.*, 1994; Alleva *et al.*, 1996). During development, NGF regulates naturally occurring cell death, synaptic connectivity, fiber guidance and dendritic morphology. Furthermore, it has a role on brain plasticity, being involved in activity-dependent neuronal functions (Smith *et al.*, 1995). In addition to a possible therapeutic role in the context of neurodegenerative disorders, NGF might represent an effective and safe adjunct neuroprotective therapy on the residual viable neurological pathways after hypoxic-ischemic injury (Chiaretti *et al.*, 2011).

The polyphenolic compound RSV is found in grapes, peanuts, mulberries, and more than 70 other plant species. Trans resveratrol (3,4,5-trihydroxystilbene) has recently attracted great interest for its potential beneficial effects to human health. It exerts these effects by modulating numerous cell-signaling pathways and associated cell signaling molecules (Zhang *et al.*, 2010). The RSV neuroprotective effects are often attributed to its antioxidant properties (Mokni *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010), however other studies have demonstrated that RSV neuroprotection could also be due to other mechanisms (Simao *et al.*, 2012a).

Therefore, considering the involvement of excitotoxicity in the 2VO model and the neuroprotective potential of RSV, the aim of the present study was to investigate the possible effects of RSV on spatial memory impairment and neuronal loss and its association with NGF in rats submitted to CCH.

Experimental Procedures

Animals

Three - months - old male Wistar rats were obtained from the Central Animal House of the Institute of Basic Health Sciences of the Federal University of Rio Grande do Sul. Animals were maintained in a temperature-controlled room (21 ± 2 °C), on a 12/12 h light/dark cycle, with food and water available *ad libitum*. All procedures were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by National Institute of Health (NIH-USA) and with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology (FESBE). The study was approved by the Ethics Committee of Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA; identifier n° 060-11).

Experimental Design

Modified two-vessel occlusion (2VO) protocol

Anesthesia was induced using a mixture of 3% halothane in 30% oxygen and 70% nitrous oxide and was maintained with 0.5 - 0.7% halothane. Body temperature was maintained between 36.5°C and 37.5°C throughout surgery using a self-regulating heating blanket (Letica, Spain). A neck ventral midline incision was made and the common carotid arteries were then exposed and gently separated from the vagus nerve. Rats were randomly assigned to sham or 2VO procedures. In 2VO groups, the right common carotid artery were exposed, occluded and then the wound was sutured. One week later a new incision was made and the left carotid was occluded (Cechetti *et al.*, 2012). Sham-operated controls received the same surgical procedures without carotid artery obstruction. During the interval between the occlusion of right and left carotid arteries animals were maintained in their standard home cages. There were five animals

in each experimental group surviving for 3 days or 14 days; groups surviving for 45 days to allow for behavioral assessment had 10 animals each.

Resveratrol Treatment

Trans resveratrol (R5010 - Sigma) was freshly prepared in 0.3 mL of 50% propylene glycol and administered in the dose of 20 mg/kg, i.p. (Sinha *et al.*, 2002) daily for 7 days. The treatment began one hour after the second artery occlusion. The vehicle-treated group received the same amount of propylene glycol for the same period (Sinha *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006).

Behavioral assessment was conducted between the 30th and 45th days after the 2VO surgery. One group of animals was euthanized for NGF immunocontent quantification on the 3rd, 14th and 45th days. Another group was transcardially perfused for histological examination on the 45th day (at the end of behavioral assessment). The timeline of experimental events is presented in Figure 1.

Figure 1 about here

Behavioral assessment

Morris water maze

On the 30th day after the 2VO surgery animals were subjected to behavioral testing in the Morris Water Maze, an apparatus widely employed for the study of spatial learning and memory tasks. The behavioral experiments were conducted between 7h and 12h a.m. The maze consisted of a black round pool, 200 cm in diameter, 100 cm high, 40 cm in depth, filled with water maintained at temperature of 23°C. Several distal

visual cues were placed on the walls of the room. A black platform, 10 cm in diameter, was submerged 2 cm below the water surface. The pool was conceptually divided into four quadrants and had four points designated as starting positions (N, S, W or E) (Morris, 1984). The behavioral protocol for reference and working memory was run. Sessions were recorded by a video acquisition system. Videotapes were scored blind by a trained observer using dedicated software (ANY-maze®).

Reference memory task

The task consisted of 4 training and one test session. In the acquisition phase, rats had daily sessions of 4 trials per day for 5 consecutive days to find the platform, submerged 2 cm under the water surface, placed on the center of same quadrant during all training days. For each trial, rats were placed in water facing tank wall, in one of the 4 starting locations (N, S, W or E). The order of starting position varied in every trial. Animals were allowed to search for the platform during 60 s. In case of failing to find it, they were gently guided to it. All animals were permitted to remain on the platform for 10 s and the latency to find the platform was measured in each trial. The interval between trials was 10 min (Netto *et al.*, 1993).

Working memory task

For this protocol rats received four trials per day, with a 5 min inter-trial interval, during four consecutive days. Rats had daily sessions to find the platform submerged 2 cm under the water surface, placed on a different location every day. Latency to find the platform was measured in each trial and the mean latency for every trial, over the four days, was calculated, allowing for the observation of the ability of animals to locate position on each day (Netto *et al.*, 1993). Animals were allowed to search for the platform during 60 s. In case of failing to find it, they were gently guided

to it. All animals were permitted to remain on the platform for 10 s and the latency to find the platform was measured in each trial. The interval between trials was 10 min.

Histology and hippocampus cell counting

Neuronal cell loss was assessed by histological examination of brain sections at the level of the dorsal hippocampus through the Hematoxiline-Eosine technique 45 days after 2VO. Rats were deeply anesthetized with chloral hydrate (30% - 10 ml/kg, i.p.) and submitted to transcardiac perfusion with 0.9% saline followed by 4% formaldehyde. Their brains were then removed and maintained in formaldehyde solution for 24h at 4°C. Brains were cryoprotected with a 30% sucrose solution for three days and then coronal sections of 30 μm were collected through the dorsal hippocampus (3.3–4.0 mm posterior from bregma) using a cryostat (Leica Microsystems, Germany). Hematoxiline-Eosine sections were digitized (40 x) using a Nikon Eclipse E-600 microscope (Japan) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA). The number of surviving pyramidal neurons per mm^2 was estimated using a ROI square of 0.03 mm^2 . Cells from the right and the left hippocampus in five sections per animal were averaged. Pyramidal cells located inside this square or intersected by the lower and/or right edged of the square were counted. Neurons intersected by the upper and/or left edges of the square were not counted (Pagnussat *et al.*, 2012).

Evaluation of Nerve Growth Factor (NGF) content

Animals were sacrificed by decapitation when they were 45 days old, and their hippocampus were quickly dissected out and stored at -70°C until further analysis. Each sample was homogenized in 10 vol. (w:v) ice-cold buffer containing 10 mM HEPES, 2.5 M KCl, 0.6 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% SDS, 25% glycerol and 1% protease inhibitors. The homogenate was centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatant was used for the evaluation of NGF content using the NGF Emax® ImunoAssay System (Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's instructions. Briefly, this assay is designed for the sensitive and specific detection of NGF in an antibody sandwich format, in which plates are coated with anti-NGF polyclonal antibody, which binds soluble NGF. The captured NGF is bound by a second specific monoclonal antibody and after washing; the amount of specifically bound monoclonal antibody is detected using an anti-rat IgG conjugated to horseradish peroxidase as a tertiary reactant. The unbound conjugate is removed by washing, and following incubation with a chromogenic substrate, the color change is measured. Results were expressed as ng NGF/ mg protein. The total protein concentrations were determined (Lowry *et al.*, 1951) with bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

SPSS® 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA) was used for data analysis. Data distribution was tested with the Kolmogorov–Smirnov test. To determine differences between groups in the behavioral evaluation and morphological measurements a 2-way analysis of variance (ANOVA) was utilized (lesion and treatment as factors) and for the statistical comparison of the NGF immunocontent a 3-way ANOVA was applied (lesion, treatment and time). In

both cases, Duncan multiple range test was used whenever appropriate. Paired T-tests were performed to determine differences between trials within groups in the Water Maze Working Memory task. Significance was set at $p < 0.05$ for all analysis and results are presented as means \pm standard error of the mean (SEM).

Results

Morris Water Maze

Reference Memory

Performance in the reference memory task in the Morris Water Maze protocol is depicted in figure 2. The two-way ANOVA revealed a lesion-treatment interaction ($F_{(1,26)}=7.17$; $p=0,01$) on day 5. Duncan's *post hoc* test indicated significant differences between sham groups (Sham_V and Sham_RSV) and 2VO_V on days 4 and 5.

Figure 2 about here

Working Memory

Data of working memory task in the Morris Water Maze protocol is shown in the figure 3. The two-way ANOVA revealed significant main effect of lesion ($F_{(1,26)}=22.08$; $p<0.01$), treatment ($F_{(1,26)}=11.90$; $p<0.01$) and a lesion-treatment interaction ($F_{(1,26)}=7.98$; $p<0.01$). Paired t-tests revealed significant differences between trial 1 and trial 4 within all groups ($p<0.05$), except in the 2VO_V group.

Figure 3 about here

Morphologic Analysis

The two-dimensional surviving neurons counting was performed 45 days after the ischemic insult, as depicted in figure 4. The three-way ANOVA revealed significant effect of lesion ($F_{(1,32)}=151.80$; $p<0.01$), treatment ($F_{(1,32)}=52.07$; $p<0.01$) and a lesion-treatment

interaction ($F_{(1,32)}=32.81$; $p<0.01$). The *post hoc* Duncan revealed significant difference among Sham groups (Sham_V and Sham_RSV) and ischemic groups (2VO_V and 2VO_RSV) and between 2VO_V and 2VO_RSV in both right and left sides (figure 5).

Figures 4 and 5 about here

Evaluation of the NGF content

The evaluation of the NGF content was conducted in three different times (3, 14 and 45 days after the beginning of the treatment) (figure 6). The three way ANOVA revealed a lesion effect on day 3 ($F_{(1,36)}=5.29$; $p=0.02$) and a treatment effect on day 45 ($F_{(1,36)}=4.69$; $p=0.05$). The statistical analysis did not detect any significant difference on day 14th. The *post hoc* test Duncan revealed significant differences among sham and ischemic groups on day 3 and between sham and 2VO_RSV group on day 45.

Figure 6 about here

Discussion

This work shows that RSV treatment improved cognitive function and afforded neuroprotection in a rodent model of vascular dementia. Seven days of RSV treatment initiated immediately after the CCH procedure significantly reduced hippocampal neuronal death and prevented spatial memory deficits caused by hypoperfusion on the water maze task. Moreover, RSV treatment was able to maintain significantly high levels of NGF expression even at long term after CCH induction.

Permanent bilateral occlusion of the common carotid arteries (2VO) in rats is an established procedure to investigate the effects of CCH on cognitive dysfunction and neurodegenerative processes (Cechetti *et al.*, 2012). Progressive cognitive impairment has been reported after 2VO and these behavioral changes are associated with gliosis, neuroinflammation, cholinergic dysfunction and apoptosis of pyramidal CA1 neurons.

The beneficial biological activities afforded by RSV has been extensively described and included pro-survival, anti-inflammatory and anti-carcinogenic effects. RSV has also been shown to pass the blood brain barrier and exert neuroprotective effect and therefore its use for the prevention and treatment of both acute and chronic neurodegenerative diseases, such as cerebral ischemia and Alzheimer's disease has been investigated (Baur & Sinclair, 2006; Simao *et al.*, 2012b). One of the most frequently used test to measure the hippocampus-related spatial learning capacity in CCH is the Morris water maze. It has been very well established that CCH compromises spatial learning (Farkas & Luiten, 2001; Farkas *et al.*, 2004b). Our results demonstrate that the memory impairment following CCH is prevented in both the working and the reference memory tasks after RSV treatment. As RSV has been found to protect brain from ischemia/reperfusion injury (Huang *et al.*, 2001; Simao *et al.*, 2012b), our results

suggest that RSV could be used as a possible treatment for cognitive impairment as that seen in CCH-like injuries.

The hippocampus, although implicated in spatial learning and memory, is the area displaying the most characteristic neuropathological damage in some neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and cerebral ischemia. The first signs of neurodegeneration (6-29%) in CCH can be visualized during the first week after 2VO induction (Ohtaki *et al.*, 2006). After 4 weeks, this rate increases to 55% while at 8-13 weeks total hippocampal destruction is observed in 67% of the 2VO rats (Farkas *et al.*, 2004a; Farkas *et al.*, 2007). Our data demonstrated that the 2VO animals had significantly fewer surviving neurons than the sham-operated groups and that RSV treatment was able to partially recoil the CA1 neurons 45 days after CCH. RSV can afford neuroprotection in the CA1 subfield by means of anti-oxidation (Sinha *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2010), anti-inflammation (Shin *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Simao *et al.*, 2012a), anti-and apoptosis mechanisms (Yousuf *et al.*, 2009).

Multiple signaling pathways are involved in the neuroprotection afforded by RSV. However, the completely mechanism by which RSV exerts neuroprotective effects are not fully clarified. Neurotrophic factors, for instance NGF and its receptors (p75 and TrkA) are involved in the regulation of nerve cell survival and differentiation during development and in the functional maintenance of adult neurons (Huang & Reichardt, 2001). Substrates of neurogenesis and neuroplasticity are tightly co-regulated with angiogenesis and vascular remodeling (Ohab *et al.*, 2006). After ischemia, the normal cell function might be retained by restoration of the blood flow to such areas. Some classical neurotrophic factors have also angiogenic properties. These molecules that have such dual neurovascular properties are currently called angioneurins and include NGF, BDNF and VEGF. An important property of angioneurins is their

neuroprotective activity. They enhance neurogenesis, modulate synaptic plasticity, have positive effect on neurite outgrowth, branching and elimination (Zacchigna *et al.*, 2008). Moreover, NGF has been shown to stimulate proliferation of rat brain endothelial cells (Moser *et al.*, 2004).

As recently demonstrated, RSV might be an interesting inducer of angiogenesis. RSV up-regulates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and increases extracellular levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinases (MMPs) suggesting it may be a promoter of angiogenesis via a programmed NO/VEGF/MMP signaling axis (Simao *et al.*, 2012c). NGF and VEGF share common signal transduction pathways. Stimulation by NGF and VEGF activates two common intracellular signaling cascades in endothelial cells, the Ras/ERK and P13K/Akt pathways, both of which are involved in cell proliferation and survival, suggesting that NGF, acting in concert with VEGF, plays a role in controlling angiogenic processes (Nico *et al.*, 2008).

Hypoxic-ischemic studies have reported different patterns of NGF levels according to the elapsed time from the infarction and the brain area analyzed (Shozuhara *et al.*, 1992; Nishio *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1998). In intact brain the main source of NGF are target neuronal cells and in some pathological conditions an increase in extraneuronal pool of NGF takes place. Although the temporal profiles of nerve growth factor in the hippocampal CA1 pyramidal cells after HCC remain poor understood, several lines of evidence indicate that in noxious conditions astrocytes may be the site of NGF production (Oderfeld-Nowak & Bacia, 1994; Lee *et al.*, 1998). Reactive astrogliosis is considered to be a late-emerging event in the hippocampus after CCH induction (Schmidt-Kastner *et al.*, 2005; Marosi *et al.*, 2006;

Cechetti *et al.*, 2012) and this may explain the high hippocampal NGF levels even under a significant pyramidal cell loss in the CA1 region.

Lesion effects on NGF expression were detected 3 days and 45 days after the CCH induction. The changes in the cerebral blood flow (CBF) in CCH can be divided into 2 phases with regard to the metabolic and homeostatic state of the tissue: an acute phase: 2-3 days from the occlusion and a chronic phase, 8 weeks-3 months, creating hypoxic-ischemic-like conditions. A possible explanation to the NGF enhanced expression in these 2 times may be perhaps due the neuroinflammation characteristic in these 2 time points, since ischemic insults impose rapid glial and microglial activation which participates in defense of the nervous system and can increase the NGF expression. So, it is reasonable to suggest that this increase may represent a mechanism of response to promote tissue repair and protect the CNS tissue against inflammation. Since the 14th day is a transition phase (from acute to chronic), we assume that the brain homeostasis are being modulated at this point. Also, the CBF falls dramatically at once and remains very low in this period, which may compromise the electrophysiological activity of the nervous tissue (Marosi *et al.*, 2006).

Collateral revascularization may be important in determining the brain recovery and the increased microvessel density should persists in long-term to achieve the best possible outcome (Krupinski *et al.*, 1994; Font *et al.*, 2010). As shown, RSV was able to increase the NGF levels even in long term after HCC. So, NGF might participate in the neuroprotective actions of RSV as confirmed by histological and behavioral data.

Summarising, this is the first demonstration, as far as we know, of the beneficial cognitive and morphological effects of RSV treatment following chronic cerebral hypoperfusion. Present findings also allow us to hypothesize that the inducing effects of RSV on the expression of NGF may be an alternative explanation for its

neuroprotective action. Additional studies are needed to address the molecular mechanisms of RSV-induced NGF expression.

References

- Alleva, E., Petruzzi, S., Cirulli, F. & Aloe, L. (1996) NGF regulatory role in stress and coping of rodents and humans. *Pharmacol Biochem Behav*, **54**, 65-72.
- Aloe, L., Bracci-Laudiero, L., Alleva, E., Lambiase, A., Micera, A. & Tirassa, P. (1994) Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10440-10444.
- Baur, J.A. & Sinclair, D.A. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 493-506.
- Berry, A., Bindocci, E. & Alleva, E. (2012) NGF, brain and behavioral plasticity. *Neural Plast*, **2012**, 784040.
- Cechetti, F., Pagnussat, A.S., Worm, P.V., Elsner, V.R., Ben, J., da Costa, M.S., Mestriner, R., Weis, S.N. & Netto, C.A. (2012) Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull*, **87**, 109-116.
- Cechetti, F., Worm, P.V., Pereira, L.O., Siqueira, I.R. & C, A.N. (2010) The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res*, **43**, 1178-1183.
- Chao, X.D., Fei, F. & Fei, Z. (2010) The role of excitatory amino acid transporters in cerebral ischemia. *Neurochem Res*, **35**, 1224-1230.
- Chiaretti, A., Falsini, B., Aloe, L., Pierri, F., Fantacci, C. & Riccardi, R. (2011) Neuroprotective role of nerve growth factor in hypoxicischemic injury. From brain to skin. *Arch Ital Biol*, **149**, 275-282.
- Farkas, E., Donka, G., de Vos, R.A., Mihaly, A., Bari, F. & Luiten, P.G. (2004a) Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. *Acta Neuropathol*, **108**, 57-64.
- Farkas, E., Institoris, A., Domoki, F., Mihaly, A., Luiten, P.G. & Bari, F. (2004b) Diazoxide and dimethyl sulphoxide prevent cerebral hypoperfusion-related learning dysfunction and brain damage after carotid artery occlusion. *Brain Res*, **1008**, 252-260.
- Farkas, E. & Luiten, P.G. (2001) Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, **64**, 575-611.

- Farkas, E., Luiten, P.G. & Bari, F. (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, **54**, 162-180.
- Font, M.A., Arboix, A. & Krupinski, J. (2010) Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. *Curr Cardiol Rev*, **6**, 238-244.
- Gao, D., Zhang, X., Jiang, X., Peng, Y., Huang, W., Cheng, G. & Song, L. (2006) Resveratrol reduces the elevated level of MMP-9 induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice. *Life Sci*, **78**, 2564-2570.
- Huang, E.J. & Reichardt, L.F. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 677-736.
- Huang, S.S., Tsai, M.C., Chih, C.L., Hung, L.M. & Tsai, S.K. (2001) Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci*, **69**, 1057-1065.
- Kidd, P.M. (2009) Integrated brain restoration after ischemic stroke--medical management, risk factors, nutrients, and other interventions for managing inflammation and enhancing brain plasticity. *Altern Med Rev*, **14**, 14-35.
- Krupinski, J., Kaluza, J., Kumar, P., Kumar, S. & Wang, J.M. (1994) Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, **25**, 1794-1798.
- Lau, A. & Tymianski, M. (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*, **460**, 525-542.
- Lee, T.H., Kato, H., Chen, S.T., Kogure, K. & Itoyama, Y. (1998) Expression of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, **29**, 1687-1696; discussion 1697.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- Lu, K.T., Chiou, R.Y., Chen, L.G., Chen, M.H., Tseng, W.T., Hsieh, H.T. & Yang, Y.L. (2006) Neuroprotective effects of resveratrol on cerebral ischemia-induced neuron loss mediated by free radical scavenging and cerebral blood flow elevation. *J Agric Food Chem*, **54**, 3126-3131.
- Marosi, M., Rakos, G., Robotka, H., Nemeth, H., Sas, K., Kis, Z., Farkas, T., Lur, G., Vecsei, L. & Toldi, J. (2006) Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia. *J Neurosci Methods*, **156**, 231-235.
- Mokni, M., Elkahoui, S., Limam, F., Amri, M. & Aouani, E. (2007) Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neurochem Res*, **32**, 981-987.

- Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, **11**, 47-60.
- Moser, K.V., Reindl, M., Blasig, I. & Humpel, C. (2004) Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation. *Brain Res*, **1017**, 53-60.
- 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.
- Nico, B., Mangieri, D., Benagiano, V., Crivellato, E. & Ribatti, D. (2008) Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res*, **75**, 135-141.
- Nishio, T., Furukawa, S., Akiguchi, I., Oka, N., Ohnishi, K., Tomimoto, H., Nakamura, S. & Kimura, J. (1994) Cellular localization of nerve growth factor-like immunoreactivity in adult rat brain: quantitative and immunohistochemical study. *Neuroscience*, **60**, 67-84.
- Oderfeld-Nowak, B. & Bacia, A. (1994) Expression of astroglial nerve growth factor in damaged brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **54**, 73-80.
- Ohab, J.J., Fleming, S., Blesch, A. & Carmichael, S.T. (2006) A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*, **26**, 13007-13016.
- Ohtaki, H., Fujimoto, T., Sato, T., Kishimoto, K., Fujimoto, M., Moriya, M. & Shioda, S. (2006) Progressive expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis after chronic ischemic hypoperfusion in rat. *Acta Neurochir Suppl*, **96**, 283-287.
- Otori, T., Katsumata, T., Muramatsu, H., Kashiwagi, F., Katayama, Y. & Terashi, A. (2003) Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **30**, 266-272.
- Pagnussat, A.S., Michaelsen, S.M., Achaval, M., Ilha, J., Hermel, E.E., Back, F.P. & Netto, C.A. (2012) Effect of skilled and unskilled training on nerve regeneration and functional recovery. *Braz J Med Biol Res*, **45**, 753-762.
- Rypma, B. & D'Esposito, M. (2000) Isolating the neural mechanisms of age-related changes in human working memory. *Nat Neurosci*, **3**, 509-515.
- Schmidt-Kastner, R., Aguirre-Chen, C., Saul, I., Yick, L., Hamasaki, D., Busto, R. & Ginsberg, M.D. (2005) Astrocytes react to oligemia in the forebrain induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res*, **1052**, 28-39.
- Shin, J.A., Lee, H., Lim, Y.K., Koh, Y., Choi, J.H. & Park, E.M. (2010) Therapeutic effects of resveratrol during acute periods following experimental ischemic stroke. *J Neuroimmunol*, **227**, 93-100.

- Shozuhara, H., Onodera, H., Katoh-Semba, R., Kato, K., Yamasaki, Y. & Kogure, K. (1992) Temporal profiles of nerve growth factor beta-subunit level in rat brain regions after transient ischemia. *J Neurochem*, **59**, 175-180.
- Simao, F., Matte, A., Pagnussat, A.S., Netto, C.A. & Salbego, C.G. (2012a) Resveratrol preconditioning modulates inflammatory response in the rat hippocampus following global cerebral ischemia. *Neurochem Int*, **61**, 659-665.
- Simao, F., Matte, A., Pagnussat, A.S., Netto, C.A. & Salbego, C.G. (2012b) Resveratrol prevents CA1 neurons against ischemic injury by parallel modulation of both GSK-3beta and CREB through PI3-K/Akt pathways. *Eur J Neurosci*.
- Simao, F., Pagnussat, A.S., Seo, J.H., Navaratna, D., Leung, W., Lok, J., Guo, S., Waeber, C., Salbego, C.G. & Lo, E.H. (2012c) Pro-angiogenic effects of resveratrol in brain endothelial cells: nitric oxide-mediated regulation of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases. *J Cereb Blood Flow Metab*, **32**, 884-895.
- Sinha, K., Chaudhary, G. & Gupta, Y.K. (2002) Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci*, **71**, 655-665.
- Skaper, S.D. (2008) The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **7**, 46-62.
- Smith, M.A., Makino, S., Kim, S.Y. & Kvetnansky, R. (1995) Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, **136**, 3743-3750.
- Yousuf, S., Atif, F., Ahmad, M., Hoda, N., Ishrat, T., Khan, B. & Islam, F. (2009) Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res*, **1250**, 242-253.
- Zacchigna, S., Ruiz de Almodovar, C. & Carmeliet, P. (2008) Similarities between angiogenesis and neural development: what small animal models can tell us. *Curr Top Dev Biol*, **80**, 1-55.
- Zhang, F., Liu, J. & Shi, J.S. (2010) Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: role of resveratrol in microglial activation. *Eur J Pharmacol*, **636**, 1-7.

Figure 1. Time line of experimental events.

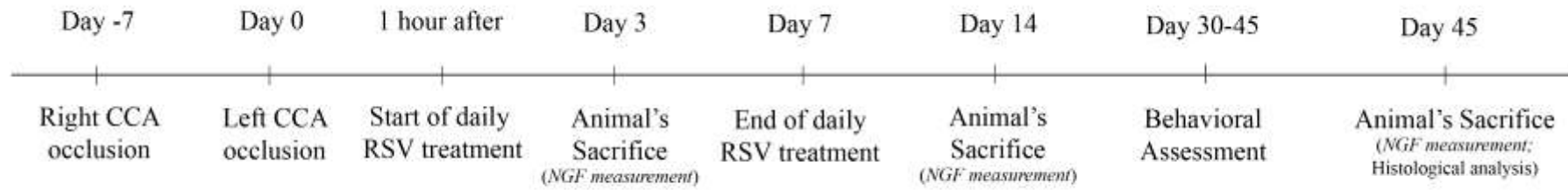


Figure 2. Reference memory task performance in the Water Maze. . Two-way ANOVA followed by Duncan test. Asterisks indicate difference between Sham groups and 2VO vehicle on day 4 and 5 ($P < 0.05$). Groups: Sham (Sham treated with vehicle and RSV were grouped to allow for better visualization of results); 2VO_V (2VO treated with vehicle); 2VO_RSV (2VO treated with RSV). Lines represent mean \pm standard error of mean (S.E.M.).

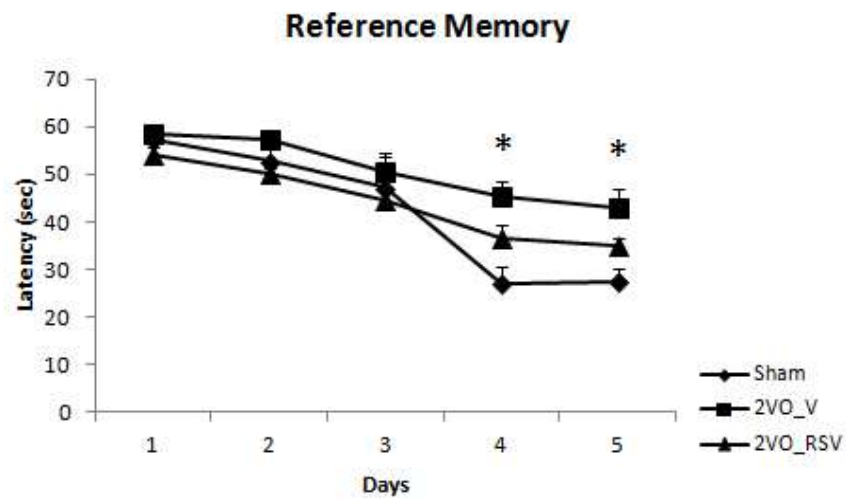


Figure 3. Working memory task performance of rats in the Water Maze. Two-way ANOVA followed by Duncan test. Asterisks indicate difference between trial 1 and trial 4 for all groups, except for 2VO vehicle ($P < 0.05$). Groups: Sham (Sham treated with vehicle and RSV were grouped to allow for better visualization of results); 2VO_V (2VO treated with vehicle); 2VO_RSV (2VO treated with RSV). Values are mean \pm S.E.M.

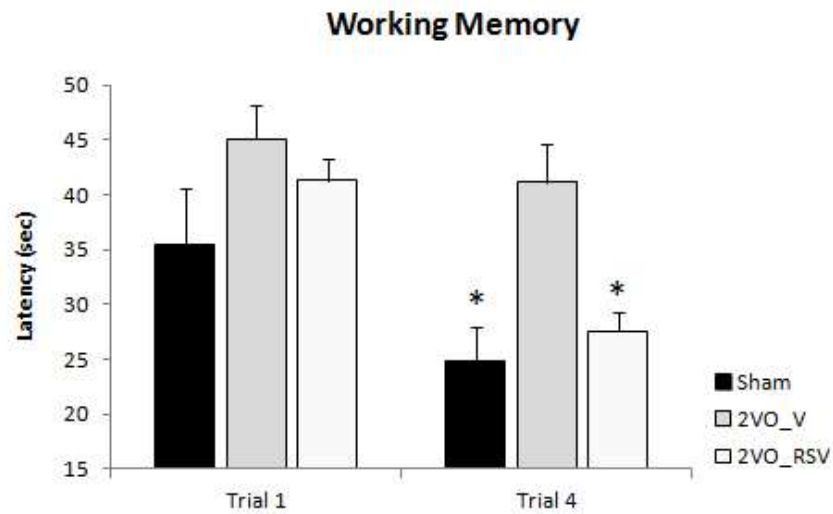


Figure 4. Representative photomicrographs (40X) of the hippocampus CA1 region of male rats sacrificed 45 days after the ischemic insult. Rats that underwent the 2VO occlusion had significantly fewer surviving neurons than sham-operated groups ($p < 0,01$). The RSV treatment neuroprotected the CA1 hippocampal subfield. A) Sham_vehicle, B) 2VO_vehicle, C) 2VO_RSV. Scale bar=100 μ m.

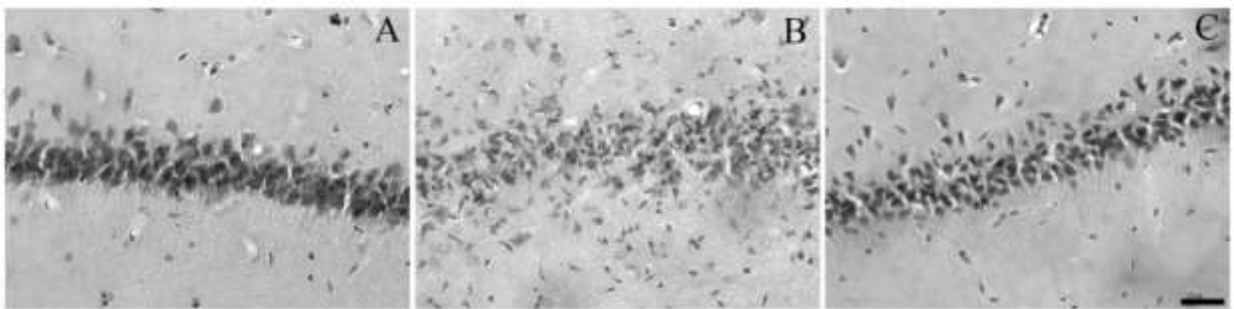


Figure 5. Density of survival neurons in the CA1 region of the hippocampus (right and left) of Wistar rats 45 days after the ischemic insult (2VO). The three-way ANOVA followed by Duncan's test ($p < 0.05$) revealed statistical difference: a) among sham and ischemic groups (2VO_V and 2VO_RSV); b) between 2VO_RSV and 2VO_V. Groups: Sham_V; Sham_RSV (sham treated with RSV); 2VO_V (2VO treated with vehicle); 2VO_RSV (2VO treated with RSV). Results are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM).

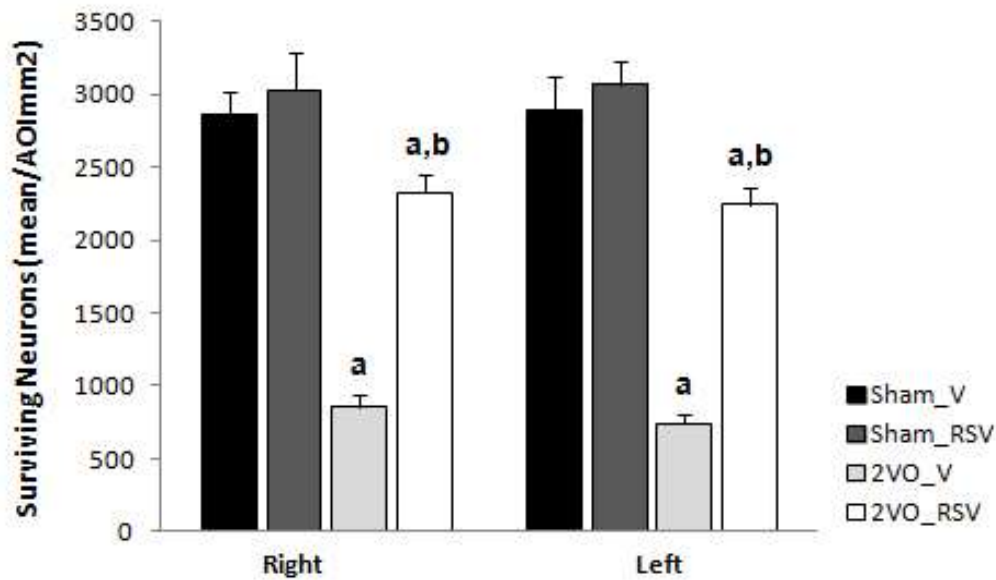
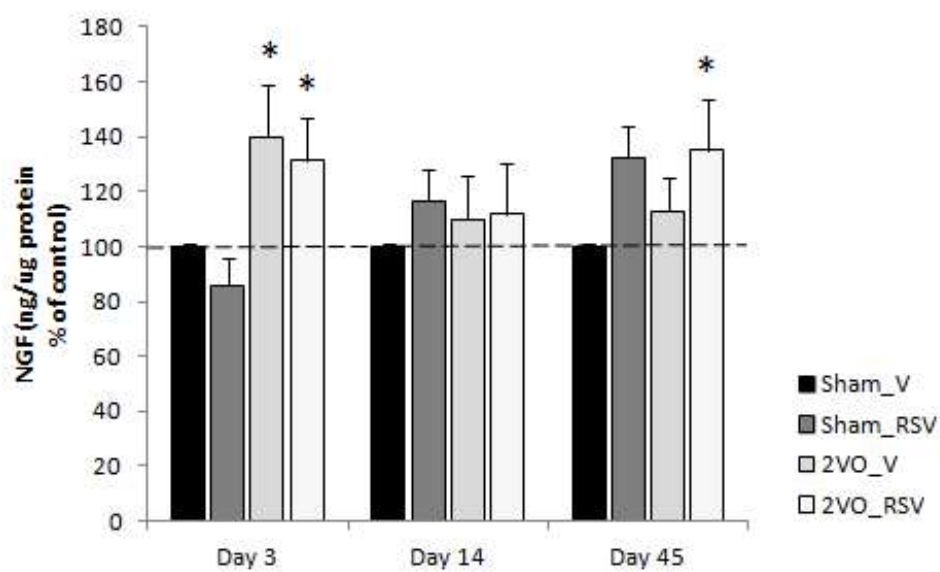


Figure 6. NGF content in 3 different times after RSV treatment. Asterisks indicate significant difference from sham_V group on day 3 and day 45 ($P < 0.05$). Groups: Sham_V; Sham_RSV (sham treated with RSV); 2VO_V (2VO treated with vehicle); 2VO_RSV (2VO treated with RSV). Results are expressed as mean (% from sham vehicle group) \pm standard error of mean (SEM).



4. DISCUSSÃO

Este estudo investigou a possível ação neuroprotetora do RSV nos efeitos comportamentais e bioquímicos causados pela HCC. Os dados obtidos indicaram que a hipoperfusão é capaz de induzir a degeneração neuronal 45 dias após lesão e que estes dados se correlacionam com os parâmetros cognitivos analisados através da tarefa comportamental do Labirinto aquático de Morris, onde pudemos observar diferença significativa entre os grupos controles e isquêmicos. O tratamento com RSV por 7 dias após a indução isquêmica foi capaz de reverter esses dados prevenindo a morte neuronal e os sinais cognitivos da demência cerebral nos ratos submetidos ao modelo de HCC por 2VO, ou seja, os animais isquêmicos tratados demonstraram um melhor desempenho na tarefa comportamental quando comparados aos animais isquêmicos não tratados. Além disso, o tratamento com RSV foi capaz de manter níveis de expressão de NGF significativamente elevados mesmo em longo prazo após a indução da HCC.

Levando-se em consideração que a hipoperfusão é freqüentemente associada ao dano oxidativo cérebro-vascular, os métodos contra a disfunção cerebral combinados com antioxidantes podem contribuir de forma promissora para o tratamento de déficits cognitivos. O RSV, destacando-se por sua propriedade antioxidante, por atuar na inibição da agregação plaquetária e pelo seu efeito vasodilatador (HUANG *et al.*, 2001), já foi testado e se mostrou benéfico na prevenção da morte neuronal após insultos isquêmicos (LI *et al.*, 2011; SINGLETON *et al.*, 2011). É bem descrito que a morte neuronal seguida de isquemia cerebral é seletiva a regiões vulneráveis do encéfalo, especialmente o hipocampo. Os primeiros sinais de neurodegeneração (6 a

29%) da HCC podem ser visualizados durante a primeira semana após a indução de 2VO. Após 4 semanas, esta taxa aumenta para 55%, enquanto em 8-13 semanas é observada uma destruição hipocampal em 67% dos ratos submetidos a 2VO (BENNETT *et al.*, 1998; FARKAS *et al.*, 2004a; LIU *et al.*, 2006; FARKAS *et al.*, 2007). Os déficits de aprendizado e memória induzidos pela isquemia mostram uma correlação estreita com a morte neuronal da região CA1 do hipocampo (BLOCK *et al.*, 1999).

Nossos achados evidenciam que a oclusão permanente das artérias carótidas comuns é um bom modelo para se estudar a neurodegeneração hipocampal. O modelo de isquemia cerebral por 2VO em roedores causa uma redução na densidade neuronal após lesão (SIVILIA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2011), e tal efeito está correlacionado com déficits nas habilidades cognitivas (CECHETTI *et al.*, 2010). Neste estudo, observamos que a isquemia cerebral ocasionou uma redução significativa de neurônios sobreviventes na região CA1 do hipocampo verificada em 45 dias após lesão. Outros modelos experimentais de isquemia cerebral demonstram o efeito benéfico do RSV, por exemplo, estudos prévios demonstram que o pré-condicionamento com RSV seguido de isquemia cerebral global induzida por 4VO é capaz de apresentar resultados positivos através de uma significativa prevenção de morte neuronal (SIMÃO *et al.*, 2012). Além disso, o RSV se mostra benéfico em outro modelo isquêmico através da oclusão da artéria cerebral média (MCAO), neste estudo, os grupos tratados com RSV apresentaram redução significativa da região de infarto cerebral correlacionada com uma melhora das funções neurológicas nos grupos tratados com RSV em relação aos controles (LI *et al.*, 2011).

Estudos prévios confirmam que a indução de isquemia pelo modelo 2VO prejudica a capacidade de aprendizado e memória (FARKAS *et al.*, 2007, CECHETTI *et al.*, 2010) e tais déficits da memória espacial de referência e de trabalho podem ser avaliados pela tarefa do Labirinto Aquático de Morris (MORRIS, 1984; VORHEES & WILLIAMS, 2006). De acordo com o presente estudo, existe uma correlação da HCC com mudanças da função cognitiva, ou seja, animais submetidos à HCC demonstraram dificuldades de aprendizado e, após tratamento com RSV, uma reversão parcial em ambas tarefas de memória de trabalho e referência. Corroborando com estes dados, em estudo prévio, animais submetidos ao mesmo protocolo modificado de oclusão permanente de ambas artérias carótidas comuns, a fim de mimetizar os efeitos da demência cerebral em humanos, e posterior avaliação comportamental demonstrou déficits cognitivos 3 meses após a lesão e que tal efeito negativo da HCC pôde ser avaliado através da tarefa do Labirinto aquático de Morris (CECHETTI *et al.*, 2012). Outros estudos envolvendo o modelo de HCC demonstraram déficits nos parâmetros cognitivos mais cedo, em 33 dias após lesão, também através do labirinto aquático de Morris (ZHANG *et al.*, 2011). Desta forma, nossos resultados sugerem que o RSV pode ser utilizado como um possível tratamento para a disfunção cognitiva como visto nas lesões por HCC.

No presente estudo, detectamos um efeito de lesão na expressão de NGF no terceiro dia e um efeito de tratamento 45 dias após a indução de HCC. Diversos fatores neurotróficos endógenos tem sido caracterizados como cruciais para o desenvolvimento, diferenciação e manutenção de distintas populações neuronais. Dentre eles, o NGF (fator de crescimento do nervo) e

seus receptores (p75 e TrKA) podem atenuar a degeneração neuronal em ratos submetidos a insultos isquêmicos (SHIGENO *et al.*, 1991; PECHAN *et al.*, 1995; HUANG & REICHARDT, 2001). Após a isquemia, o funcionamento normal da célula pode ser conservado pela recuperação do fluxo sanguíneo para tais áreas e substratos de neurogênese e neuroplasticidade estão rigorosamente correlacionados com angiogênese e remodelamento vascular (OHAB *et al.*, 2006). Suportando estes dados, estudos prévios demonstram que após insulto isquêmico existe uma supra-regulação de NGF, a qual pode ser benéfica por atuar na reparação da capilarização e fornecer, assim, uma proteção às células neuronais (EMANUELI, 2002; WANG *et al.*, 2006). O dano isquêmico leva à ativação astrocitária e microglial, as quais participam na defesa do sistema nervoso e poderiam ser o local da produção de NGF (ODERFELD-NOWAK & BACIA, 1994; LEE *et al.*, 1998).

Com base nesses dados, concluímos que o RSV tem capacidade de neuroproteção após indução do modelo modificado de HCC manifestando-se pela prevenção da morte neuronal no hipocampo e do déficit cognitivo, e que, ao menos parcialmente, estes efeitos podem ser decorrência do aumento, em longo prazo, na expressão do NGF.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nessa dissertação nos permitem concluir que:

1. A administração de RSV atenuou o prejuízo causado pela HCC na memória espacial de referência e de trabalho;
2. O RSV preveniu morte neuronal hipocampal, indicando um papel neuroprotetor;
3. O RSV aumentou a expressão da neurotrofina NGF, crucial para o desenvolvimento, diferenciação e manutenção de distintas populações neuronais.

Até onde sabemos, este estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos benéficos do tratamento com RSV em hipocampo de ratos submetidos à HCC. Obviamente, mais estudos experimentais são necessários para compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos indutores do RSV na expressão de NGF.

6. PERSPECTIVAS

- Investigar outras vias que possam estar envolvidas no efeito neuroprotetor do RSV em modelo experimental de demência vascular;
- Investigar o potencial efeito benéfico do RSV como forma de prevenção da morte neuronal através de um tratamento prévio à isquemia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLADI S, MEKALA S, CHADALAWADA SK, JALA S, MRIDULA R, KAUL S. Subtypes of dementia: a study from a memory clinic in India. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 32(1):32-8, 2011.
- ALVAREZ-BUYLLA A, HERRERA DG, WICHTERLE H. The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. *Prog Brain Res*. 127:1-11, 2000.
- AMENTA F, FERRANTE F, MANCINI M, SABBATINI M, VEGA JA, ZACCHEO D. Effect of long-term treatment with the dihydropyridine-type calcium channel blocker darodipine (PY 108-068) on the cerebral capillary network in aged rats. *Mech Ageing Dev*. 78(1):27-37, 1995.
- ANEKONDA TS. Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev*. 52: 316-26, 2006.
- ARAKI T, SASAKI Y, MILBRANDT J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305: 1010-13, 2004.
- BARRETT GL. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol*. 61(2):205-29, 2000.
- BAUR JA, SINCLAIR DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 5(6):493-506, 2006.
- BEDALOV A, SIMON JA. Neuroscience. NAD to the rescue. *Science* 305, 954-55, 2004.
- BELL RD, ZLOKOVIC BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 118(1):103-13, 2009.
- BENNETT SA, TENNISWOOD M, CHEN JH, DAVIDSON CM, KEYES MT, FORTIN T, PAPPAS BA. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neuroreport*. 5;9(1):161-6, 1998.
- BLOCK F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol*. 58(3):279-95, 1999.
- BROWN L, KROON PA, DAS DK, DAS S, TOSAKI A, CHAN V, SINGER MV, FEICK P. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcohol Clin Exp Res*. 33(9):1513-23, 2009.
- BROWN WR, THORE CR. Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 37(1):56-74, 2011.
- BURNS EM, KRUCKEBERG TW, GAETANO PK. Changes with age in cerebral capillary morphology. *Neurobiol Aging*. 2(4):283-91, 1981.
- CASTREN, E. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci*, 6, 241-246, 2005.
- CECHETTI F, WORM PV, PEREIRA LO, SIQUEIRA IR, A NETTO C. The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res*. 43(12):1178-83, 2010.

- CHIARETTI, A., FALSINI, B., ALOE, L., PIERRI, F., FANTACCI, C. & RICCARDI, R. Neuroprotective role of nerve growth factor in hypoxicischemic injury. From brain to skin. *Arch Ital Biol*, 149, 275-282, 2011.
- CHUI HC, ZHENG L, REED BR, VINTERS HV, MACK WJ. Vascular risk factors and Alzheimer's disease: are these risk factors for plaques and tangles or for concomitant vascular pathology that increases the likelihood of dementia? An evidence-based review. *Alzheimers Res Ther*. 4;4(1):1, 2012.
- CONRAD CD. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 34(5):742-55, 2010.
- de ALMEIDA LM, LEITE MC, THOMAZI AP, BATTU C, NARDIN P, TORTORELLI LS, ZANOTTO C, POSSER T, WOFCHUK ST, LEAL RB, GONÇALVES CA, GOTTFRIED C. Resveratrol protects against oxidative injury induced by H₂O₂ in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. *Arch Biochem Biophys*. 480(1):27-32, 2008.
- DESMOND DW. The neuropsychology of vascular cognitive impairment: is there a specific cognitive deficit? *J Neurol Sci*. 15;226(1-2):3-7, 2004.
- EMANUELI C, SALIS MB, PINNA A, GRAIANI G, MANNI L, MADEDDU P. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation*. 22;106(17):2257-62, 2002.
- ENGELHARDT E, TOCQUER C, ANDRÉ C, MOREIRA DM, OKAMOTO IH, CAVALCANTI JLS. Vascular dementia – diagnostic criteria and supplementary exams. *Dement Neuropsychol*. 5(4): 251-263, 2011.
- FARKAS E, LUITEN, PGM. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 64: 575–611, 2001.
- FARKAS E, DONKA G, DE VOS RA, MIHÁLY A, BARI F, LUITEN PG. Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. *Acta Neuropathol*. 108(1):57-64, 2004.
- FARKAS E, INSTITÓRIS A, DOMOKI F, MIHÁLY A, LUITEN PG, BARI F. Diazoxide and dimethyl sulphoxide prevent cerebral hypoperfusion-related learning dysfunction and brain damage after carotid artery occlusion. *Brain Res*. 22;1008(2):252-60, 2004.
- FARKAS E, LUITEN PG, BARI F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 54: 162-80, 2007.
- FONT MA, ARBOIX A, KRUPINSKI J. Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. *Curr Cardiol Rev*. 6(3):238-44, 2010.
- FRISONI GB, FOX NC, JACK CR JR, SCHELTENS P, THOMPSON PM. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 6(2):67-77, 2010.
- GEMMELL E, BOSOMWORTH H, ALLAN L, HALL R, KHUNDAKAR A, OAKLEY AE, DERAMECOURT V, POLVIKOSKI TM, O'BRIEN JT,

- KALARIARN. Hippocampal neuronal atrophy and cognitive function in delayed poststroke and aging-related dementias. *Stroke*. 43(3):808-14, 2012.
- HUANG SS, TSAI MC, CHIH CL, HUNG LM, TSAI SK. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci*. 69(9):1057-65, 2001.
- HUANG EJ, REICHARDT LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*.24:677-736, 2001.
- HWANG IK, YOO KY, KIM DS, JEONG YK, KIM JD, SHIN HK, LIM SS, YOO ID, KANG TC, KIM DW, MOON WK, WON MH. Neuroprotective effects of grape seed extract on neuronal injury by inhibiting DNA damage in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Life Sci*. 3;75(16):1989-2001, 2004.
- IEMOLO F, DURO G, RIZZO C, CASTIGLIA L, HACHINSKI V, CARUSO C. Pathophysiology of vascular dementia. *Immun Ageing*. 6;6:13, 2009.
- JEDRZIEWSKI MK, LEE VM, TROJANOWSKI JQ. Lowering the risk of Alzheimer's disease: evidence-based practices emerge from new research. *Alzheimers Dement*. 1(2):152-60, 2005.
- JIWA NS, GARRARD P, HAINSWORTH AH. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review. *J Neurochem*. 115(4):814-28, 2010.
- KESNER RP. Behavioral analysis of the contribution of the hippocampus and parietal cortex to the processing of information: interactions and dissociations. *Hippocampus*. 10(4):483-90, 2000.
- KEUKER JI, LUITEN PG, FUCHS E. Capillary changes in hippocampal CA1 and CA3 areas of the aging rhesus monkey. *Acta Neuropathol*. 100(6):665-72, 2000.
- KRUPINSKI J, KALUZA J, KUMAR P, KUMAR S, WANG JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*. 25(9):1794-8, 1994.
- KUMAR V, MAHAL BA. NGF - the TrkA to successful pain treatment. *J Pain Res*. 5:279-87, 2012.
- LEE EY, LEE SY, LEE TS, CHI JG, CHOI W, SUH YH. Ultrastructural changes in microvessel with age in the hippocampus of senescence-accelerated mouse (SAM)-P/10. *Exp Aging Res*. 26(1):3-14, 2000.
- LEE TH, KATO H, CHEN ST, KOGURE K, ITOYAMA Y. Expression of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 29(8):1687-96, 1998.
- LEES GJ. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience*. 54(2):287-322, 1993.
- LEVENTHAL C, RAFII S, RAFII D, SHAHAR A, GOLDMAN SA. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci*. 13(6):450-64, 1999.
- LI L, ZHANG B, TAO Y, WANG Y, WEI H, ZHAO J, HUANG R, PEI Z. DL-3-n-butylphthalide protects endothelial cells against oxidative/nitrosative stress,

- mitochondrial damage and subsequent cell death after oxygen glucose deprivation in vitro. *Brain Res.* 1290:91-101, 2009.
- LI H, YAN Z, ZHU J, YANG J, HE J. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by improving brain energy metabolism and alleviating oxidative stress in rats. *Neuropharmacology.* 60(2-3):252-8, 2011.
- LIU H, ZHANG J. Cerebral Hypoperfusion and Cognitive Impairment: The Pathogenic Role of Vascular Oxidative Stress. *Int J Neurosci.* 2012. [Epub ahead of print]
- LIU HX, ZHANG JJ, ZHENG P, ZHANG Y. Altered expression of MAP-2, GAP-43, and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion correlates with cognitive impairment. *Brain Res Mol Brain Res* 139: 169–177, 2005.
- LIU J, JIN DZ, XIAO L, ZHU XZ. Paeoniflorin attenuates chronic cerebral hypoperfusion-induced learning dysfunction and brain damage in rats. *Brain Res.* 17;1089(1):162-70, 2006.
- MAROSI M, RÁKOS G, ROBOTKA H, NÉMETH H, SAS K, KIS Z, FARKAS T, LÜR G, VÉCSEI L, TOLDI J. Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia. *J Neurosci Methods.* 156(1-2):231-5, 2006.
- MARSHALL RS, LAZAR RM. Pumps, aqueducts, and drought management: vascular physiology in vascular cognitive impairment. *Stroke.* 42(1):221-6, 2011.
- MATSUDA F, SAKAKIMA H, YOSHIDA Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol (Oxf).* 201(2):275-87, 2011.
- MORRIS R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11(1):47-60, 1984.
- MOSER KV, REINDL M, BLASIG I, Humpel C. Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation. *Brain Res.* 13;1017(1-2):53-60, 2004.
- MURAKAMI Y, IKENOYA M, MATSUMOTO K, LI H, WATANABE H. Ameliorative effect of tacrine on spatial memory deficit in chronic two-vessel occluded rats is reversible and mediated by muscarinic M1 receptor stimulation. *Behav Brain Res.* 109(1):83-90, 2000.
- NAKAMURA K, TAN F, LI Z, THIELE, C. NGF Activation of TrkA induces vascular endothelial growth factor expression via induction of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Cell Neurosci.* 46(2):498-506, 2011.
- NAKAZAWA K, MCHUGH TJ, WILSON MA, Tonegawa S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci.* 5(5):361-72, 2004.
- NARITA K, HISAMOTO M, OKUDA T, TAKEDA S. Differential neuroprotective activity of two different grape seed extracts. *PLoS One.* 24;6(1):e14575, 2011.

- NELSON NW. Differential diagnosis of Alzheimer's dementia and vascular dementia. *Dis Mon.* 53(3):148-51, 2007.
- NI J, OHTA H, MATSUMOTO K, WATANABE H. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res.* 8;653(1-2):231-6, 1994.
- NICO B, MANGIERI D, BENAGIANO V, CRIVELLATO E, RIBATTI D. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res.* 75(2):135-41, 2008.
- NISHIO T, FURUKAWA S, AKIGUCHI I, OKA N, OHNISHI K, TOMIMOTO H, NAKAMURA S, KIMURA J. Cellular localization of nerve growth factor-like immunoreactivity in adult rat brain: quantitative and immunohistochemical study. *Neuroscience.* 60(1):67-84, 1994.
- ODERFELD-NOWAK B, BACIA A. Expression of astroglial nerve growth factor in damaged brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 54(2):73-80, 1994.
- OHAB JJ, FLEMING S, BLESCH A, CARMICHAEL ST. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci.* 13;26(50):13007-16, 2006.
- OHTA H, NISHIKAWA H, KIMURA H, ANAYAMA H, MIYAMOTO M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience.* 79(4):1039-50, 1997.
- OTORI T, KATSUMATA T, MURAMATSU H, KASHIWAGI F, KATAYAMA Y, TERASHI A. Long-term measurements of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30(4):266-72, 2003.
- PAGNUSSAT AS, WORM PV, ELSNER VR, BEN J, DA COSTA MS, MESTRINER R, WEIS SN, NETTO CA. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull.* 4;87(1):109-16, 2012.
- PANTONI L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 9(7):689-701, 2010.
- PAPPAS BA, DE LA TORRE JC, DAVIDSON CM, KEYES MT, FORTIN T. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res.* 5;708(1-2):50-8, 1996.
- PECHAN PA, YOSHIDA T, PANAHIAN N, MOSKOWITZ MA, BREAKFIELD XO. Genetically modified fibroblasts producing NGF protect hippocampal neurons after ischemia in the rat. *Neuroreport.* 6(4):669-72, 1995.
- PERVAIZ S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J.* 17: 1975-85, 2003.
- RAVAL AP, LIN HW, DAVE KR, DEFAZIO RA, DELLA MORTE D, KIM EJ, PEREZ-PINZON MA. Resveratrol and ischemic preconditioning in the brain. *Curr Med Chem.* 15: 1545-51, 2008.
- RIDDLE DR, SONNTAG WE, LICHTENWALNER RJ. Microvascular plasticity in aging. *Ageing Res Rev.* 2(2):149-68, 2003.

- ROCKWOOD K, MACKNIGHT C, WENTZEL C, BLACK S, BOUCHARD R, GAUTHIER S, FELDMAN H, HOGAN D, KERTESZ A, MONTGOMERY P. The diagnosis of "mixed" dementia in the Consortium for the Investigation of Vascular Impairment of Cognition (CIVIC). *Ann N Y Acad Sci.* 903:522-8, 2000.
- RODRIGO J, FERNÁNDEZ AP, SERRANO J, PEINADO MA, MARTÍNEZ A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med.* 39(1):26-50, 2005.
- SAHATHEVAN R, BRODTMANN A, DONNAN GA. Dementia, stroke, and vascular risk factors; a review. *Int J Stroke.* 7(1):61-73, 2012.
- SARTI C, PANTONI L, BARTOLINI L, INZITARI D. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. *J Neurol Sci.* 15;203-204:263-6, 2002.
- SAUTTER C, DENARDIN S, ALVES A, MALLMANN C, PENNA N, HECKTHEUER L. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25(3): 437-442, 2005.
- SERRANO-POZO A, MIELKE ML, GÓMEZ-ISLA T, BETENSKY RA, GROWDON JH, FROSCH MP, HYMAN BT. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 179(3):1373-84, 2011.
- SHANG Y, CHENG J, QI J, MIAO H. Scutellaria flavonoid reduced memory dysfunction and neuronal injury caused by permanent global ischemia in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 82(1):67-73, 2005.
- SHIBATA M, OHTANI R, IHARA M, TOMIMOTO H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke.* 35(11):2598-603, 2004.
- SHIGEMATSU S, ISHIDA S, HARA M, TAKAHASHI N, YOSHIMATSU H, SAKATA T, KORTHUIS RJ. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free Radic Biol Med.* 34(7):810-7, 2003.
- SHIN JA, LEE H, LIM YK, KOH Y, CHOI JH, PARK EM. Therapeutic effects of resveratrol during acute periods following experimental ischemic stroke. *J Neuroimmunol.* 8;227(1-2):93-100, 2010.
- SCHMIDT-KASTNER R, AGUIRRE-CHEN C, SAUL I, YICK L, HAMASAKI D, BUSTO R, GINSBERG MD. Astrocytes react to oligemia in the forebrain induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res.* 2;1052(1):28-39, 2005.
- SHIGENO T, MIMA T, TAKAKURA K, GRAHAM DI, KATO G, HASHIMOTO Y, FURUKAWA S. Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci.* 11(9):2914-9, 1991.
- SHOZUHARA H, ONODERA H, KATOH-SEMBA R, KATO K, YAMASAKI Y, KOGURE K. Temporal profiles of nerve growth factor beta-subunit level in rat brain regions after transient ischemia. *J Neurochem.* 59(1):175-80, 1992.

- SIGNORELLI P., GHIDONI R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 16: 449-66, 2005.
- SIMÃO F, MATTÉ A, MATTÉ C, SOARES FM, WYSE AT, NETTO CA, SALBEGO CG. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na(+)-K(+)-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. *J Nutr Biochem*. 22(10):921-8, 2011.
- SIMÃO F, MATTÉ A, PAGNUSSAT AS, NETTO CA, SALBEGO CG. Resveratrol prevents CA1 neurons against ischemic injury by parallel modulation of both GSK-3 β and CREB through PI3-K/Akt pathways. *Eur J Neurosci*. 36(7):2899-905, 2012.
- SIMÃO F, MATTÉ A, PAGNUSSAT AS, NETTO CA, SALBEGO CG. Resveratrol preconditioning modulates inflammatory response in the rat hippocampus following global cerebral ischemia. *Neurochem Int*. 16;61(5):659-665, 2012.
- SIMÃO F, PAGNUSSAT AS, SEO JH, NAVARATNA D, LEUNG W, LOK J, GUO S, WAEBER C, SALBEGO CG, LO EH. Pro-angiogenic effects of resveratrol in brain endothelial cells: nitric oxide-mediated regulation of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases. *J Cereb Blood Flow Metab*. 32(5):884-95, 2012.
- SINGLETON RH, YAN HQ, FELLOWS-MAYLE W, DIXON CE. Resveratrol attenuates behavioral impairments and reduces cortical and hippocampal loss in a rat controlled cortical impact model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 27(6):1091-9, 2010.
- SINHA K, CHAUDHARY G, GUPTA YK. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci*. 71: 655-65, 2002.
- SIVILIA S, GIULIANI A, DEL VECCHIO G, GIARDINO L, CALZÀ L. Age-dependent impairment of hippocampal neurogenesis in chronic cerebral hypoperfusion. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 34(1):52-61, 2008.
- SKOOG I, OLESEN PJ, BLENNOW K, PALMERTZ B, JOHNSON SC, BIGLER ED. Head size may modify the impact of white matter lesions on dementia. *Neurobiol Aging*. 33(7):1186-93, 2012.
- SMITH MA, MAKINO S, KIM SY, KVETNANSKY R. Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. 136(9):3743-50, 1995.
- SUN H, ZHANG J, ZHANG L, LIU H, ZHU H, YANG Y. Environmental enrichment influences BDNF and NR1 levels in the hippocampus and restores cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfused rats. *Curr Neurovasc Res*. 7(4):268-80, 2010.
- THOENEN H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 27;270(5236):593-8, 1995.
- TAI SK, HUNG LM, FU YT, CHENG H, NIEN MW, LIU HY, ZHANG FB, HUANG SS. Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. *J Vasc Surg*. 46(2):346-53, 2007.

- ULRICH PT, KROPPESTEDT S, HEIMANN A, KEMPSKI O. Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic 2-vessel occlusion model in rats. *Stroke*. 29(11):2412-20, 1998.
- VALENTIM LM, MICHALOWSKI CB, GOTTARDO SP, PEDROSO L, GESTRICH LG, NETTO CA, SALBEGO CG, RODNIGHT R. Effects of transient cerebral ischemia on glial fibrillary acidic protein phosphorylation and immunocontent in rat hippocampus. *Neuroscience*. 91(4):1291-7, 1999.
- VORHEES CV, WILLIAMS MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 1(2):848-58, 2006.
- WALLERATH T, DECKERT G, TERNES T, ANDERSON H, LI H, WITTE K, ET AL. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 106: 1652-58, 2002.
- WANG ZF, TANG LL, YAN H, WANG YJ, TANG XC. Effects of huperzine A on memory deficits and neurotrophic factors production after transient cerebral ischemia and reperfusion in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 83(4):603-11, 2006.
- YAMASHITA T, NINOMIYA M, HERNÁNDEZ ACOSTA P, GARCÍA-VERDUGO JM, SUNABORI T, SAKAGUCHI M, ADACHI K, KOJIMA T, HIROTA Y, KAWASE T, ARAKI N, ABE K, OKANO H, SAWAMOTO K. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci*. 26(24):6627-36, 2006.
- YOSHIZAKI K, ADACHI K, KATAOKA S, WATANABE A, TABIRA T, TAKAHASHI K, WAKITA H. Chronic cerebral hypoperfusion induced by right unilateral common carotid artery occlusion causes delayed white matter lesions and cognitive impairment in adult mice. *Exp Neurol*. 210(2):585-91, 2008.
- YOUSUF S, ATIF F, AHMAD M, HODA N, ISHRAT T, KHAN B, ISLAM F. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res*. 23;1250:242-53, 2009.
- ZACCHIGNA S, RUIZ DE ALMODOVAR C, CARMELIET P. Similarities between angiogenesis and neural development: what small animal models can tell us. *Curr Top Dev Biol*. 80:1-55, 2008.
- ZHANG F, LIU J, SHI JS. Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: role of resveratrol in microglial activation. *Eur J Pharmacol*. 25;636(1-3): 2010.
- ZHANG G, ZHAO Z, GAO L, DENG J, WANG B, XU D, LIU B, QU Y, YU J, LI J, GAO G. Gypenoside attenuates white matter lesions induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 99(1):42-51, 2011.
- ZHU W, GALOYAN SM, PETRUSKA JC, OXFORD GS, MENDELL LM. A developmental switch in acute sensitization of small dorsal root ganglion (DRG) neurons to capsaicin or noxious heating by NGF. *J Neurophysiol*. 92(5):3148-52, 2004.