



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

**EFEITO NEUROPROTETOR DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO ARÚNDICO
[ácido (R)-(-)-2-propiloctanóico, ONO-2506] EM RATOS SUBMETIDOS À
HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL**

Cristine Mari

Porto Alegre

2018



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

**EFEITO NEUROPROTETOR DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO ARÚNDICO
[ácido (R)-(-)-2-propiloctanóico, ONO-2506] EM RATOS SUBMETIDOS À
HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL**

Cristine Mari

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Neurociências

Porto Alegre

2018

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Geral.....	12
2.2 Específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Animais	13
3.2 Hipóxia-Isquemia.....	13
3.3 Desenhos Experimentais.....	14
3.4 Administração das Substâncias.....	17
3.6 Análise Histológica.....	18
3.7.1 Volume da Lesão	18
3.8 Análises Bioquímicas	19
3.8.2 ELISA	19
3.8.2.1 ELISA de S100b.....	19
3.8.2.2 ELISA de GFAP.....	19
3.8.2.3 ELISA de GS.....	14
3.8.3 Western Blotting	20
3.8.4 Dosagem de Proteínas.....	21
3.8.5 Análise Comportamental	21
3.8.5.1 Labirinto Aquático de Morris.....	21
3.8.5.1.1 Protocolo de Memória de Referência	21
3.8.5.1.2 Protocolo de Memória de Trabalho	22
3.9 Análise Estatística.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Primeiro Experimento.....	23
4.1.1 Ácido Arúndico injetado pré-hipóxia na dose de 10mg/kg reduziu a perda do volume hipocampal causado pela HI.	23

4.1.2	Ácido Arúndico injetado pré-hipóxia não demonstrou efeitos significativos sobre o comportamento dos animais.	25
4.2	Segundo Experimento.....	27
4.2.1	Ácido Arúndico injetado pré e pós hipóxia na dose de 10mg/kg reduziu os danos teciduais causados pela HI.	27
4.2.2	Ácido Arúndico injetado pré e pós hipóxia não demonstrou efeitos significativos sobre o comportamento dos animais.....	29
4.3	Bioquímicos.....	29
4.3.1	Efeitos do ácido arúndico sobre os níves de S100b.	29
4.3.2	Efeitos do ácido arúndico sobre o imunoconteúdo de GFAP hipocampal.....	31
4.3.3	Proteínas relacionadas ao metabolismo do glutamato.....	32
5.	DISCUSSÃO.....	35
6.	CONCLUSÃO.....	41
7.	BIBLIOGRAFIA.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos da evolução da lesão neural	4
Figura 2. Mecanismo proposto para expansão tardia do infarto após isquemia cerebral focal	10
Figura 3. Esquema do desenho experimental I.....	15
Figura 4. Esquema do desenho experimental II	15
Figura 5. Esquema do desenho experimental III	16
Figura 6. Análise histológica dos hemisférios e córtex I	23
Figura 7. Análise histológica do hipocampo I.....	24
Figura 8. Water maze I	25
Figura 9. Histologia do córtex e hemisférios II.....	26
Figura 10. Histologia do hipocampo II	27
Figura 11. Water maze II.....	28
Figura 12. Expressão S100b no líquido	29
Figura 13. Expressão S100b hipocampo	30
Figura 14. Expressão de GFAP no hipocampo.	31
Figura 15. Expressão de GLT-1 e GLAST no hipocampo.....	32
Figura 16. Expressão de GS no hipocampo.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação do protocolo de administração de substâncias do I experimento	16
Tabela 2. Representação do protocolo de administração de substâncias do II experimento	17
Tabela 3. Representação do protocolo de administração de substâncias do III experimento	17
Tabela 4. Volumes das estruturas encefálicas	23

RESUMO

A lesão hipóxico-isquêmica perinatal (HI) é uma das principais causas de mortalidade aguda e morbidade neurológica crônica em lactentes e crianças. Os mecanismos de lesão podem ser classificados em fase primária, latente, secundária e terciária. A inflamação aguda desencadeia a expressão de uma série de genes pró-inflamatórios, que induzem a síntese de fatores de transcrição e de mediadores inflamatórios. Uma possível via de sinalização alterada que pode ter uma importância fundamental na HI depende dos astrócitos e envolve a uma subunidade de uma proteína ligante de cálcio, chamada S100b. Sua inibição parece ter efeito neuroprotetor em modelos de lesão ao sistema nervoso central. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos neuroprotetores do ácido arúndico (um inibidor da síntese astrocítica de S100b) administrado pré e pós hipóxia sobre os parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos no modelo de hipóxia-isquemia neonatal em ratos *Wistar*. No 7º dia de vida pós-natal os animais foram submetidos à combinação da oclusão unilateral da artéria carótida direita e exposição a uma atmosfera hipóxica (8% de O₂) por 60 minutos. Foram aplicadas injeções intraperitoniais de salina para os grupos Sham e HI+Salina (HIS) e de ácido arúndico nos grupos HI+AA0,1mg/kg pré-hipóxia (HIAA0,1pré), HI+AA 1mg/kg pré-hipóxia (HIAA1 pré), HI+AA10mg/kg pré-hipóxia (HIAA10pré) e HI+AA10 mg/kg pré e pós-hipóxia (HIAA10pré e pós). Os grupos pré receberam ácido arúndico imediatamente antes da hipóxia e o grupo pós, nos intervalos de 1, 24 e 48 horas após a cirurgia. Os resultados demonstraram que o ácido arúndico foi efetivo na dose de 10 mg/kg aplicados pré e pós-hipóxia, sendo capaz de reduzir a lesão tecidual no hipocampo ipsilateral à oclusão da carótida, também promoveu a sobrevivência astrocitária no hipocampo, reduziu a liberação de S100b no líquido, manteve a expressão dos níveis dos transportadores de glutamato (GLT-1 e GLAST) e da glutamina sintetase, contudo não foi capaz de melhorar os déficits cognitivos induzidos pela HI.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia (HI), ácido arúndico (ONO-2506), inflamação, S100b, neuroproteção.

ABSTRACT

Perinatal hypoxic-ischemic injury (HI) is one of the main causes of acute mortality and chronic neurological morbidity in infants and children. Injury mechanisms can be classified as primary, latent, secondary and tertiary. Acute inflammation triggers the expression of a number of proinflammatory genes, which induce the synthesis of transcription factors and inflammatory mediators. One possible signaling pathway altered that may have fundamental importance in HI depends on astrocytes and involves a subunit of a calcium binding protein, called S100b. Its inhibition may have neuroprotective effects on central nervous system injury models. This study aimed to evaluate the neuroprotective effects of arundic acid (an S100b astrocytic synthesis inhibitor) when administered in the pre and post hypoxia periods on behavioral, morphological and biochemical parameters in the neonatal hypoxia-ischemia model in Wistar rats. On the 7th day postnatal life the animals were submitted to a combination of unilateral occlusion of the right carotid artery and exposure to a hypoxic atmosphere (8% O₂) for 60 minutes. Intraperitoneal saline injections were used for the groups Sham and HI + Saline (HIS) and of arundic acid in the groups HI+AA0,1mg/kg pre-hypoxia (HIAA0,1pre), HI+AA 1mg/kg pre-hypoxia (HIAA1pre), HI+AA10mg/kg pre-hypoxia (HIAA10pre) and HI+AA10 mg/kg pre and post-hypoxia (HIAA10pre and post). Pre groups received arundic acid immediately prior to hypoxia and the Post group at intervals of 1, 24 and 48 hours after surgery. The results demonstrated that the arundic acid was effective at a dose of 10 mg/kg applied before and after hypoxia, being able to reduce tissue damage in the ipsilateral hippocampus to carotid occlusion, also promoted astrocytic survival in the hippocampus, reduced extracellular release of S100b in liquor, promoted maintenance of expression of glutamate transporter levels (GLT-1 and GLAST) and glutamine synthetase, but was not able to improve HI-induced cognitive deficits.

Key Words: Hypoxia ischemia (HI), arundic acid (ONO-2506), inflammation, neuroprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - Receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ATP - Adenosina trifosfato

Ca²⁺ - Íon cálcio

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

DPN7 - Dia pós-natal 7

GABA_A - Receptor ácido gama-aminobutírico A

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

GLAST - Transportador de aminoácido excitatório do tipo 1

GLT-1 - Transportador de aminoácido excitatório do tipo 2

Glu_e - Glutamato extracelular

GSH - Glutationa

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HI - Hipóxia-isquemia

IL-1 - Interleucina-1

IL-1β - Interleucina-1β

iNOS - Óxido nítrico sintetase induzível

LCR - Líquido céfalo-raquidiano

MCAO - Oclusão da artéria cerebral média

Na⁺/K⁺ - Bomba de sódio e potássio

Na⁺/K⁺- ATPase – Enzima sódio e potássio ATPase

NMDA - N-metil D-Aspartato

NO - Óxido Nítrico

NOS - Óxido nítrico sintetase

ONO-2506 - Ácido arúndico

pMCAO - Oclusão permanente da artéria cerebral média

EROS - Espécies reativas de oxigênio

S100b - Proteína ligante de cálcio b

SNC - Sistema nervoso central

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

1. INTRODUÇÃO

A lesão hipóxico-isquêmica perinatal (HI) é uma das principais causas de mortalidade aguda e morbidade neurológica crônica em lactentes e crianças (VANNUCCI, 2004). As consequências neuropatológicas da HI dependem tanto da intensidade e duração do evento, quanto da idade do parto (VOLPE, 2009). Cerca de 20 a 50% dos recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquêmica morrem no período neonatal, e até 25% dos sobreviventes apresentam algum problema neuropsicológico permanente (VANNUCCI, 2004), incluindo retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia ou dificuldade na aprendizagem (VANNUCCI, 2004; VOLPE, 2009). A asfixia intrauterina severa causada pela redução da circulação sanguínea uterina ou umbilical decorrente da síndrome de oclusão da veia cava, compressão do cordão umbilical, contratura uterina, dentre outros, é a principal causa da lesão cerebral hipóxico-isquêmica em neonatos (BERGER; GARNIER, 1999; VOLPE, 2009). Complicações sistêmicas frequentemente ocorrem e incluem alterações cardiovasculares, respiratórias, metabólicas e renais, sendo, no entanto, o sistema nervoso central (SNC) a estrutura mais comprometida (PERLMAN, 1997).

Diferentes modelos experimentais de HI em animais neonatos podem produzir lesões cerebrais previsíveis e semelhantes às observadas clinicamente em seres humanos (ALMLI et al., 2000). A maioria desses estudos experimentais se utilizou do modelo de lesão cerebral hipóxico-isquêmica unilateral em ratos imaturos (VANNUCCI, 2004). Esta metodologia consiste na oclusão unilateral da artéria carótida comum, seguida de um período de hipóxia sistêmica, produzida pela exposição à um ambiente hipóxico com 8% de oxigênio. Os filhotes de ratos de 7 dias podem sobreviver até 3 horas e meia, após esse período pode ocorrer uma mortalidade significativa (RICE 3RD; VANNUCCI;

BRIERLEY, 1981). A lesão geralmente é restrita ao hemisfério ipsilateral à oclusão e é observada principalmente no córtex cerebral, substância branca subcortical e periventricular, estriado/tálamo e hipocampo (RUMAJOGEE et al., 2016; VANNUCCI, 2004). Sua magnitude depende da severidade e da duração da HI (HASSELL et al., 2015).

Esse fenômeno que compromete primeiramente certas estruturas encefálicas ou de modo mais intenso algumas estruturas em relação a outras, mostra que a lesão HI não afeta as células de modo uniforme, o que é conhecido como vulnerabilidade seletiva (SANCHES et al., 2013). Essa vulnerabilidade está diretamente correlacionada à presença de glutamato tecidual e outros aminoácidos excitatórios, (MCQUILLEN et al., 2003; VANNUCCI, 2004), à diferença de demanda energética local e ao momento da maturação celular em que a lesão hipóxico-isquêmica incide (JOHNSTON et al., 2001; SANCHES et al., 2013).

Durante o período agudo após a HI, conhecido como fase primária (Figura 1) ocorre a falha energética, que é caracterizada pela redução no fluxo sanguíneo e pela queda no suprimento de oxigênio; com isso, compostos fosforilados de alta energia tais como ATP e a fosfocreatina são reduzidos, levando à acidose tecidual (LOREK et al., 1994). A falência energética promovida pela HI também causa uma diminuição na atividade da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+), que é regulada pela enzima Na^+/K^+ -ATPase, com imediata redução da função axonal, devido à perda do potencial de membrana (ERECIŃSKA; SILVER, 1994). Ocorre a liberação excessiva de glutamato nas fendas sinápticas e, possivelmente, outros neurotransmissores excitatórios, como a glicina, que contribuem para a abertura de receptores de glutamato do tipo NMDA (N-metil D-Aspartato), o que aumenta o influxo de cálcio (Ca^{2+}) (JOHNSTON et al., 2001).

O aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático pode ocorrer por diversos mecanismos, que inclui o aumento da ativação dos canais receptores de glutamato

(NMDA e do canal receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA)), e/ou outros canais e transportadores, ou, ainda, pela liberação de Ca^{2+} armazenado em organelas como as mitocôndrias e retículos endoplasmáticos. Esse aumento na biodisponibilidade de cálcio ativa cascatas neurotóxicas, além da formação de um gradiente osmótico que favorece a formação do edema e na lise celular (HASSELL et al., 2015). O Ca^{2+} ativa a óxido nítrico sintase neuronal, que conduz à liberação do radical óxido nítrico (NO), resultando na disfunção mitocondrial, dano oxidativo e morte celular (HAGBERG et al., 2009; VANNUCCI, 2004). O Ca^{2+} também desencadeia a ativação de fosfolipases citosólicas, que aumentam a liberação de eicosanóides, levando à inflamação (HASSELL et al., 2015). Após esse período de isquemia, muitos neurônios se “recuperam”, pelo menos parcialmente após o insulto, na chamada fase "latente"; porém, adisfunção e a morte celular é progressiva (DAVIDSON et al., 2015). A duração da fase latente é inversamente relacionada à gravidade do insulto, ou seja, quanto mais severo o comprometimento energético durante a HI, menor será a fase latente, consequentemente o déficit energético secundário e a morte neuronal serão mais extensos (IWATA et al., 2007). Acredita-se que a cascata neurotóxica seja amplamente inibida durante a fase latente, quando há inibição endógena do metabolismo oxidativo e aumento da oxigenação tecidual (HASSELL et al., 2015).

A fase secundária é marcada pelo início das convulsões, edema citotóxico, acumulação de citocinas e falência mitocondrial. A falha mitocondrial leva à morte celular tardia. O grau de falha energética influencia o tipo de morte neuronal durante o estágio inicial e tardio, e o grau de suporte trófico influencia a angiogênese e a neurogênese durante a fase de recuperação após HI (HASSELL et al., 2015).

Após a morte celular em massa, durante a fase secundária, existe uma fase terciária de reparo e reorganização. Durante esse período, são estimulados o

desenvolvimento de novas células e a "reconexão" dos circuitos neuronais sobreviventes, ao mesmo tempo, há evidências de que, ocorram apoptoses fisiológicas, que podem ser reguladas positivamente, o que pode prejudicar a produção e a sobrevivência de novas células, levando a perda de células durante vários meses. Os mecanismos que ocorrem após esta lesão não foram totalmente elucidados, mas podem refletir, em parte, processos inflamatórios persistentes e mudanças epigenéticas (DAVIDSON et al., 2015).

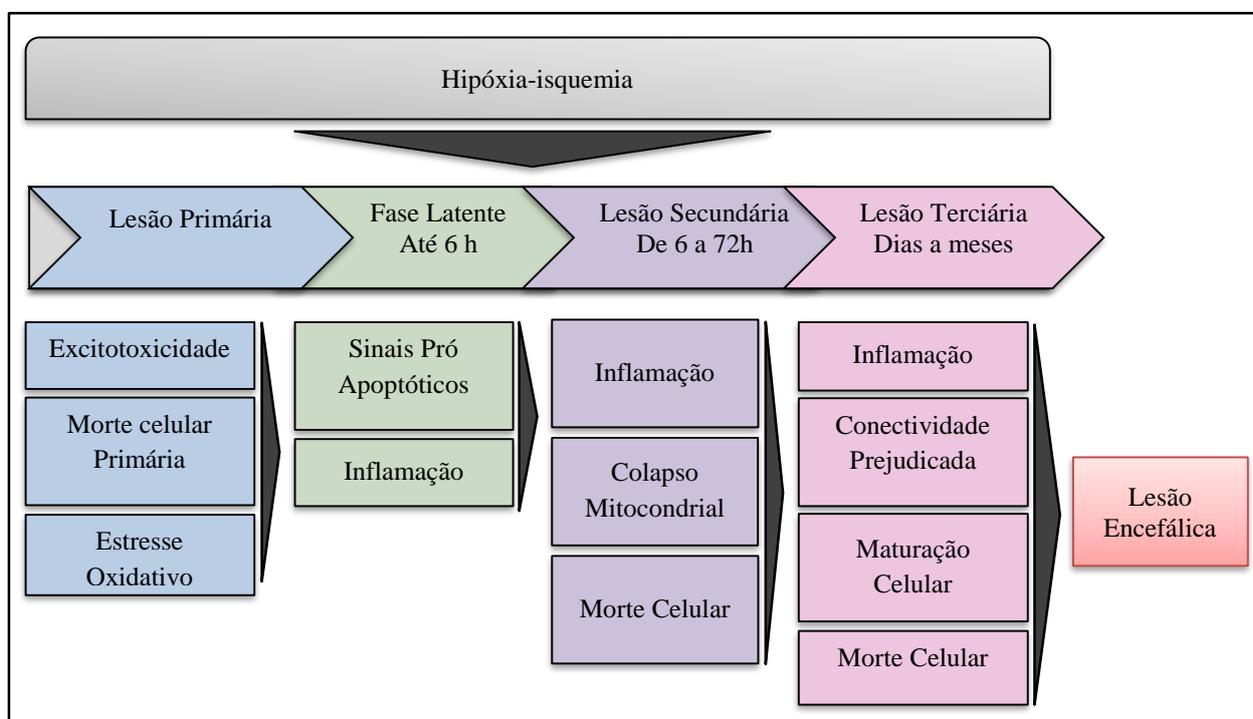


Figura 1. Mecanismos da evolução da lesão neural. Fases primária, latente, secundária e terciária da HI que contribuem para o dano de longo prazo (Adaptado de Davidson et al., 2015).

A resposta imunitária aguda no sistema nervoso central é mediada principalmente por células gliais, como astrócitos e microglia, que atuam como sensores intrínsecos ao dano, reagindo à insultos de modo rápido e efetivo, principalmente pela liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (ZHAO et al., 2013). Embora, ainda não esteja claro se os efeitos prejudiciais da inflamação superam os efeitos neuroprotetores ou vice-

versa, há uma noção de que a microglia e os astrócitos exerçam efeitos nocivos e de proteção, respectivamente (ASANO et al., 2005). Mediadores inflamatórios como as citocinas são lançados pela microglia durante uma resposta imune inata, influenciando os neurônios e sua capacidade de processar informações, tornando a inflamação um fator importante na patogênese da lesão hipóxico-isquêmica (SUN; CALVERT; ZHANG, 2005). Esses processos inflamatórios podem continuar por várias semanas após o insulto inicial (HAGBERG et al., 2015) e um dos fatores mais importantes para determinar a gravidade de lesões no SNC é a ativação da resposta imune; sendo mais severas as sequelas, quanto maior for a resposta imunitária (SANCHES et al., 2012).

A inflamação aguda contribui consideravelmente para a patogênese da lesão (SUN; CALVERT; ZHANG, 2005; YIN et al., 2007) por meio do desencadeamento da expressão de uma série de genes pró-inflamatórios, que induzem a síntese de fatores de transcrição e de mediadores inflamatórios, como o fator de ativação de plaquetas, o TNF α e a IL-1 β , produzidos pelas células cerebrais lesadas (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999). Com isso, no endotélio vascular ocorre a indução da expressão de moléculas de adesão (selectinas, integrinas e super-família de imunoglobulinas) (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007), que irão interagir com receptores de superfície complementares em neutrófilos (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999). Os neutrófilos se aderem ao endotélio isquêmico e conseqüentemente penetram a barreira hematoencefálica, liberando radicais de oxigênio e enzimas proteolíticas, que aumentam o dano tecidual (HUANG et al., 2009). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegar ao tecido isquêmico horas após a reperfusão (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007). Macrófagos e monócitos seguem os neutrófilos, migrando para o encéfalo isquêmico, tornando-se predominantes entre o quinto e o sétimo dia após a isquemia (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

Os astrócitos são células fundamentais para o funcionamento neural, participando no metabolismo energético, na manutenção da homeostase de íons, atuando nas defesas antioxidantes, sintetizando e secretando glutatona (GSH) (GRIFFITH, 1999; MARTIN; TEISMANN, 2009), modulando a transmissão sináptica, sinaptogênese e neurogênese (MATSUI et al., 2002; WAJIMA et al., 2013). No entanto, além desses efeitos benéficos os astrócitos podem exercer efeitos prejudiciais sob certas condições patológicas (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

A microglia e os astrócitos trabalham em sinergia em qualquer tipo de distúrbio agudo e/ou crônico do SNC, conduzindo invariavelmente a ativação microglial (WAJIMA et al., 2013), que por sua vez, desencadeia e aumenta a ativação astrocítica por meio da liberação de citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1 β) e IL-6 (ASANO et al., 2005; LAKHAN; KIRCHGESSNER; HOFER, 2009). A microglia ativada exerce uma influência negativa ao produzir de uma série de substâncias tóxicas, como radicais de oxigênio, NO e citocinas. Do mesmo modo que a microglia, os astrócitos ativados produzem uma variedade de substâncias neurotóxicas e neurotróficas (ASANO et al., 2005; TICHAUER; SAUD; VON BERNHARDI, 2007). Resultados recentes demonstram que a relação sinérgica entre as células gliais ocorre por meio de um ciclo de feedback positivo, ou seja, “o ciclo das citocinas” (ASANO et al., 2005).

Acredita-se que a S100b seja o principal agente perpetuador do dano cerebral (MORI et al., 2006; OHTANI et al., 2007; WAJIMA et al., 2013). Em concentrações micromolares, a S100b leva à superexpressão da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), que por sua vez, induz a produção de NO levando à morte astrogliar e neuronal (MORI et al., 2006; OHTANI et al., 2007; WAJIMA et al., 2013).

A S100 é uma proteína de ligação ao Ca^{2+} de 20 kDa composta de subunidades α e β , S100- α e S100- β , essa última, é confinada quase que exclusivamente no encéfalo (96%) e expressada por células astrogliais (PETTIGREW et al., 2006). A S100b está envolvida na regulação do metabolismo, na organização do citoesqueleto, na fosforilação e degradação de proteínas, na homeostase do Ca^{2+} , no controle da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (DONATO et al., 2013, 2009). Ela é amplamente utilizada como um parâmetro de ativação e/ou morte da glia em várias condições de lesão encefálica (GONÇALVES; CONCLI LEITE; NARDIN, 2008).

A S100b é secretada em condições inflamatórias e os valores de pico de proteína no sangue estão correlacionados ao tamanho da lesão, aos déficits cognitivos e à gravidade de perturbações psiquiátricas (YANG et al., 2008). Na clínica, há relatos de elevação da proteína S100 no líquido céfalo-raquidiano (LCR) em uma ampla variedade de doenças neurológicas, incluindo acidente vascular cerebral. Concentrações de S100b no soro e no LCR agem como um indicador de volume do infarto e prognóstico da lesão cerebral isquêmica aguda (ASANO et al., 2005). Além disso, as elevações nos níveis da S100b e da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), estão correlacionadas após infarto cerebral (PETTIGREW et al., 2006). A GFAP é um filamento monomérico intermediário de proteína, outro biomarcador expresso por astrócitos, a qual representa a maior parcela do citoesqueleto dessa célula (HERRMANN et al., 2000). A GFAP é usada como um marcador de atividade astrocitária, estando consistentemente aumentada (astrogliose reativa) após insultos neuroinflamatórios (ROTHERMUNDT et al., 2003; SORCI et al., 2011; TRAMONTINA et al., 2007).

A fim de encontrar um agente que possua uma ação inibitória sobre a síntese astrocítica de S100b, Mori e colaboradores (2004), purificaram o ONO-2506, ou ácido arúndico (ASANO et al., 2005; MORI et al., 2004; TATEISHI et al., 2002). Testes

farmacológicos *in vitro* demonstraram que o ONO-2506 não possui quaisquer efeitos significativos nos receptores de neurotransmissores, enzimas como calcineurina, calpaína, óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), óxido nítrico sintase constitutivo, proteína quinase C, fator de crescimento epidérmico, tirosina quinase e vários canais de íons. Além disso, *in vivo* a droga não revelou efeitos significativos nas funções do SNC, cardiopulmonar, renal ou digestivo, até a dose de 25 mg/kg por um período de 3 meses (ASANO et al., 2005; TATEISHI et al., 2002). O ácido arúndico é dose-dependente e possui uma meia vida bifásica. A primeira fase se inicia de 2 a 15 minutos após a administração, com uma meia-vida de aproximadamente de 7 min. A segunda fase começa 6h pós-aplicação e diminui lentamente, com uma meia vida de aproximadamente 5h (ASANO et al., 2005), sua janela terapêutica varia entre 0 e 48h após a isquemia (ASANO et al., 2005; TATEISHI et al., 2002). O ácido arúndico é metabolizado por meio da oxidação hepática e conjugação com o ácido glicurônico e excretado pela urina como metabolito (ISHIBASHI et al., 2007).

Em ratos com oclusão permanente da artéria cerebral média (pMCAO) a dose de 10 mg/kg do ONO-2506 impediu a expansão tardia do infarto entre 24 e 168 horas após a oclusão arterial. Os déficits neurológicos melhoraram significativamente 24 horas após a administração inicial do fármaco (ASANO et al., 2005; TATEISHI et al., 2002), reduzindo significativamente a expressão de S100b nos astrócitos ativados na área peri-infartada (ASANO et al., 2005; HANADA et al., 2014; HIGASHINO et al., 2009; MORI et al., 2004; TATEISHI et al., 2002). Contudo, a expressão de GFAP não se mostrou alterada nas concentrações de 30 à 300mmol/L de ácido arúndico injetado, nem em cultura de astrócitos. Achados no modelo transitório de MCAO em ratos sugerem que o ácido arúndico provoque uma inibição parcial das respostas inflamatórias decorrentes da isquemia cerebral por meio da supressão da expressão de RNAm de Óxido Nítrico Sintase

induzida (iNOS), da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e tromboxano B2 (ASANO et al., 2005) (Figura 2).

Em astrócitos cultivados, altas doses de ácido arúndico resultaram em aumento significativo na expressão de RNAm de receptores ácido gama-aminobutírico A (GABA_A) (PETTIGREW et al., 2006). Esses receptores são expressos em altos níveis em astrócitos no encéfalo maduro. Acredita-se que a isquemia cerebral suprima a transmissão GABAérgica neuronal e que o aumento desse receptor poderia reduzir a lesão isquêmica (ASANO et al., 2005). A excitotoxicidade e o desequilíbrio iônico induzidos pelo glutamato são os principais eventos iniciais do estresse cerebral isquêmico, que afetam os elementos neuronais, não neuronais e vasculares no território cerebral afetado (VERMA et al., 2010). A captação do glutamato que é liberado no espaço extracelular após a HI é realizada principalmente por uma família de cinco subtipos de transportadores dependentes de sódio (VERMA et al., 2010), dentre estes estão o transportador de aminoácido excitatório do tipo 1 (GLAST) e o transportador de aminoácido excitatório do tipo 2 (GLT-1) (expressos em astrócitos), os quais são os principais responsáveis pela manutenção dos baixos níveis extracelulares de glutamato (MATSUGAMI et al., 2006), sendo o GLT-1 responsável pela captação de 90% do glutamato no prosencéfalo adulto (VERMA et al., 2010). Uma vez captado da fenda sináptica, o glutamato é metabolizado pela enzima glutamina sintetase (GS) em glutathiona (GSH) e esta retorna ao neurônio, onde essa pode ser reconvertida em glutamato (XIN; WENG; DOUGHERTY, 2009). O aumento pós-isquêmico na atividade da GS no astrócito sugere que a capacidade de absorver o glutamato e convertê-lo em GSH está aumentada após a isquemia (VERMA et al., 2010).

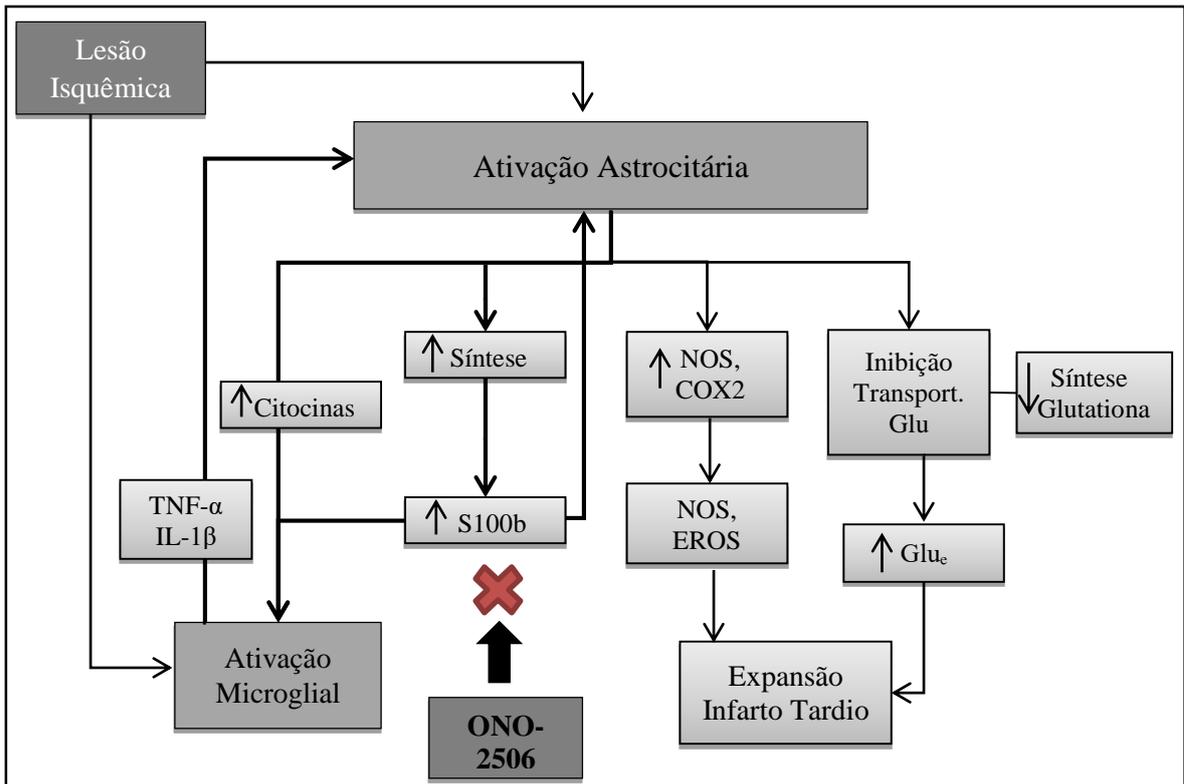


Figura 2. Mecanismo proposto para expansão tardia do infarto após isquemia cerebral focal. O Ácido arúndico suprime o ciclo das citocinas (linhas grossas) inibindo a síntese astrocitária de S100b. COX-2: Ciclooxigenase-2, GFAP: proteína ácida fibrilar glial, [Glu]_e: glutamato extracelular, IL-1b: interleucina-1b, NO: óxido nítrico, NOS: óxido nítrico sintetase, TNF- α : fator de necrose tumoral α , EROS: espécies reativas de oxigênio.

A disfunção nos transportadores de glutamato tem sido relacionada com a patogênese de vários distúrbios neurológicos debilitantes e de etiologias diversas, incluindo esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, várias formas de epilepsia, isquemia/acidente vascular cerebral e lesão cerebral traumática (VERMA et al., 2010). O ONO-2506 em altas doses em cultura de astrócitos leva ao aumento dos níveis de expressão de RNAm dos transportadores de glutamato astrocíticos e da síntese de glutaciona. Propõe-se que a sua ação neuroprotetora sobre os astrócitos se dê primeiramente por meio do aumento dos transportadores de glutamato astrocíticos, aumentando assim a captação de Glu_e e outros aminoácidos necessário para a síntese de GSH. A glutaciona recém sintetizada é transportada para os neurônios, onde tem sua

síntese aumentada, promovendo proteção contra o dano oxidativos celular (ASANO et al., 2005).

Os efeitos positivos do ácido arúndico nas diversas respostas celulares acima e em outras doenças neurológicas já descritas como doença de Alzheimer (CUI et al., 2012), doença de Parkinson (HIMEDA et al., 2006; OKI et al., 2008), esclerose amiotrófica lateral (MIYAMOTO et al., 2011) e lesões na medula espinhal (HANADA et al., 2014) são atribuídos à sua ação inibitória na síntese de S100b e possível supressão do aumento de citocinas e não nas vias de sinalização subsequentes.

Tendo em vista o grande impacto do dano neurológico causado pela encefalopatia hipóxico-isquêmica (HI) na vida dos indivíduos por ela acometidos e a ausência de relatos sobre os efeitos do ácido arúndico no modelo experimental de HI em ratos Wistar, este trabalho visou investigar o possível efeito e mecanismos pelo qual o ONO-2506 pode proteger o encéfalo neonatal contra os danos hipóxico-isquêmicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos neuroprotetores do ácido arúndico quando administrado nos períodos pré e pós hipóxia sobre parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos no modelo de hipóxia-isquemia neonatal em ratos *Wistar*.

2.2 Específicos

- 1) Determinar a dose mais efetiva do ácido arúndico (0,1; 1 ou 10 mg/kg administrado pré-hipóxia) no tratamento da HI tendo por base o desempenho dos animais no labirinto aquático de Morris;
- 2) Avaliar o dano tecidual e o efeito do ONO-2506 sobre o volume dos hemisférios cerebrais, dos hipocampos e dos córtices dos animais na idade adulta;
- 3) Definida a melhor dose do ONO-2506, avaliar o desempenho na tarefa de Water maze e verificar seu efeito neuroprotetor sobre o dano tecidual;
- 4) Quantificar a proteína S100b no LCR e no hipocampo 48h após HI.
- 5) Quantificar a expressão das proteínas GFAP, GLT-1, GLAST e atividade da GS no tecido hipocampal 48 horas após a última dose administrada;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas, para este trabalho, as proles de 18 ratas fêmeas Wistar nulíparas com idade superior a 90 dias, obtidas do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. As fêmeas foram mantidas em caixas-padrão isoladas (a partir do 19º dia gestacional) até o momento do parto. As proles de ambos os sexos foram padronizadas em ninhadas de 9 a 12 animais. Todos os animais foram mantidos em ciclos claro e escuro de 12h em salas climatizadas ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), com alimentação e água à vontade durante todas as etapas do projeto no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os procedimentos foram realizados de acordo com Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication 85-23, 1985) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul nº 29715.

3.2 Hipóxia-Isquemia

Aos 7 dias de vida (DPN7), os animais foram submetidos à associação do procedimento cirúrgico de oclusão permanente da artéria carótida direita (cuja duração máxima não ultrapassou 10 minutos por animal), seguido da exposição à uma atmosfera hipóxica (8% de O_2) por 60 minutos. Para tal, os mesmos foram anestesiados com halotano 4% e posicionados em decúbito dorsal. Foi realizada uma incisão na linha média da face anterior da região cervical, expondo a artéria carótida comum direita, que após ser isolada de suas estruturas adjacentes foi ocluída com fio cirúrgico de seda 4.0, neste momento os animais receberam aplicação tópica de lidocaína 10% (Xilocaína®). Ao final desse procedimento, os animais permaneceram aquecidos durante um período de

recuperação de 15 minutos antes de serem devolvidos às caixas moradia, onde permaneceram por um intervalo de 2 horas junto às mães. Por fim, foram colocados em uma câmara hermeticamente fechada de 1500 ml de volume e expostos a uma atmosfera de 8% de oxigênio e 92% de nitrogênio, com fluxo de 5 L/min, por 60 minutos, em grupos de quatro a seis animais. A câmara de hipóxia permaneceu parcialmente submersa em banho-maria a 37°C a fim de manter a temperatura corporal dos ratos lactentes dentro dos seus limites fisiológicos. Ao final da hipóxia, os animais foram retirados da câmara, permanecendo por 15 minutos sob aquecimento para a recuperação e em seguida foram devolvidos à caixa de origem junto às mães (ARTENI et al., 2003).

Os animais do grupo Sham (controle cirúrgico) foram anestesiados para posterior realização da incisão e exposição da carótida, porém, não foram submetidos à oclusão da carótida e à hipóxia. Os animais do grupo Naïve não receberam manipulação.

3.3 Desenhos Experimentais

Até o presente momento, ainda não há relatos na literatura sobre o tratamento com ácido arúndico em ratos submetidos a HI neonatal, por esse motivo, optou-se pela realização de três experimentos. O primeiro determinou, por meio das alterações comportamentais e histológicas, a dose mais efetiva do ONO-2506 quando aplicado pré-hipóxia. Uma vez escolhida a dose, foi realizado o segundo experimento, que avaliou os mesmos parâmetros comportamentais e histológicos, porém com aplicações da droga nos períodos pré e pós-hipóxia. No terceiro experimento, foi quantificada a expressão de marcadores astrocitários classicamente envolvidos na lesão HI, no líquor e hipocampo 48 horas após a HI, que poderiam estar mediando a neuroproteção induzida pelo ácido arúndico.

Para a realização do primeiro experimento os animais foram aleatoriamente separados em 6 grupos: Sham, HI+Salina (HIS), HI+Ácido Arúndico 0,1mg/kg pré-hipóxia (HIAA0,1-Pré), HI+Ácido Arúndico 1mg/kg pré-hipóxia (HIAA1-Pré), HI+Ácido Arúndico 10mg/kg pré-hipóxia (HIAA10-Pré). A coleta das amostras para as análises histológicas ocorreu no DPN52. O desenho experimental está ilustrado na Figura 3.

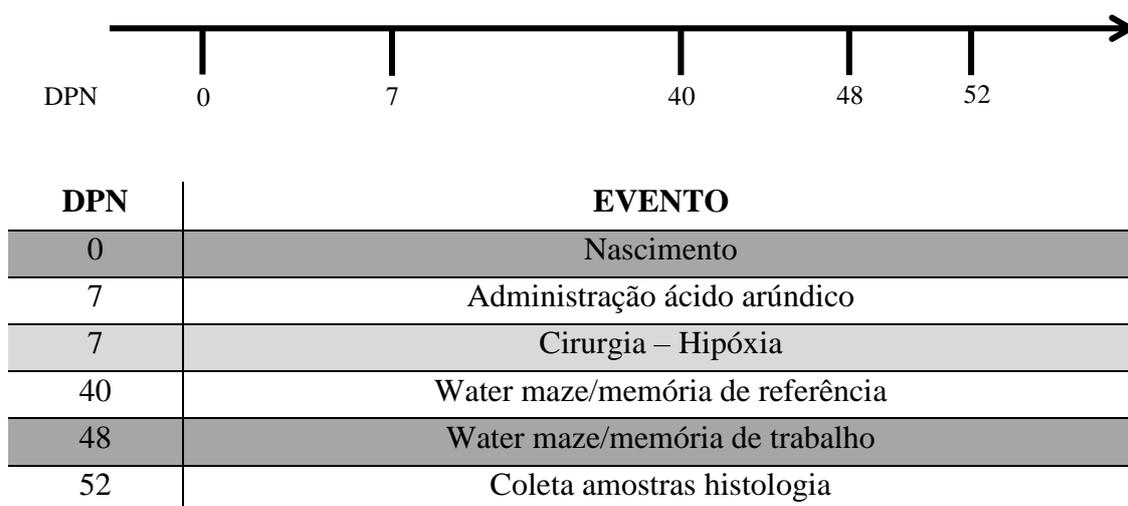
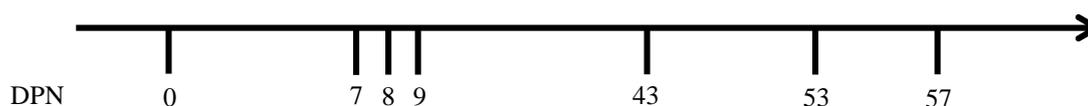


Figura 3. Esquema desenho experimental I- Ordem cronológica contada após o nascimento (DPN0) e os procedimentos realizados.

No segundo experimento os animais foram separados aleatoriamente em 3 grupos: Sham, HI+Salina (HIS), HI+Ácido Arúndico 10mg/kg pré e pós-hipóxia (HIAA10 pré-pós). A coleta das amostras para as análises histológicas ocorreu no DPN57 conforme demonstrado na figura 4.



DPN	EVENTO
0	Nascimento
7	1ª Aplicação ácido arúndico
7	Cirurgia - Hipóxia
8	2ª Aplicação ácido arúndico
9	3ª Aplicação ácido arúndico
43	Water maze/memória de referência
53	Water maze/memória de trabalho
57	Coleta de amostras para histologia

Figura 4. Esquema desenho experimental II - Ordem cronológica contada após o nascimento (DPN0) e os procedimentos realizados.

No terceiro experimento os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos: Sham, Naïve, HI+Salina (HIS), HI+Ácido Arúndico 10mg/kg pré e pós-hipóxia (HIAA10 pré-pós). A coleta das amostras para as análises bioquímicas ocorreu no DPN9, cinco horas após a última aplicação do ONO-2506, como demonstrado na figura abaixo.

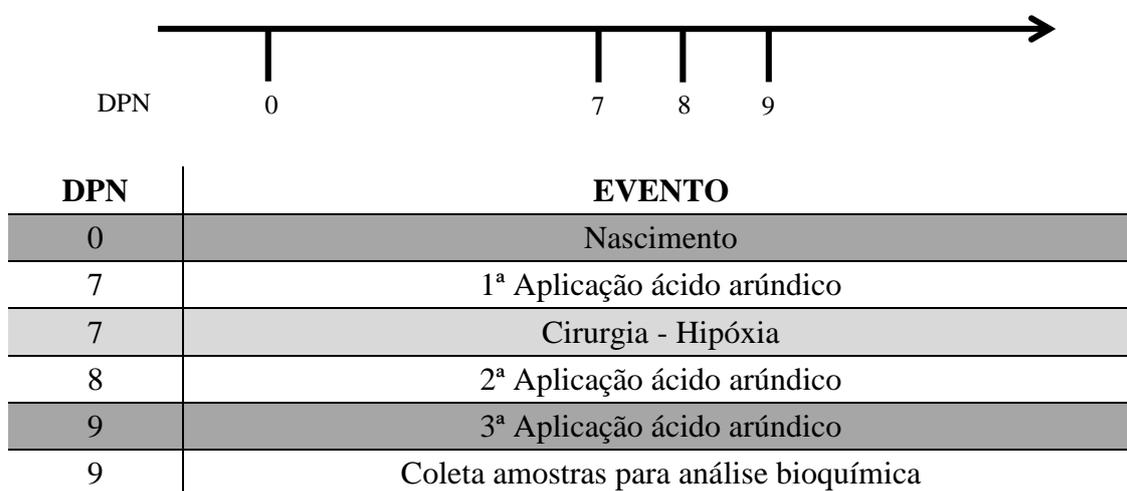


Figura 5. Esquema desenho experimental III - Ordem cronológica contada após o nascimento (DPN0) e os procedimentos realizados.

3.4 Administração das Substâncias

A fim de determinar a dose mais efetiva do ONO-2506 no tratamento da HI neonatal, foram testadas 3 doses (0,1; 1 e 10 mg/kg) no primeiro experimento e aplicados por injeção via intraperitoneal (i.p) imediatamente pré-hipóxia. Os animais do grupo Sham e HIS receberam salina no mesmo volume e tempo (Tabela 1).

Grupos	Sham	HIS	HIAA0,1	HIAA1	HIAA10
Pré-hipóxia	Salina	Salina	Ácido Arúndico 0,1mg/kg	Ácido Arúndico 1mg/kg	Ácido Arúndico 10mg/kg

Tabela 1. Representação do protocolo de administração de substâncias do I experimento.

No segundo experimento, o ácido arúndico foi igualmente diluído em salina e administrado por injeções i.p no volume de 0,01 ml/g, imediatamente pré-hipóxia, 24 e 48 horas pós-hipóxia. Os animais do grupo Sham e HIS receberam salina nos mesmos volumes e em todos os tempos, como exemplificado na tabela abaixo.

Grupos	Sham	HIS	HIAA10
Pré-hipóxia	Salina	Salina	Ácido Arúndico
24h Pós-hipóxia	Salina	Salina	Ácido Arúndico
48h Pós-hipóxia	Salina	Salina	Ácido Arúndico

Tabela 2. Representação do protocolo de administração de substâncias do II experimento.

Para o terceiro experimento que visou a coleta de amostras para as análises bioquímicas no DPN9, cinco horas após a última aplicação do ONO-2506, foi utilizado o mesmo protocolo de administração do segundo experimento, porém foi adicionado o grupo Naïve, no qual não foi administrado nenhum tipo de substância (Tabela 3).

Grupos	Sham	HIS	HIAA10	Naïve
Pré-hipóxia	Salina	Salina	Ácido Arúndico	-
24h Pós-hipóxia	Salina	Salina	Ácido Arúndico	-
48h Pós-hipóxia	Salina	Salina	Ácido Arúndico	-

Tabela 3. Representação do protocolo de administração de substâncias do III experimento.

3.6 Análise Histológica

Os animais foram anestesiados com uma dose letal de tiopental sódico na dose de 100mg/kg de massa corporal por via intraperitoneal e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina (0,9%), seguido de uma solução de paraformaldeído (4%), no DPN52 para os animais do 1º experimento e no DPN57 para os do 2º experimento. Os encéfalos foram removidos, pesados e mantidos na mesma solução de paraformaldeído por 4 horas. Após, os encéfalos foram crioprotetidos com soluções crescentes de sacarose 15% e 30%, congelados e cortados no criostato a 30µm (SANCHES et al., 2015).

3.7.1 Volume da Lesão

A análise volumétrica das estruturas de interesse foi realizada pelo método de Cavalieri após as lâminas histológicas terem sido coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina. As áreas do hipocampo, córtex e hemisfério foram delineadas em todos os cortes (Paxinos & Watson, 1986) e o volume das estruturas foi calculado por meio da soma das áreas multiplicadas pelo intervalo da secção dos cortes (ARTENI et al., 2010). As imagens dos encéfalos foram capturadas com uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio (Nikon), utilizando-se o software NIS-Elements Ar v4.3 e as áreas foram avaliadas por meio do software Image J v1.49. A relação entre os lados ipsi e

contralaterais foi determinada pela razão entre o volume da estrutura do lado ipsilateral e o volume do lado contralateral (WANG et al., 2002).

3.8 Análises Bioquímicas

No DPN9 os animais foram decapitados para a coleta das amostras e posterior realização das análises bioquímicas (Desenho experimental 3). As estruturas de interesse foram dissecadas e armazenadas em eppendorfs à -80°C até a análise.

3.8.2 ELISA

3.8.2.1 ELISA de S100b

Como previamente descrito (LEITE et al., 2008), o imunoconteúdo de S100b foi medido por ELISA. A amostra de 50 µL em 50 µL de tampão Tris foi incubada por 2h em uma placa de microtitulação, revestida com o anticorpo monoclonal anti-S100b (Sigma-Aldrich - S2532). A amostra foi incubada na placa e posteriormente incubada com anti-S100b policlonal (Dako - Z0311) por 30 min; conjugada com peroxidase anti-coelho (GE - NA934V) por 30 min. A reação de cor com o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich - P8936) foi medida a 492 nm. A curva padrão foi determinada entre 0,002 a 1 ng/mL.

3.8.2.2 ELISA de GFAP

A técnica de ELISA para GFAP iniciou-se com o revestimento das placas de microtitulação com 100 µL de amostra do homogeneizado do hipocampo ipsilateral por 24h a 4°C. Posteriormente, foi realizada a incubação com anti-GFAP de coelho policlonal

(DAKO - Z0334) por 1h, seguida de incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (GE - NA934V) por 1 hora à temperatura ambiente. A reação colorimétrica com o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich - P8936) foi medida a 492 nm. A GFAP humana foi utilizada para determinar a curva-padrão (Calbiochem), nas concentrações de 0,1 a 5 ng/mL (TRAMONTINA et al., 2007).

3.8.2.3 ELISA de GS

O ensaio enzimático da atividade da glutamina sintetase foi realizado como descrito por dos Santos e colaboradores (2006). Resumidamente, as amostras de tecido homogeneizado foram adicionadas a uma mistura contendo (em mM): 10 mM de MgCl₂, 50 mM de glutamato, 100 mM imidazol-HCl (pH 7,4), 10 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mM de hidroxilamina-HCl e 10 mM ATP e incubados durante 15 min a 37°C. A reação foi parada pela adição de 0,4 mL de uma solução contendo (em mM): 370 mM de cloreto férrico, 670 mM de HCl e 200 mM de ácido tricloroacético. Após centrifugação, o sobrenadante foi medido a 530 nm e comparado com a absorvância gerada por quantidades padrão de γ -glutamil-hidroxamato tratado com reagente de cloreto férrico (QUINCOZES et al., 2006).

3.8.3 Western Blotting

As estruturas a serem analisadas foram homogeneizadas em tampão de lise celular. Uma alíquota (25 μ l) foi retirada para dosagem de proteínas sendo adicionado ao restante do homogeneizado β -mercaptoetanol (concentração final de 5%). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE (dodecilsulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida) em gel 12%, usando o sistema de eletroforese e blotting Mini-V8 (Gibco). O gel contendo as proteínas presentes no tecido foi transferido para uma membrana de

nitrocelulose e incubado por 2 horas em solução de bloqueio (tampão Tris-salina contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween 20, pH 7,4). O imunoconteúdo das proteínas GLAST e GLT-1 foi determinado através de anti-anticorpo específico (anti-Glast e anti-GLT-1), seguido de incubação com anticorpo anti-rabbit e anti-mouse conjugado à peroxidase (1:1000, Amersham). A quimioluminescência (ECL, Pharmacia) foi detectada através de filmes de raios-X. Os filmes de ECL foram escaneados e o imunoconteúdo analisado através do software “OptiQuant” (Packard Instrument) (VIZUETE et al., 2013).

3.8.4 Dosagem de Proteínas

Os níveis de proteína foram determinados segundo o método de Bradford (1976). O método se baseia no corante Coomassie Brilliant Blue, que ao ligar-se às proteínas, tem a sua absorbância alterada de 465nm para 595nm (comprimento de onda de leitura no espectrofotômetro). Foi utilizada albumina sérica bovina como padrão na concentração de 1mg/ml (BRADFORD, 1976).

3.8.5 Análise Comportamental

3.8.5.1 Labirinto Aquático de Morris

Testa a memória espacial dos animais. O labirinto consiste de um tanque circular de 200cm de diâmetro, sendo 40cm de profundidade cobertos por água (temperatura de \pm 23°C), situada em uma sala contendo pistas visuais nas paredes que o cercam. Uma plataforma com 10cm de diâmetro encontra-se submersa 2cm abaixo da superfície da água. Esta piscina é dividida, virtualmente, em 4 quadrantes e possui 4 pontos de partida

para o teste, designados como N (norte), S (sul), L (leste) e O (oeste). Para a avaliação da memória, foram utilizados 2 protocolos distintos, descritos abaixo:

3.8.5.1.1 Protocolo de Memória de Referência

Neste protocolo, a posição da plataforma permaneceu no mesmo local durante todo o período de treino. Os animais realizaram 4 “trials” por dia, durante 5 dias consecutivos (primeiro experimento) ou 7 dias consecutivos (segundo experimento). Vinte e quatro horas após a fase de treino foi realizado o teste, uma sessão de 60 segundos, sem a plataforma. Todos os animais foram colocados no labirinto em um mesmo ponto, o mais longe possível da posição da plataforma. Foram analisados: curva de aprendizado e tempo de latência para encontrar a plataforma no dia do teste (SANCHES, et al. 2013). Os animais foram filmados e os dados registrados pelo software ANY-MAZE.

3.8.5.1.2 Protocolo de Memória de Trabalho

Neste protocolo, foram realizadas 4 sessões por dia, com 5 minutos de intervalo entre elas, com uma posição diferente da plataforma a cada dia. A memória de trabalho foi avaliada pela média da latência de cada animal para encontrar a plataforma em cada uma das sessões (SANCHES, et al. 2013).

3.9 Análise Estatística

Através do teste de Kolmogorov-Smirnov foi verificada a normalidade dos resultados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do *post hoc* de Duncan para múltiplas comparações. A significância aceita foi de $p < 0.05$ e os testes foram realizados utilizando o programa SPSS v19.0. ANOVA medidas repetidas

4. RESULTADOS

4.1 Primeiro Experimento

4.1.1 Ácido arúndico injetado pré-hipóxia na dose de 10mg/kg não reduziu a perda do volume hipocampal causado pela HI.

Na tabela 4, estão representadas a análise dos volumes dos hemisférios, hipocampo e córtex ipsi e contralaterais à oclusão da carótida. O volume dos hemisférios não apresentou diferença significativa entre os grupos Sham, HIS, AA0,1, AA1 e AA10. Na relação dos volumes hemisféricos (isplateral e contralateral), os grupos HIS, AA0,1, AA1 e AA10 apresentaram diferença estatística em relação ao grupo Sham ($F_{(4,25)}=6,5$, $p<0.05$) (n=6 por grupo) (Figura 6A).

O volume do córtex também não demonstrou ser alterado pela lesão, pois não há diferença significativa entre os grupos. Na relação entre o córtex ipsi e contralateral apenas os grupos AA0,1 e AA1 mostraram diferença significativa em relação ao grupo Sham, sendo menores que o grupo controle ($F_{(4,25)}=2,8$, $p<0.05$) (n=6 por grupo) (Figura 6B).

		Volume Hemisfério	Volume Hipocampo	Volume Córtex
Sham	Ipsilateral	129,99 ± 28,02	10,78 ± 2,68	51,84 ± 10,88
	Contralateral	131,06 ± 27,64	10,59 ± 2,25	53,98 ± 11,46
HIS	Ipsilateral	80,35 ± 8,45	2,78 ± 0,53	34,21 ± 4,37
	Contralateral	118,22 ± 7,18	9,803 ± 0,81	48,96 ± 3,00
AA0,1	Ipsilateral	84,90 ± 13,04	4,33 ± 0,77	34,81 ± 7,61
	Contralateral	134,14 ± 12,00	12,349 ± 1,25	54,40 ± 4,94
AA1	Ipsilateral	86,42 ± 16,51	3,44 ± 1,11	40,02 ± 7,93
	Contralateral	135,23 ± 19,45	12,297 ± 1,91	58,67 ± 7,92
AA10	Ipsilateral	92,92 ± 7,47	12,06 ± 7,6	43,20 ± 4,73
	Contralateral	135,50 ± 10,56	16,874 ± 4,45	60,76 ± 5,13

Tabela 4. Volumes das estruturas encefálicas. Dados expressos em média do volume (mm³) ± erro padrão. n=6 por grupo. ANOVA de uma via seguida por post hoc de Duncan. Significância aceita quando p<0,05.

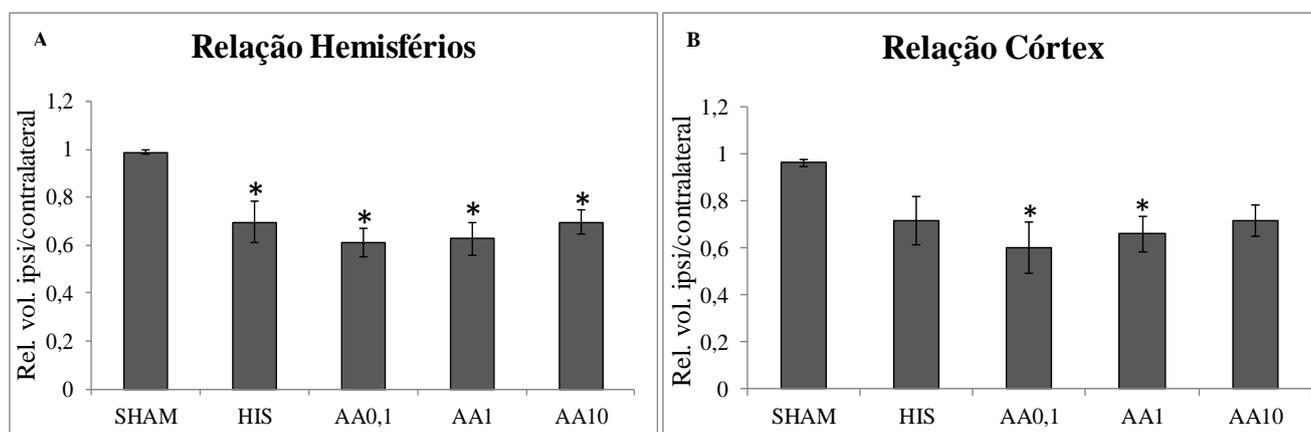


Figura 6. Análise histológica dos hemisférios e córtex I. **(A)** Relação hemisférios no DPN52. Razão do volume do hemisfério contralateral e ipsilateral à lesão. **(B)** Razão do volume do córtex contralateral e ipsilateral à lesão 52 dias após a mesma. Dados expressos em média ± erro padrão. n=6 por grupo. ANOVA de uma via seguida por Duncan. p<0,05. *Diferença para o grupo Sham. Significância aceita quando p<0,05.

O hipocampo ipsilateral foi a estrutura mais afetada pela HI. Os grupos tratados com ácido arúndico não foram capazes de reverter significativamente a redução do volume hipocampal causado pela lesão quando comparados ao grupo controle, porém no grupo tratado AA10 pode-se observar uma tendência de redução dessa lesão (Figura 7A). Na relação do hipocampo ipsi/contralateral todos os grupos lesão tratados e não tratado apresentaram uma redução do volume em relação ao Sham ($F_{(4,25)}=9,7$ p<0,05) (n=6 por grupo) (Figura 7B).

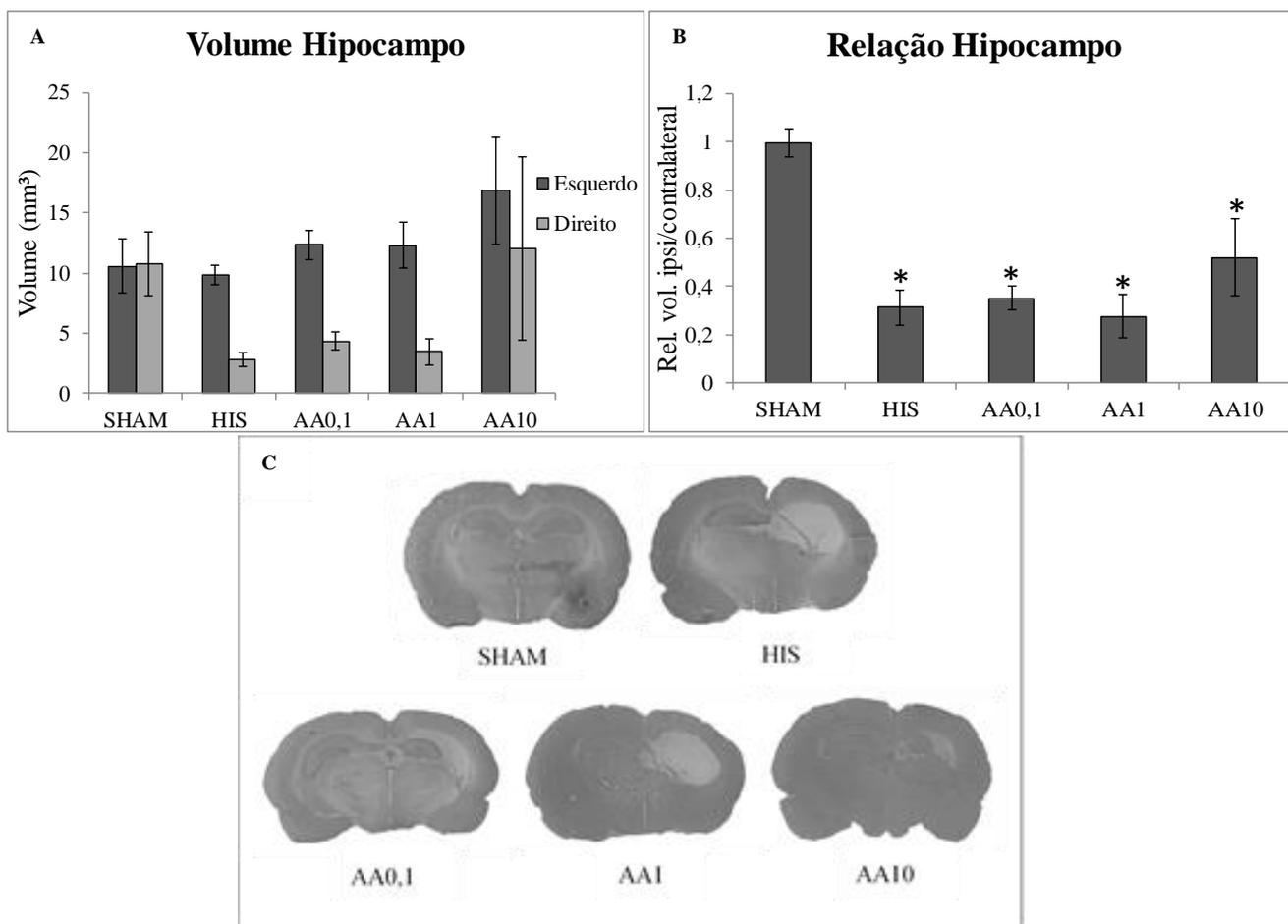


Figura 7. Análise histológica do hipocampo I. **(A)** Volume do hipocampo DPN 52- Coluna da esquerda representa o volume do hipocampo contralateral à oclusão da carótida, coluna da direita representa o volume do ipsilateral. **(B)** Relação entre os hipocampus ipsi e contralaterais no DPN52. **(C)** Imagens representativas dos encéfalos corados com HE dos diferentes grupos. Dados expressos em média \pm erro padrão. $n=6$ por grupo. ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p<0,05$. *Diferença para o grupo Sham. Significância aceita quando $p<0,05$.

4.1.2 Ácido arúndico injetado pré-hipóxia não demonstrou efeitos significativos sobre o comportamento dos animais.

Na memória de referência, a ANOVA de medidas repetidas mostrou que todos os grupos lesão (tratados ou não) apresentaram maiores curvas de aprendizado quando comparados ao grupo Sham (Figura 8A).

A análise da memória de trabalho mostrou que todos os grupos lesão diferiram significativamente do grupo Sham na relação dos trials T1-T2 ($F_{(4,53)}= 0,4$) ($n=10-15$ por grupo) (Figura 8B).

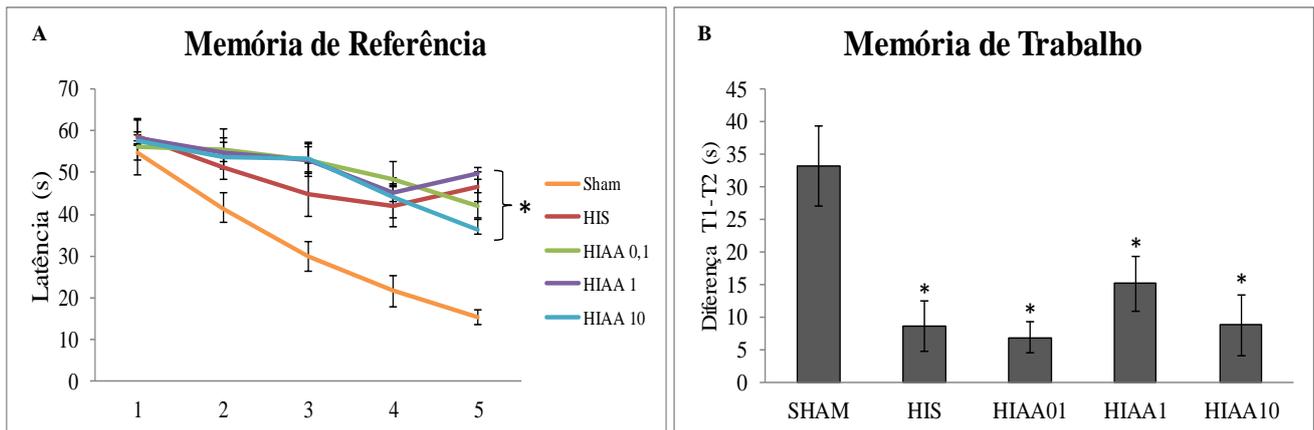


Figura 8. Water maze I. **(A)** Memória de referência. Curva de aprendizado. Os animais realizaram 4 trials por dia durante 5 dias consecutivos, todos os grupos lesão apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle em todos os dias. **(B)** Memória de trabalho. Diferença entre o 2º e o 1º trial – todos os grupos lesão apresentaram diferença estatística em relação ao Sham. Dados expressos em média \pm erro padrão. $n=10-15$ por grupo. ANOVA de medidas repetidas $p<0,05$. ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p<0,05$. *Diferença para o grupo Sham. Significância aceita quando $p<0,05$.

4.2 Segundo Experimento

4.2.1 Ácido arúndico injetado pré e pós hipóxia na dose de 10mg/kg reduziu os danos teciduais causados pela HI.

A análise do volume dos hemisférios assim como sua relação, demonstrou que apenas o grupo HIS apresentou redução do volume em relação ao grupo controle, demonstrando o efeito da HI e o efeito neuroprotetor do ácido arúndico nessa estrutura ($F_{(2,15)}=7,4$, $p<0,05$) (Figura 9A; 9B). O volume do córtex não demonstrou ser alterado pela lesão, pois não há diferença significativa entre os grupos Sham e HIS (Figura 9C), contudo na relação do volume dos córtices, houve uma redução na relação ipsi/contralateral entre os grupos HIS e Sham ($F_{(2,15)}=4,2$, $p<0,05$) ($n=6$ por grupo) (Figura 9D).

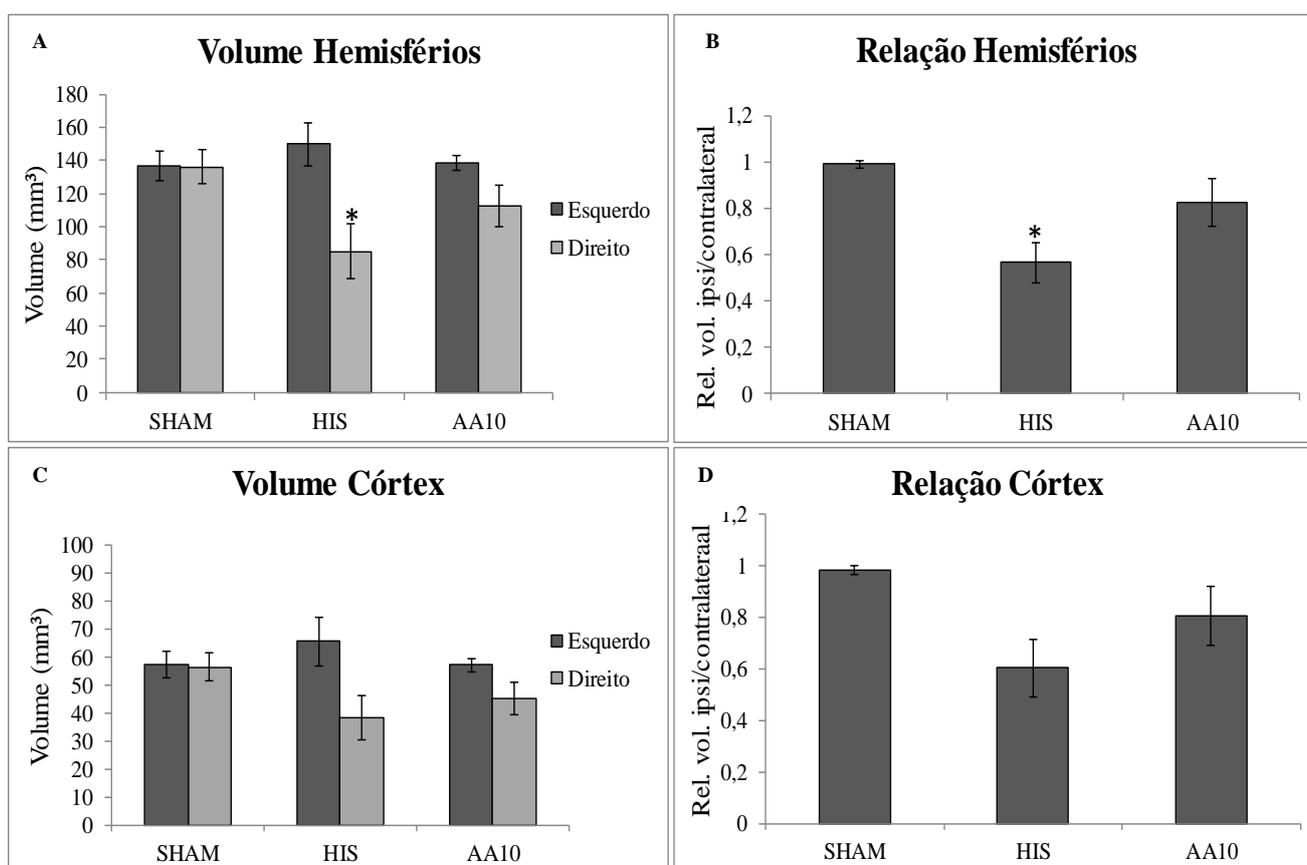


Figura 9. Histologia do córtex e hemisférios II. **(A)** Volume dos hemisférios no DPN 57. A coluna da esquerda representa o volume do hemisfério contralateral à oclusão da carótida e a coluna da direita representa o volume do ipsilateral. **(B)** Relação dos hemisférios no DPN57 - Razão do volume do hemisfério contralateral e ipsilateral à lesão. **(C)** Volume dos córtices no DPN 57. A coluna da esquerda representa o volume do córtex contralateral à oclusão da carótida e a coluna da direita representa o volume do ipsilateral. **(D)** Razão do volume do córtex contralateral e ipsilateral à lesão 57 dias após a mesma. Dados expressos em média \pm erro padrão. $n=6$ por grupo. ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p<0,05$. *Diferença para o grupo Sham. Significância aceita quando $p<0,05$.

Na figura 10A está representado o volume hipocampal aonde pode-se observar que o hipocampo ipsilateral foi novamente a estrutura mais afetada. A análise dos dados demonstra que tanto o grupo HIS quanto o grupo AA10 tiveram seu volume reduzido em relação ao grupo controle ($F_{(2,15)}= 11,9$, $p<0.05$), no entanto, o grupo AA10 por sua vez, também diferiu estatisticamente do grupo HIS ($F_{(2,15)}=1,6$, $p<0.05$) ($F_{(2,15)}=3,6$, $p<0.05$), demonstrando capacidade de redução da perda do volume hipocampal. A relação ipsi/contralateral hipocampal demonstrou o mesmo padrão, com diferença estatística entre os grupos Sham e HIS e entre HIS e AA10 ($F_{(2,15)}=11,9$, $p<0.05$) ($n=6$ por grupo) (Figura 10B).

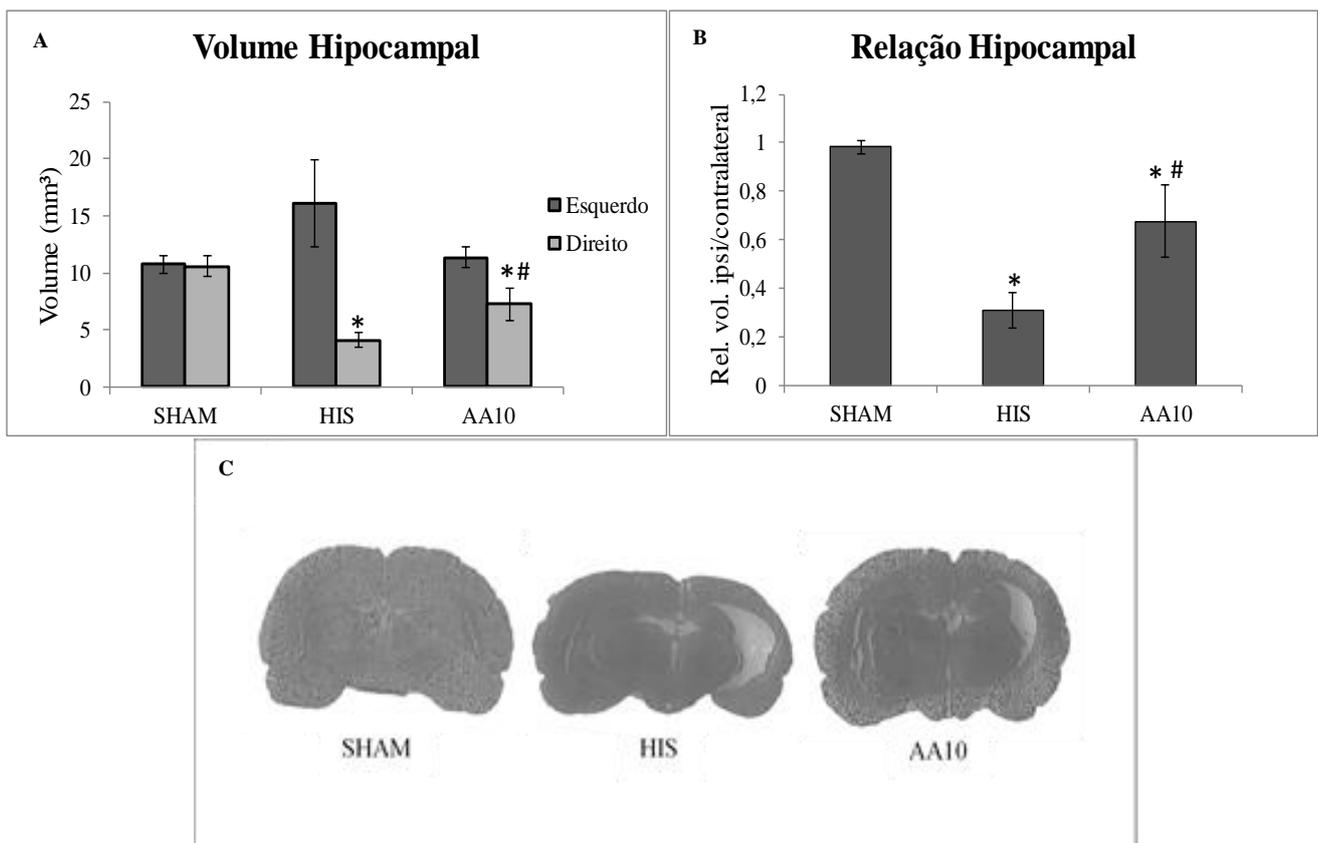


Figura 10. Histologia do hipocampo II. (A) Volume do hipocampo DPN 57- Coluna da esquerda representa o volume do hipocampo contralateral à oclusão da carótida, coluna da direita representa o volume do ipsilateral. (B) Relação hipocampo no DPN57. Razão do volume do hipocampo contralateral e ipsilateral à lesão. (C) Imagens representativas dos encéfalos corados com HE dos diferentes grupos. Dados expressos em média \pm erro padrão. $n=6$ por grupo. ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p<0,05$. *Diferença para o grupo Sham. # Diferença significativa quando comparado com o grupo HIS.

4.2.2 Ácido arúndico injetado pré e pós hipóxia não demonstrou efeitos significativos sobre o comportamento dos animais.

Na memória de referência, a anova de medidas repetidas mostrou que tanto o grupo lesão tratado quanto o grupo lesão, não tratado, apresentaram um aumento na curva de aprendizado em relação ao grupo controle (n=12-16 por grupo) (Figura 11A).

Na análise da memória de trabalho, os grupos HIS e AA10 diferiram significativamente do grupo Sham na relação ao delta (Tempo Trial 1-Tempo Trial 2) (Figura 11B).

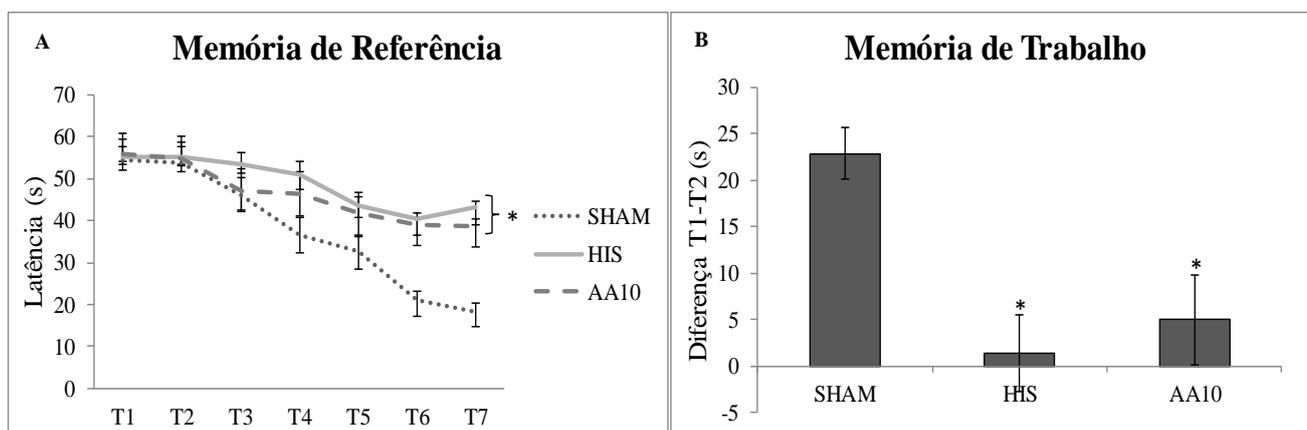


Figura 11. Water maze II. **(A)** Memória de referência. Curva de aprendizado. Os animais realizaram 4 trials por dia durante 7 dias consecutivos aonde o grupo Sham apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos. **(B)** Memória de trabalho. Diferença entre o 2º e o 1º trial - os grupos HIS e AA10 diferiram significativamente do grupo Sham. Dados expressos em média \pm erro padrão. n=12-16 por grupo. ANOVA de medidas repetidas $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida por Duncan. $p < 0,05$. *Diferença para o grupo Sham. Significância aceita quando $p < 0,05$.

4.3 Terceiro Experimento

4.3.1 O ácido arúndico foi capaz de reduzir os níveis de S100b no líquor

A expressão de S100b foi medida por meio da técnica de ELISA 48 após a HI. Essa proteína, expressa por astrócitos, pode ser liberada no meio extracelular e servir para a sinalização parácrina. O nível de S100b circulante no líquor dos animais que sofreram a lesão e dos animais lesionados submetidos à administração de ácido arúndico, não

diferiram significativamente dos grupos controles, Naïve e Sham porém, pode-se observar uma maior redução no nível de S100b no grupo tratado (n=4-9 por grupo) (Figura 12).

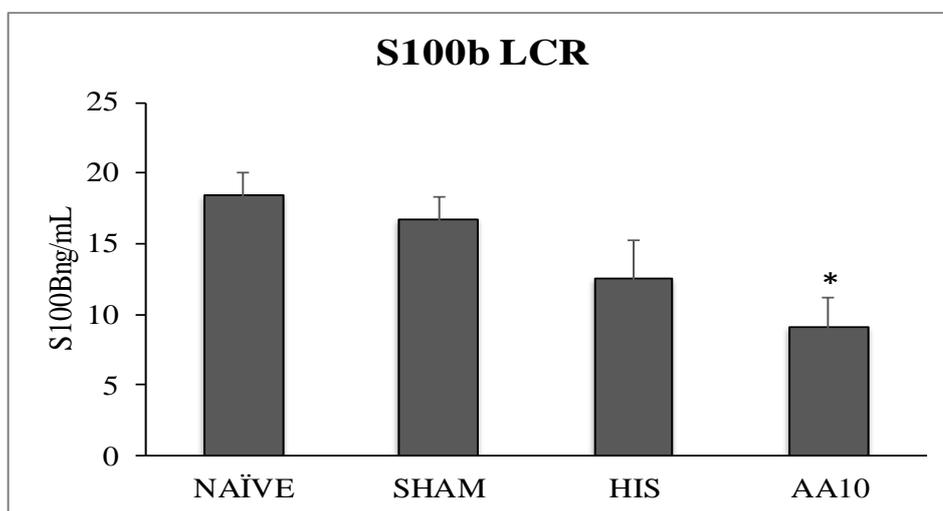


Figura 12. Expressão S100b no líquido. Expressão de S100b circulante no líquido nos animais dos diferentes grupos experimentais. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão. n=4-9 por grupo. *Diferença significativa quando comparado com os grupos controles. Significância aceita quando $p < 0,05$.

O nível tecidual de S100b foi medido no hipocampo por ELISA. Os animais lesionados (HIS) mantiveram os níveis normais quando comparados com os grupos controles Naïve e Sham e, os animais lesionados que receberam a administração de ONO-2506, demonstraram um aumento nos níveis de S100b no hipocampo ipsilateral à lesão quando comparado com os grupos controles ($F(3,23) = 3,6$; $p < 0,05$) (Figura 13A). Para confirmar se de fato houve um aumento real da expressão de S100b no hipocampo dos animais, realizou-se a análise do hipocampo contralateral e, posteriormente, a razão entre o hipocampo lesionado (ipsilateral à lesão) e o hipocampo contralateral à lesão. Os animais que foram submetidos à HIS e à administração do ácido arúndico demonstraram uma redução na expressão de S100b hipocampal quando comparados aos animais lesionados, ($t = 2,1$; $p < 0,05$) (n=4-9 por grupo) (figura 13B).

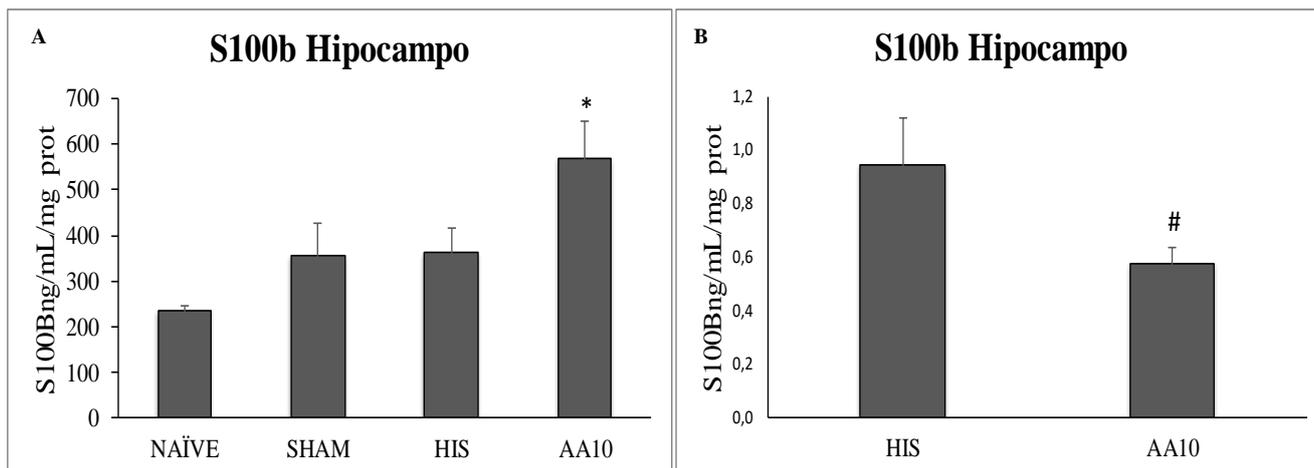


Figura 13. Expressão S100b hipocampo. **(A)** Expressão de S100b no hipocampo ipsilateral à lesão nos animais dos diferentes grupos experimentais. **(B)** Razão entre expressão de S100b no hipocampo ipsilateral e contralateral à lesão nos animais HIS e AA10. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão. $n=4-9$ por grupo. * ANOVA: Diferença significativa quando comparado com os grupos controles. # Teste-t: Diferença significativa quando comparado com o grupo HIS. Significância aceita quando $p<0,05$.

4.3.2 O ácido arúndico promoveu um aumento da expressão de GFAP hipocampal.no grupo tratado

Os animais lesionados (HIS) e os tratados (AA10) tiveram um aumento na expressão de GFAP no hipocampo ipsilateral à lesão, quando comparados com os grupos controles Naive e Sham. Além da diferença quando comparados aos grupos controle, os animais submetidos à administração de ácido arúndico demonstraram ser diferentes estatisticamente do grupo lesão não tratado (HIS) ($F(3,30) = 11,8$; $p<0,05$) ($n=7-11$ por grupo) (Figura 14A). A análise da razão entre os hemisférios ipsi e contralateral à lesão mostrou uma redução na expressão de GFAP no grupo tratado em relação ao grupo lesão não-tratado, porém esta redução não foi estatisticamente significativa (Figura 14B).

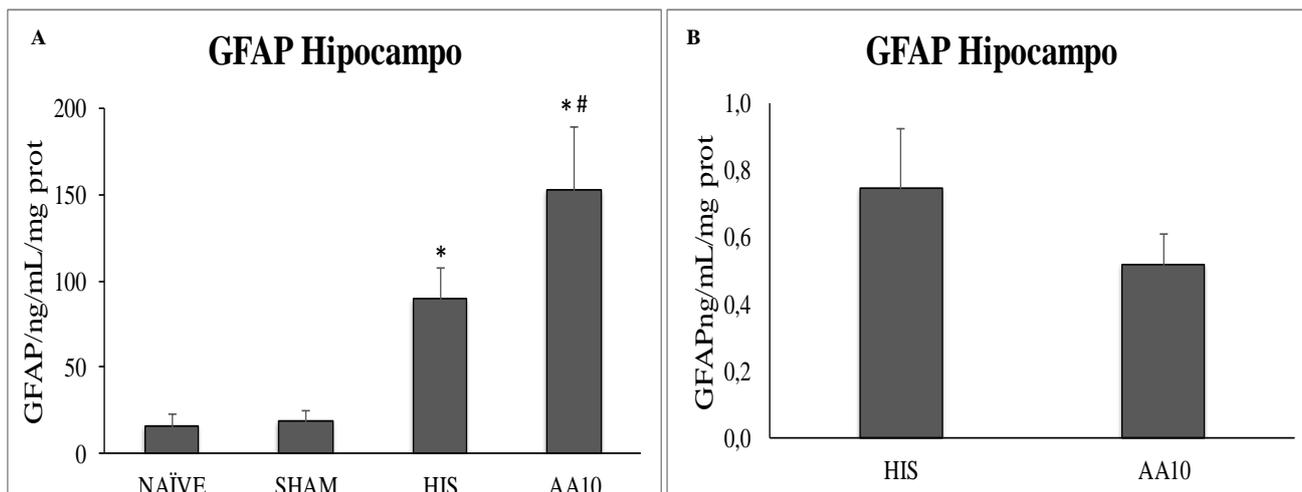


Figura 14. Expressão de GFAP no hipocampo. **(A)** Expressão de GFAP no hipocampo ipsilateral à lesão nos animais dos diferentes grupos experimentais. **(B)** Razão entre a expressão de GFAP no hipocampo ipsi e contralateral à lesão entre os grupos lesão e tratado. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão. $n=7-11$ por grupo * Diferença significativa quando comparado com os grupos controles. # Diferença significativa quando comparado com o grupo HIS. Significância aceita quando $p<0,05$.

4.3.3 O ácido arúndico manteve os níveis dos transportadores GLT-1 e GLAST normais na análise da razão entre o hipocampo ipsi e contralateral.

Na análise do hemisfério ipsilateral à lesão foi observada a manutenção da expressão do receptor GLT-1 pelos grupos lesão não-tratado, Sham e Naïve. No grupo tratado (AA10) foi observado uma redução dos níveis de GLT-1 em comparação com o grupo HIS ($F(3,14) = 3,3$; $p<0,05$) (Figura 15A). Contudo, na realização da razão entre o hemisfério ipsi e contralateral à lesão, a expressão do transportador GLT-1 se mostrou reduzida no grupo HIS em relação ao grupo AA10 (Figura 15B). O mesmo ocorreu com o transportador GLAST, em que os animais submetidos ao tratamento demonstraram uma redução na sua expressão em comparação ao grupo lesão não tratado. O grupo HIS manteve seus níveis normais, comparável aos grupos controles Naïve e Sham (Figura 15C). Todavia, quando a análise da razão entre o hipocampo ipsi e contralateral é realizada, essa diferença estatística entre o grupo tratado e o não-tratado desaparece ($n=4-5$ por grupo) (Figura 15D).

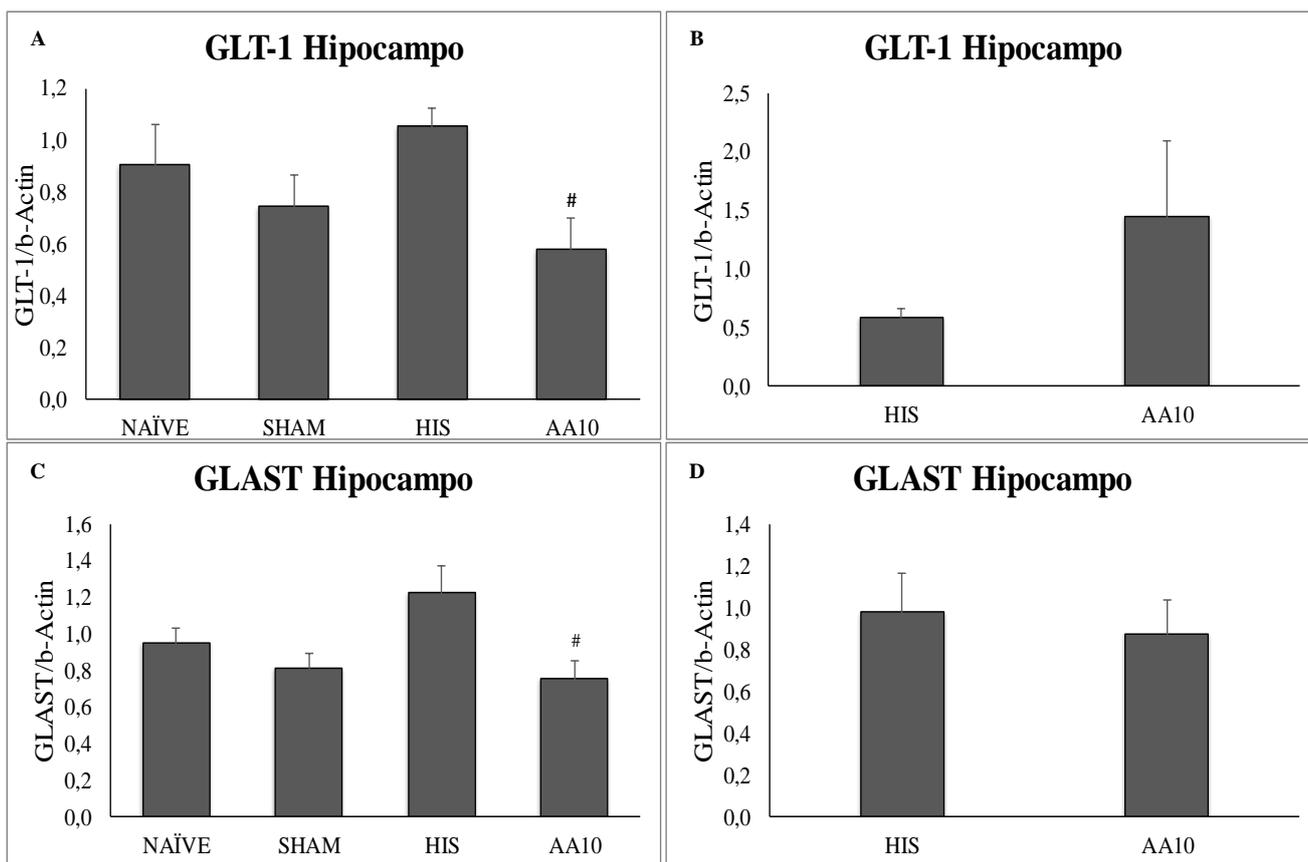


Figura 15. Expressão de GLT-1 e GLAST no hipocampo. **(A)** Expressão de GLT-1 no hipocampo ipsilateral à lesão nos animais dos diferentes grupos experimentais. **(B)** Razão entre a expressão de GLT-1 no hipocampo ipsi e contralateral à lesão entre os grupos lesão e tratado. **(C)** Expressão de GLAST no hipocampo ipsilateral à lesão dos diferentes grupos experimentais. **(D)** Razão entre a expressão de GLAST no hipocampo ipsi e contralateral à lesão entre os grupos lesão e tratado. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão. $n=4-5$ animais por grupo. # Diferença significativa quando comparado com o grupo HIS. Significância aceita quando $p < 0,05$.

Sabe-se que em resposta à uma lesão há a liberação de glutamato extracelular e esse quando captado pelos astrócitos pode ser transformado em glutatona pela enzima glutamina sintetase (GS). Por essa razão, foi realizada a quantificação da GS no hipocampo. Não houve diferenças significativas na análise dos hemisférios ipsilaterais à lesão entre os grupos HI, AA, Naïve e Sham ($F(3,24) = 0,5$; $p=0,67$) (Figura 16A). Além disso, não houve diferença na razão entre os hemisférios (ipsi e contralateral) nos grupos HIS e AA10 ($n=4-9$ por grupo) (Figura 16B).

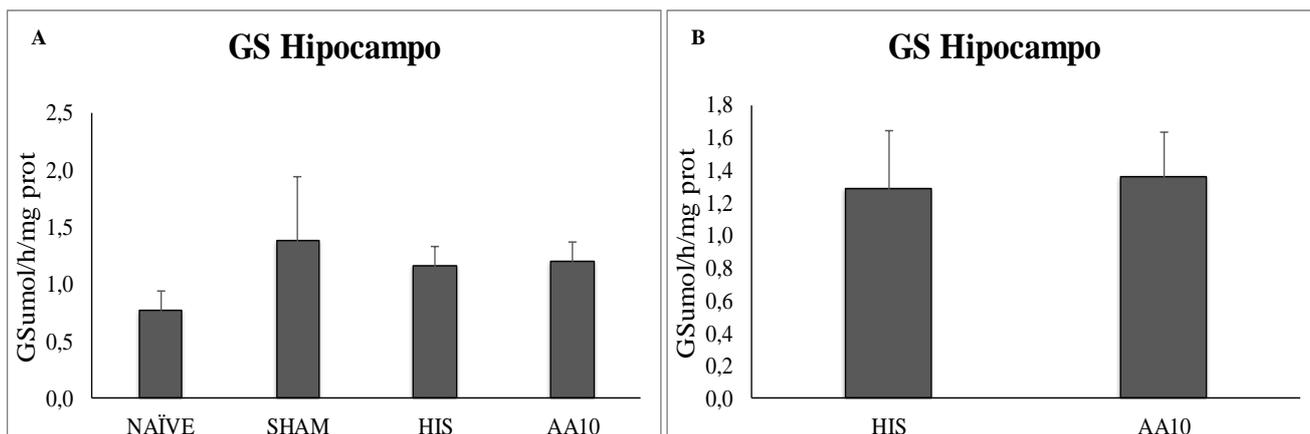


Figura 16. Expressão de GS no hipocampo. **(A)** Atividade da de GS no hipocampo dos animais dos diferentes grupos experimentais 48h após a HI neonatal. **(B)** Razão entre a atividade da GS no hipocampo ipsi e contralateral à lesão entre os grupos lesão e tratados. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão. $n=4-9$ animais por grupo. Significância aceita quando $p<0,05$.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou os efeitos da administração de ácido arúndico pré e pós-hipóxia no modelo experimental de HI neonatal. Como o esperado, a HI promoveu uma lesão principalmente no hipocampo ipsilateral à oclusão da carótida e os efeitos protetores da administração de ONO-2506 pré e pós-hipóxia foram observados após a HI. A partir disso, buscamos identificar possíveis mecanismos bioquímicos envolvidos na neuroproteção induzida pela droga, investigando os níveis de S100b, GFAP, expressão de transportadores de glutamato e atividade das enzimas GS 48 horas após a lesão (Liu & Zhang, 2014). Por fim, o ácido arúndico se mostrou capaz de reduzir a lesão tecidual hipocampal, reduzindo os níveis de S100b no líquido e promovendo uma maior expressão de marcadores astrocitários (GFAP). De forma inesperada, a redução da lesão tecidual não se traduziu em melhora no desempenho cognitivo dos animais na tarefa de memória espacial no water maze.

No primeiro experimento, os testes comportamentais demonstraram que o ácido arúndico, apesar de apresentar uma tendência de reverter o dano tecidual quando administrado na dose de 10mg/kg, não foi capaz de reverter os déficits neurológicos dos grupos tratados independentemente da dose utilizada. De maneira contrária, um estudo utilizando o modelo transitório de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) em adultos, a administração dose dependente de ácido arúndico 6h após a lesão foi capaz de reduzir os déficits neurológicos. A dose mínima efetiva foi de 3 mg/kg administrado por injeção intravenosa em bólus. Esses resultados corroboram com o efeito dose dependente do ONO-2506, porém a falta de dados utilizando o tratamento pré-hipóxia limita sua análise, uma vez que, sua ineficácia pode ser atribuída tanto à aplicação única da droga quanto à sua impossibilidade de ação no período pré-hipóxia. Um outro fator que deve ser

considerado, é o estágio de desenvolvimento do SNC dos ratos utilizados em nosso estudo. Aos sete dias de vida, os diferentes tipos celulares (dentre eles os astrócitos) ainda não estão completamente desenvolvidos, o que poderia explicar a ausência de efeito da droga uma vez que atua sobre as células gliais.

A análise histológica realizada ao final do primeiro experimento (DPN52), quando a lesão encefálica já está consolidada (VOLPE, 2009), comprovou que a HI causa um dano unilateral, principalmente no hipocampo ipsilateral à carótida ocluída, o que já é bem descrito na literatura (ARTENI et al., 2003; PEREIRA et al., 2007; SANCHES et al., 2015). Na análise do volume dos hemisférios e do córtex cerebral, os grupos tratados não diferiram significativamente do grupo lesão, mostrando que o tratamento pré-hipóxia não teve efeito sobre essa estrutura. Na avaliação do volume hipocampal, observamos que o grupo tratado na dose de 10mg/kg (AA10), apesar de não apresentar diferença estatística, demonstrou uma tendência de melhora em relação ao grupo lesão, porém o grau de variabilidade intrínseco do modelo não nos permite afirmar de modo conclusivo o efeito neuroprotetor.

No segundo experimento, foram realizadas aplicações de ONO-2506 pré e pós-hipóxia na dose de 10mg/kg, totalizando três aplicações. Contrário à nossa hipótese, os testes comportamentais realizados na idade adulta demonstraram que o grupo HI tratado não apresentou melhora na curva de aprendizagem quando comparado ao grupo controle, tanto na avaliação da memória de referência (Figura 11A), quanto na memória de trabalho (Figura 11B), evidenciando que o ácido arúndico não foi capaz de reverter os déficits cognitivos causados pela HI.

A análise histológica realizada no DPN 57 demonstrou o efeito da lesão HI sobre o volume dos hemisférios (ipsi e contralaterais), uma vez que, o grupo lesão não-tratado apresentou uma piora significativa quando comparado ao grupo controle. O grupo tratado

foi capaz de reduzir a lesão, aumentando o volume dos hemisférios em relação ao sham, mostrando a ação do ONO-2506 sobre essa estrutura. O volume cortical não se alterou após a lesão, quando analisados os lados ipsi e contralateral, separadamente; contudo, na relação ipsi/contralateral, houve uma redução do volume cortical no grupo HIS em relação ao Sham (Figuras 9B e D). Essa diferença não foi observada no grupo tratado, demonstrando um efeito protetor do ONO-2506 nessa estrutura. A análise do volume hipocampal foi a única em que o tratamento foi eficaz em reduzir o volume de lesão tecidual (Figuras 10 A e B). Uma interessante observação é que diferentes estruturas apresentam diferente susceptibilidade ao dano após a HI, sendo uma delas, o hipocampo, mais atingido devido à sua alta taxa metabólica (VOLPE, 2009). A proteção conferida pelo ONO-2506 sobre essa estrutura (mesmo que falhando na melhora comportamental) demonstra que a droga parece atuar em regiões sensíveis à lesão, o que deve ser melhor explorado em futuros estudos.

Como demonstrado na Figura 2 acredita-se que o ácido arúndico suprima o ciclo das citocinas através da inibição da síntese de S100b (WAJIMA et al., 2013). Em baixas concentrações a S100b foi capaz de proteger neurônios em cultura dos danos excitotóxicos induzidos pelo glutamato e em altas concentrações, em cultura de astrócitos, ela aumenta a expressão de NOS; conseqüentemente, a produção de NO causa a morte da astroglia e de neurônios (OHTANI et al., 2007). A superexpressão de S100b também demonstrou ser capaz de alterar a plasticidade sináptica e prejudicar a aprendizagem espacial em camundongos transgênicos (ASANO et al., 2005).

Uma das principais respostas bioquímicas da glia à lesão encefálica é o aumento da expressão de S100b, refletida tanto nas elevações dos seus níveis no soro quanto no líquido cefalorraquidiano e no tecido (WAINWRIGHT et al., 2004), sugerindo que a ativação astrocítica, particularmente a síntese aumentada de S100b, desempenha um

papel fundamental na ocorrência da expansão tardia do infarto e na supressão prolongada de funções neuronais na área peri-infarto após a MCAO (OHTANI et al., 2007; TATEISHI et al., 2002). No presente trabalho houve uma redução significativa de S100b no líquido, 48 horas após a lesão, nos animais tratados com ONO-2506 quando comparados com o grupo Sham (Figura 13), corroborando com os achados nos modelos de oclusão permanente da artéria cerebral média, em que na dose de 10mg/kg o ácido arúndico inibiu significativamente o aumento da concentração de S100b no líquido 24 horas após a reperusão (ASANO et al., 2005). De maneira interessante, o mesmo padrão não se aplicou no hipocampo ipsilateral, uma vez que, o grupo tratado apresentou níveis elevados de S100b em relação aos demais grupos. No entanto, quando analisada a razão entre o hipocampo ipsi e contralateral à lesão, o grupo tratado apresentou uma redução significativa nos níveis de S100b em relação ao grupo lesão não-tratado, demonstrando que o ONO-2506 induziu uma melhor resposta hipocampal. Corroborando com os nossos achados, Asano et al. (2005) mostrou que no modelo de oclusão permanente de MCAO, utilizando-se de uma dose de 10mg/kg de ácido arúndico, a droga foi capaz de reduzir os níveis teciduais de S100b na área peri infarto.

A GFAP, proteína expressa pelos astrócitos, possui papel estrutural, compõe o citoesqueleto celular e está aumentada sempre que o tecido responde à uma lesão, sinalizando um aumento no número de células astrocíticas ou o aumento na trofia celular (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). A expressão de GFAP, assim como a de S100b, tende ao aumento após uma lesão isquêmica, contudo o perfil temporal pós-infarto entre elas difere. Enquanto a expressão de S100b está aumentada na fase tardia do infarto, a expressão de GFAP demonstra estar mais elevada logo após o insulto (HERRMANN et al., 2000). O ácido arúndico foi capaz de inibir a expressão de RNAm de S100b, porém não foi capaz de reduzir a expressão de GFAP em cultura de astrócitos (ASANO et al.,

2005; HIMEDA et al., 2006; TATEISHI et al., 2002). No presente trabalho foi observado um aumento da expressão de GFAP no grupo tratado quando comparado ao grupo lesão e o sham (Figura 14). Visto que o tratamento com ONO-2506 induziu preservação hipocampal (observada no experimento 2), esse pode ser reflexo no aumento da sobrevivência de astrócitos em função do tratamento. Um maior número de células astrocíticas poderia explicar o aumento da expressão de GFAP do grupo AA10 em relação ao grupo HI e ter sido causa da neuroproteção hipocampal observada. Essa maior sobrevivência astrocitária também pode estar envolvida com a manutenção dos níveis dos transportadores de glutamato (GLAST e GLT-1) no grupo AA, uma vez que, esse grupo não apresenta diferenças em relação ao grupo controle, somente uma redução da expressão em relação ao grupo HIS (Figura 15). Esses resultados sugerem que o pré-tratamento com ONO-2506 pode estar reduzindo a liberação de glutamato, o que reduz a necessidade do aumento na expressão desses transportadores.

Juntamente com o evento hipóxico-isquêmico ocorre a redução dos estoques de energia celular, seguido da despolarização de neurônios e glia e da liberação de glutamato no espaço extracelular (VANNUCCI, 2004). O glutamato é mantido em baixos níveis pelos transportadores astrocíticos GLT-1 e GLAST (MATSUGAMI et al., 2006). Contudo, após a lesão causada pela HI ocorre uma notável diminuição na expressão de RNAm desses transportadores. Essa diminuição resulta em um aumento nos níveis de glutamato extracelular na área peri-infarto após a MCAO (ASANO et al., 2005). O aumento do glutamato extracelular, se não combatido, acarreta efeitos prejudiciais na transmissão sináptica e na sobrevivência das células neurais (ASANO et al., 2005; CHOI, 1988; MORI et al., 2004). Segundo Asano et. al, (2005) o ácido arúndico é responsável pelo aumento da expressão dos transportadores de glutamato e conseqüentemente pelo aumento da captação de glutamato extracelular e outros aminoácidos necessário para a

síntese de glutatona. Assim, considera-se que a manutenção dos transportadores GLT-1 e GLAST desempenha um papel importante na prevenção do dano secundário causado pela HI e que o envolvimento parcial de outros mecanismos não pode ser excluído (MORI et al., 2004).

Uma vez captado da fenda sináptica, o glutamato é metabolizado pela enzima glutamina sintetase em glutatona e esta retorna ao neurônio, onde pode ser reconvertida em glutamato (XIN; WENG; DOUGHERTY, 2009). Sugere-se que a manutenção dos níveis de GS pelo grupo tratado seja pelo efeito cascata causado pela maior sobrevivência astrocitária, seguido pela diminuição de glutamato extracelular e manutenção dos níveis de GLAST e GLT-1. Contrário ao esperado, não observamos alterações na atividade da GS hipocampal nos grupos lesão (tratado ou não). O aumento pós-isquêmico na atividade da GS no astrócito sugere que a capacidade de absorver o glutamato e convertê-lo em glutamina é aumentada após a isquemia (VERMA et al., 2010).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que o tratamento com ácido arúndico:

- 1) É efetivo na dose de 10 mg/kg aplicado pré e pós-hipóxia, visto que esse protocolo de administração foi o único capaz de reduzir a lesão tecidual causada pela HI no hipocampo ipsilesional;
- 2) Foi capaz de promover a sobrevivência astrocitária no hipocampo e reduzir a liberação extracelular de S100b no líquido;
- 3) Promoveu a manutenção da expressão dos níveis dos transportadores de glutamato (GLT-1 e GLAST) e da atividade da GS;
- 4) No regime de dose utilizado, não foi capaz de melhorar os déficits cognitivos induzidos pela HI.

O presente estudo nos permite traçar futuras perspectivas, tais como:

- 1) Investigar, por imunofluorescência em tecido encefálico, se as células remanescentes nos locais de lesão (hipocampo e córtex) permanecem funcionais.
- 2) Testar um protocolo de administração alternativo e com uma dose mais efetiva do ácido arúndico no intuito de reverter o déficit cognitivo devido à hipóxia-isquemia neonatal.

7. BIBLIOGRAFIA

ALMLI, C.R. et al. BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 166, n. 1, p. 99–114, 2000.

ARTENI, N. S. et al. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 210, n. 1, p. 92–98, 2010.

ARTENI, N. et al. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. **Brain Research**, [s. l.], v. 973, n. 2, p. 171–178, 2003.

ASANO, T. et al. Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B. **Current drug targets. CNS and neurological disorders**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 127–42, 2005.

BERGER, R.; GARNIER, Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. **Brain Research Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 107–134, 1999.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, [s. l.], v. 1, p. 623–634, 1988.

CUI, W. et al. Inhibition of the activation of hepatic stellate cells by arundic acid via the induction of cytoglobin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 425, n. 3, p. 642–648, 2012.

DAVIDSON, J. et al. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy - Where to from here? **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 6, n. SEP, 2015.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. a. Pathobiology of ischaemic

stroke: an integrated view. 4441. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 391–397, 1999.

DONATO, R. et al. Functions of S100 Proteins. **Current Molecular Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 24–57, 2013.

DONATO, R. et al. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1793, n. 6, p. 1008–1022, 2009.

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 179–197, 2007.

ERECIŃSKA, M.; SILVER, I. Ions and energy in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 37–71, 1994.

GONÇALVES, C; LEITE, M.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 10–11, p. 755–763, 2008.

GRIFFITH, O. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 9–10, p. 922–935, 1999.

HAGBERG, H. et al. Apoptotic Mechanisms in the Immature Brain: Involvement of Mitochondria. **Journal**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 1141–1146, 2009.

HAGBERG, H. et al. The role of inflammation in perinatal brain injury Henrik. **Nature Review Neurology**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 192–208, 2015.

HANADA, M. et al. Arundic acid (ONO-2506) inhibits secondary injury and improves motor function in rats with spinal cord injury. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 337, n. 1–2, p. 186–192, 2014.

HASSELL, K. et al. New horizons for newborn brain protection: Enhancing endogenous

neuroprotection. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, [s. l.], v. 100, n. 6, p. F541–F551, 2015.

HERRMANN, M. et al. Release of Glial Tissue – Specific Proteins After Acute Stroke. **Stroke**, [s. l.], v. 31, p. 2670–2677, 2000.

HIGASHINO, H. et al. Immunohistochemical analysis of brain lesions using S100B and glial fibrillary acidic protein antibodies in arundic acid- (ONO-2506) treated stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 116, n. 10, p. 1209–1219, 2009.

HIMEDA, T. et al. Neuroprotective effect of arundic acid, an astrocyte-modulating agent, in mouse brain against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 329–344, 2006.

HUANG, Z. et al. Long-term cognitive impairment and myelination deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. **Brain Research**, [s. l.], v. 1301, p. 100–109, 2009.

ISHIBASHI, H. et al. Pharmacokinetics of arundic acid, an astrocyte modulating agent, in acute ischemic stroke. **Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 445–452, 2007.

IWATA, O. et al. “Therapeutic time window” duration decreases with increasing severity of cerebral hypoxia-ischaemia under normothermia and delayed hypothermia in newborn piglets. **Brain Research**, [s. l.], v. 1154, n. 1, p. 173–180, 2007.

JOHNSTON, M. et al. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. **Pediatric research**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 735–41, 2001.

LAKHAN, S.E.; KIRCHGESSNER, A; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: Therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 7, p. 1–11, 2009.

LEITE, M. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 169, n. 1, p. 93–99, 2008.

LIU, W.; ZHANG, Y. in Neuronal Apoptosis in Neonatal Rat With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. [s. l.], p. 905–909, 2014.

LOREK, A. et al. Delayed ('secondary') cerebral energy failure following acute hypoxia-ischaemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 699–706, 1994.

MARTIN, H.L.; TEISMANN, P. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 3263–3272, 2009.

MATSUGAMI, T.R. et al. Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 103, n. 32, p. 12161–12166, 2006.

MATSUI, T. et al. Astrocytic Activation and Delayed Infarct Expansion After Permanent Focal Ischemia in Rats. Part I: Enhanced Astrocytic Synthesis of S-100 β in the Periinfarct Area Precedes Delayed Infarct Expansion. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 711–722, 2002.

MCQUILLEN, P. et al. Selective vulnerability of subplate neurons after early neonatal hypoxia-ischemia. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 3308–3315, 2003.

MIYAMOTO, Y. et al. Improvement of some physicochemical properties of arundic acid, (R)-(-)-2-propyloctanonic acid, by complexation with hydrophilic cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 413, n. 1–2, p. 63–72, 2011.

MORI, T. et al. Attenuation of a delayed increase in the extracellular glutamate level in

the peri-infarct area following focal cerebral ischemia by a novel agent ONO-2506. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 45, n. 2–3, p. 381–387, 2004.

MORI, T. et al. Arundic Acid ameliorates cerebral amyloidosis and gliosis in Alzheimer transgenic mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [s. l.], v. 318, n. 2, p. 571–578, 2006.

OHTANI, R. et al. Expression of S100 protein and protective effect of arundic acid on the rat brain in chronic cerebral hypoperfusion. **Brain Research**, [s. l.], v. 1135, n. 1, p. 195–200, 2007.

OKI, C. et al. Delayed treatment with arundic acid reduces the MPTP-induced neurotoxicity in mice. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 417–430, 2008.

PEREIRA, L. et al. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 101–108, 2007.

PERLMAN, J. Intrapartum Hypoxic-Ischemic Cerebral Injury and Subsequent Cerebral Palsy : Medicolegal Issues. [s. l.], v. 99, n. 6, 1997.

PETTIGREW, L. et al. Effect of arundic acid on serum S-100 β in ischemic stroke. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 251, n. 1–2, p. 57–61, 2006.

RICE R.D. et al. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Ann Neurol**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 131–141, 1981.

ROTHERMUNDT, M. et al. S100B in brain damage and neurodegeneration. **Microscopy research and technique**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 614–632, 2003.

RUMAJOGEE, P. et al. Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: A systematic review. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 7, n. APR, 2016.

SANCHES, E. F. et al. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent

cognitive impairment and histological damage. **Neuroscience**, [s. l.], v. 237, p. 208–215, 2013.

SANCHES, E. F. et al. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats. **Neuroscience**, [s. l.], v. 290, p. 581–593, 2015.

SANCHES, E. et al. Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. **Brain Research**, [s. l.], v. 1438, p. 85–92, 2012.

SOFRONIEW, Michael V.; VINTERS, Harry V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.

SORCI, G. et al. The danger signal S100B integrates pathogen- and danger-sensing pathways to restrain inflammation. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2011.

SUN, Y. et al. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. **Stroke**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 1672–1678, 2005.

TATEISHI, N. et al. Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part II: suppression of astrocytic activation by a novel agent (R)-(-)-2-propyloctanoic acid (ONO-2506) leads to mitigation of delayed infarct expansion and early . **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 723–734, 2002.

TICHAUER, J. et al. Modulation by astrocytes of microglial cell-mediated neuroinflammation: Effect on the activation of microglial signaling pathways. **NeuroImmunoModulation**, [s. l.], v. 14, n. 3–4, p. 168–174, 2007.

TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **J Neurosci Methods**, [s. l.], v. 162,

n. 1–2, p. 282–286, 2007.

VANNUCCI, S.J. Hypoxia-ischemia in the immature brain. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 207, n. 18, p. 3149–3154, 2004.

VERMA, R. et al. Pharmacological evaluation of glutamate transporter 1 (GLT-1) mediated neuroprotection following cerebral ischemia/reperfusion injury. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 638, n. 1–3, p. 65–71, 2010.

VIZUETE, A. et al. Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats. **Life Sciences**, [s. l.], v. 92, n. 17–19, p. 923–928, 2013.

VOLPE, J.J. **Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances** *The Lancet Neurology*, 2009.

WAINWRIGHT, M. et al. Increased susceptibility of S100B transgenic mice to perinatal hypoxia-ischemia. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 61–67, 2004.

WAJIMA, D. et al. Neuroprotective effect of suppression of astrocytic activation by arundic acid on brain injuries in rats with acute subdural hematomas. **Brain Research**, [s. l.], v. 1519, p. 127–135, 2013.

WANG, L. et al. Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury in neonatal rats after hypoxia-ischemia. **Brain Research**, [s. l.], v. 949, n. 1–2, p. 162–170, 2002.

XIN, W. et al. Plasticity in Expression of the Glutamate Transporters GLT-1 and GLAST in Spinal Dorsal Horn Glial Cells following Partial Sciatic Nerve Ligation. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 5, p. 1744-8069-5–15, 2009.

YANG, K. et al. The effects of gender and numbers of depressive episodes on serum S100B levels in patients with major depression. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 115, n. 12, p. 1687–1694, 2008.

YIN, W. et al. Preconditioning suppresses inflammation in neonatal hypoxic ischemia via Akt activation. **Stroke**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 1017–1024, 2007.

ZHAO, J. et al. Effect of intrauterine infection on brain development and injury. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 543–549, 2013.