



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

Efeitos do Enriquecimento Ambiental em Ratos Jovens

Submetidos à Hipóxia-Isquemia Encefálica Neonatal

Ramiro Diaz

Porto Alegre

2012

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

Efeitos do Enriquecimento Ambiental em Ratos Jovens
Submetidos à Hipóxia-Isquemia Encefálica Neonatal

Ramiro Diaz

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lenir Orlandi Pereira Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Porto Alegre

2012

Olha a luz que brilha de manhã
Saiba quanto tempo estive aqui
Esperando pra te ver sorrir
Pra poder seguir

Lembre que hoje vai ter pôr do Sol
Esqueça o que falei sobre sair
Corra muito além da escuridão
E corra, corra!

Não desista de quem desistiu
Do amor que move tudo aqui
Jogue bola, cante uma canção
Aperte a minha mão

Quebre o pé, descubra um ideal
Saiba que é preciso amar você
Não esqueça que estarei aqui
E corra, corra!

Azul, vermelho
Pelo espelho
A vida vai passar
E o tempo está no pensamento

(O Amanhã Colorido por Pouca Vogal)

AGRADECIMENTOS

À professora Lenir, por me abrir as portas da UFRGS, por me ORIENTAR em todos os passos do mestrado, pela paciência, pelo incentivo.

Ao professor Carlos Alexandre, por compartilhar um pouco da sua sabedoria.

Às colegas de laboratório Brubru, Clacla, Jaque, Jose, Lu e Patixa por me auxiliarem de forma incansável, pelo carinho e pelos tantos momentos de alegria, tenho certeza, que sem vocês o caminho até aqui seria muito mais difícil.

Aos meus professores da graduação em especial à Carla Brito, Luis Fernando Alvarenga, Janice Lukrafka, Alexandre Simões, Mariane Monteiro pelo exemplo, pela dedicação, pelos educadores que são.

Ao centro de microscopia eletrônica da UFRGS em especial à professora Maria Cristina Faccioni Heuser e ao Henrique Biehl, pelo auxílio e atenção.

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

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

Às colegas da Santa Casa, Daiane Scortegagna e especialmente Aline, Ariane e Riele, pelo incentivo, troca de plantões, cafezinhos, amor e carinho.

Ao Gio e a Celly, que caminharam junto, entenderam a ausência e valorizaram a presença e sempre alegres.

Ao Chico e a Queri, provando que não existe distância, que a presença se sente no coração.

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

À minha irmã Marina, por me contradizer muitas vezes, mas também por inúmeras vezes me dizer por onde ir, por ser a ligação entre o que fui e o que posso ser.

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

Aos meus afilhados Gui, Manu, Luisa, Pietra, Anita, Luciane vocês são a energia que me move, são a alegria, o carinho, o amor que carrego.

À minha Mãe, pelo exemplo de dedicação e retidão, pelo incentivo e encorajamento nos estudos, pela presença mesmo na ausência, em todos os momentos eu te sinto comigo. Te Amo

À minha Vó, pelos maiores e melhores ensinamentos, pelo exemplo, pela simplicidade, pelo amor que fornece, por ser única. Te Amo!

À minha amiga, namorada, noiva, esposa Rosi, são tantas qualidades que a ti pertencem, se hoje estou aqui é porque sempre te tive ao lado, teu incentivo, teu carinho, teu amor, tua compreensão, teu sorriso, teu choro me fazem querer ir além. Contigo do lado, tudo se torna mais fácil, mais possível, teu companheirismo foi essencial nesta conquista, tua intensidade fez eu não duvidar que conseguiria. Te Amo infinitamente!

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1.INTRODUÇÃO.....	12
2.OBJETIVOS	26
2.1 GERAL	27
2.1.1.....	27
2.2 ESPECÍFICOS.....	27
2.2.1	27
2.2.2.....	27
2.2.3	27
3.MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 ANIMAIS	29
3.2 HIPÓXIA-ISQUEMIA	29
3.3 AMBIENTE ENRIQUECIDO.....	30
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	31
3.4.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	31
3.4.2 CINEMETRIA	32
3.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	32
3.6 DESENHO EXPERIMENTAL	36
4. RESULTADOS.....	37
5.DISSCUSSÃO	47
6.CONCLUSÕES.....	56
7.PERSPECTIVAS	58
8.BIBLIOGRAFIA	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sinapse Glutamatérgica	11
Figura 2: Diagrama ilustrando de lesão de hipóxia-isquemia	12
Figura 3: Hipóxia e isquemia	16
Figura 4: Esquema efeitos do ambiente enriquecido	21
Figura 5: Gráfico de número de entradas em braços abertos	37
Figura 6: Gráfico do tempo de permanência em braços abertos	38
Figura 7: Gráfico dos comportamentos no LCE	39
Figura 8: Gráfico da caminhada sobre a plataforma	39
Figura 9: Gráfico da densidade de astrócitos GFAP+	41
Figura 10: Gráfico do % de área ocupada por astrócitos GFAP+	42
Figura 11: Densidade de astrócitos GFAP+ marcados por imunofluorescência	43

LISTA DE ABREVIATURAS

NMDA (N.metil-D-aspartato)

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

IL (interleucina)

HI (hipóxia-isquemia)

SNC (sistema nervoso central)

SNP (sistema nervoso periférico)

GFAP (proteína fibrilar glial ácida)

RN (recém-nascido)

AE (ambiente enriquecido)

LCE (labirinto em cruz elevado)

PF (paraformaldeído)

TF (tampão fosfato)

AOI (área óptica de interesse)

ANOVA (análise de variância)

HIAP (hipóxia-isquemia ambiente padrão)

HIAE (hipóxia-isquemia ambiente enriquecido)

CTAP (controle ambiente padrão)

CTAE (controle ambiente enriquecido)

BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo)

GDNF (fator neurotrófico derivado da glia)

RESUMO

A encefalopatia neonatal causada pela hipóxia-isquemia (HI) é uma importante causa de morte tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Diversas estratégias neuroprotetoras vêm sendo desenvolvidas para o tratamento deste tipo de lesão. O ambiente enriquecido (AE) surge como uma destas estratégias, pois se sabe que a interação social, estímulos visuais e sensoriais e atividade física proporcionadas pelo AE induzem mudanças comportamentais e neurofisiológicas. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do AE sobre a ansiedade, memória emocional, locomoção e expressão de proteína fibrilar glial ácida (GFAP) no hipocampo de ratos Wistar jovens submetidos à HI encefálica neonatal. Ratos wistar machos e fêmeas, no 7º dia pós-natal (DPN), foram submetidos ao modelo de Levine-Rice de HI neonatal, no qual a artéria carótida comum esquerda é ocluída permanentemente e, na seqüência, os animais foram mantidos em uma atmosfera hipóxica (90 min, 8%O₂-92%N₂). Os animais foram divididos em quatro grupos: CTAP (controle ambiente padrão), CTAE (controle ambiente enriquecido), HIAP (hipóxia-isquemia ambiente padrão) e HIAE (hipóxia-isquemia ambiente enriquecido). Os animais dos grupos AE permaneceram no enriquecimento ambiental mantido desde o 8º DPN. Após o desmame os animais foram divididos em grupos e estimulados em AE (1h/dia por 2 semanas). Foram avaliados os efeitos da HI e do AE sobre a ansiedade na primeira exposição dos animais ao labirinto em cruz elevado (LCE) e a memória emocional através de duas exposições ao LCE; a locomoção foi avaliada através de filmagem e avaliação cinemétrica da altura e tamanho da passada; e, para análise da morfologia foi realizada a técnica de imunofluorescência para a GFAP na região de CA1 do hipocampo. Não houve alteração no nível de ansiedade dos animais, nem pela HI, nem pelo AE. Na análise do primeiro para o segundo dia de exposição ao LCE todos os animais apresentaram diminuição no número de entradas nos braços abertos (EBA). Ao avaliar a porcentagem de EBA, o grupo HIAP foi o único que não diminuiu este índice entre as exposições. Foi observada uma diminuição do percentual de EBA entre os grupos HIAP e HIAE na segunda exposição; também foi identificada uma diminuição do tempo e porcentagem de tempo em braços abertos do primeiro para o segundo dia para os grupos CTAE e HIAE. Na segunda exposição os animais HIAE quando comparados ao HIAP apresentaram menor de tempo e percentual de permanência nos braços abertos. Houve diminuição do número de entradas nos braços fechados (EBF) do primeiro para o segundo dia em todos os grupos, exceto no grupo HIAP. Em conjunto, esses achados indicam um prejuízo na formação da memória emocional nos animais submetidos à HI, sendo revertido pelo AE. A avaliação da cinemetria, observada através da caminhada em plataforma horizontal, indicou que não houve diferença entre o tamanho e altura das passadas nos quatro grupos estudados. Nas análises morfológicas, não foram encontradas diferenças significativas no hipocampo contralateral à lesão, porém do lado ipsilateral foi revelado um aumento da densidade de astrócitos apenas no grupo HIAP. Na porcentagem de área ocupada por astrócitos GFAP+ há um aumento do percentual em ambos os lados somente no grupo HIAP. Sendo assim, nossos resultados indicam que o enriquecimento ambiental contribui para a recuperação e/ou reversão do déficit da memória emocional em animais

com lesão hipóxico-isquêmica, assim como o AE reverte e/ou previne o aumento da densidade e porcentagem de área ocupada por astrócitos na região CA1 do hipocampo.

ABSTRACT

Encephalopathy caused by neonatal hypoxia-ischemia (HI) is a major cause of death in both developed and developing countries. Several neuroprotective strategies have been developed for the treatment of this type of injury. The enriched environment (AE) emerges as one of these strategies, because we know that social interaction, visual and sensory and physical activities offered by AE induce behavioral and neurophysiological changes. The objective of this study was to investigate the effects of enriched environment on anxiety, emotional memory, motor behavior and expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the hippocampus of young Wistar rats submitted to neonatal HI. Male and female Wistar rats, on the 7th day postnatal (DPN) were subjected to the Levine-Rice HI neonatal, in which the left common carotid artery is permanently occluded and, subsequently, animals were kept in an hypoxic atmosphere (90 min, 8% O₂, 92% N₂). The animals were divided into four groups: CTAP (control environmental standard), CTAE (control enriched environment), HIAP (hypoxia-ischemia environmental standard) and HIAE (hypoxia-ischemia enriched environment). The AE animals groups were maintained in environmental enrichment since the 8th DPN. After weaning, animals were divided into groups and stimulated in another enriched environment (1 h per day, for 2 weeks). The animal's behavior was observed on elevated plus maze (EPM); locomotion was evaluated by the walking behavior and for morphology analysis was performed by immunofluorescence for GFAP in the hippocampal CA1 region. There was no change in anxiety level of the animals, either by HI or by AE. When analyzing the first to the second day of exposure to EPM all animals showed a reduction in the number of entries into open arms (EOA). HIAP was the only group which did not show a reduction in the percentage of OAE in the first EPM exposure. In the second exposure, HIAE group reduced the percentage of EOA, when compared to HIAP. Considering TOA and percentage of TOA, AE groups showed a decrease from the first to the second day. In the second exposure there was a decrease in percentage of TOA and TOA in HIAE group when compared to the HIAP. There was a decrease in the number of closed arm entries (ECA) from first to second day in all groups except the group HIAP. Taking together, these findings indicate impairment in emotional memory in animals subjected to HI, being reversed by AE. The evaluation of the walking behavior showed no difference between the size and height of the steps in the four groups. In morphological analysis, no significant differences were found in the hippocampus contralateral to the lesion, but the ipsilateral side revealed an increased density of astrocytes only in the group HIAP. The percentage of area occupied by GFAP+ astrocytes increased on both sides in the HIAP group. Thus, our results indicate that environmental enrichment contributes to the recovery and / or reversal of the emotional memory deficit in animals with hypoxic-ischemic injury, as well as the enriched environment reverses and / or prevents the increase in density and percentage of area occupied by astrocytes in the hippocampal CA1 region.

1.INTRODUÇÃO

A encefalopatia neonatal causada pela hipóxia-isquemia (HI) é uma importante causa de morte tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Himmelman, Hagberg *et al.*, 2010). Dados da organização mundial da saúde (OMS) relatam que no ano de 1995 cerca de 3% das crianças nascidas no mundo apresentavam asfixia perinatal e em 1% dos casos houve evolução para um quadro clínico com seqüelas graves e permanentes. Dependendo da extensão e localização do insulto os indivíduos acometidos podem desenvolver paresia espástica, distúrbio de coordenação sensório-motora, bem como a lesão pode acarretar retardo mental, epilepsia, transtorno de déficit de atenção/hiperatividade e prejuízos de memória (Rice, Vannucci *et al.*, 1981; Golan e Huleihel, 2006).

A falta de oxigênio no encéfalo ativa uma reação do sistema nervoso simpático-adrenérgico e uma redistribuição do débito cardíaco em favor dos órgãos centrais (cérebro, coração e adrenais). Se o insulto persistir, o indivíduo é incapaz de manter a centralização circulatória e o débito cardíaco, assim a extensão da perfusão cerebral apresenta falha (McDonald, Silverstein *et al.*, 1990; Vannucci e Hagberg, 2004).

Alguns estudos demonstram que o encéfalo imaturo quando comparado a encéfalos adultos demonstram uma maior suscetibilidade ao evento hipóxico-isquêmico (Rice *et al.*, 1981). Esta maior fragilidade do encéfalo imaturo pode ser concedida pelo maior risco de fracasso energético, pela imaturidade da barreira hemato-encefálica e substância branca e elevada suscetibilidade à excitotoxicidade glutamatérgica (McDonald *et al.*, 1990)

A lesão hipóxico-isquêmica no encéfalo acontece devido a uma diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos e pode acontecer de duas formas: hipoxemia (diminuição da quantidade de oxigênio circulante) e isquemia (diminuição da quantidade de sangue que perfunde os tecidos) (Engidawork, Chen *et al.*, 1997), sendo que redução de fluxo sanguíneo é o evento mais relatado (Perlman, 2006). As lesões podem ser encontradas no

hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida nas regiões do córtex cerebral, substância branca periventricular e subcortical, estriado (núcleos da base) e hipocampo (McDonald, Silverstein *et al.*, 1990; Vannucci e Hagberg, 2004). Os insultos hipóxico-isquêmicos desencadeiam a ocorrência de morte neuronal devido à disfunção celular gerada por liberação de aminoácidos excitatórios, falência energética da célula, acúmulo de radicais livres, e inflamação (Ferriero, 2001; Hossain, 2005).

A excitotoxicidade mediada por receptores de glutamato pode ser responsável pela lesão cerebral em recém-nascidos após insulto hipóxico isquêmico. O glutamato (Glu) é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC), ele é liberado através das vesículas pré-sinápticas para a fenda sináptica por exocitose e atua em receptores pós-sinápticos (N-metil-D-aspartato – NMDA; a-amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazolpropionato – AMPA e cainato). (figura 1)

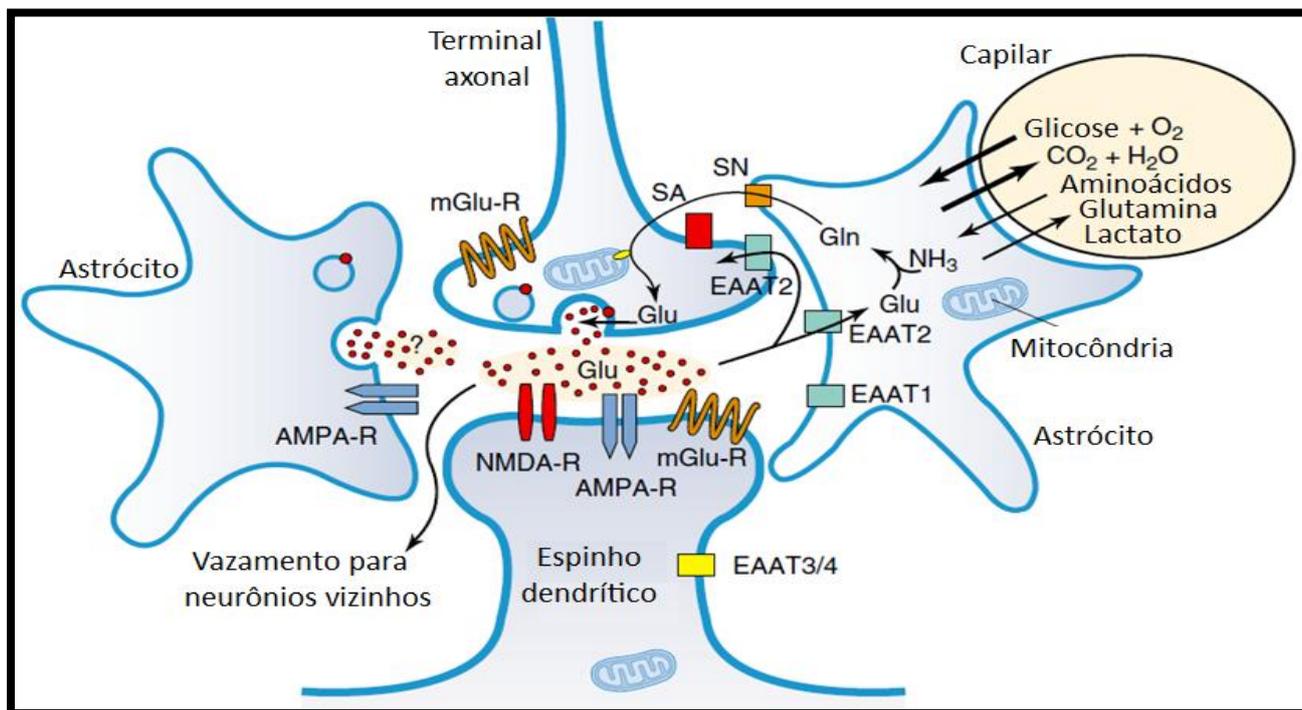


Figura 1: Sinapse Glutamatérgica (adaptado de American Society of Neurochemistry / 2006)

A neurotransmissão sináptica excitatória tem participação dos astrócitos, que têm a função de remover rapidamente o Glu da fenda sináptica e convertê-lo em glutamina, que posteriormente retorna ao neurônio para ser convertida à glutamato (Magistretti *et al.*, 1999). O déficit energético ocasionado pelo evento de HI gera um aumento da liberação de aminoácidos excitatórios na fenda sináptica e uma diminuição na recaptção destes aminoácidos pelos astrócitos. Esta disfunção aumenta a permanência deste neurotransmissor na fenda sináptica implicando em maior ativação dos receptores pós-sinápticos, seguido por aumento na expressão de receptores NMDA com influxo pós-sináptico excessivo de íons Ca^{+2} e Na^{+} juntamente com água (Jabaudon *et al.*, 2000). A morte celular ocorre, principalmente por necrose, devido influxo de água e Na^{+} e também é gerada por uma cascata que se inicia com aumento intracelular dos níveis de Ca^{+} e posterior disfunção mitocondrial, falência energética, ativação de proteases e fosfolipases sendo completada com a morte de células neuronais por apoptose (MClean e Ferriero, 2004), conforme esquema da Figura2.

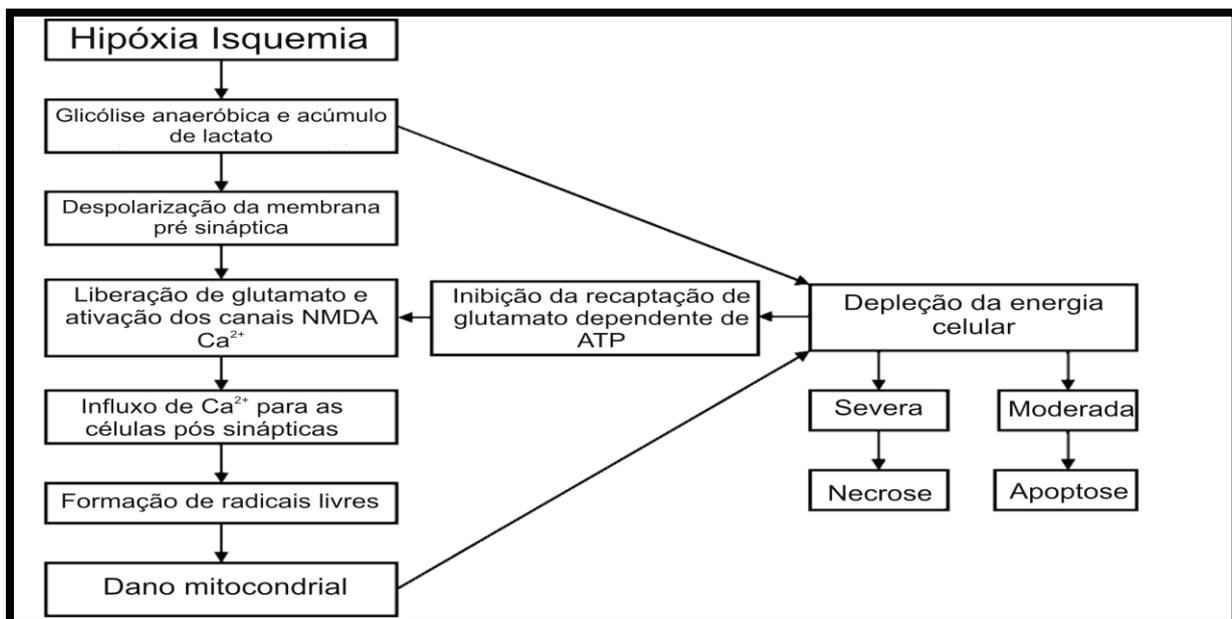


Figura 2: Diagrama que ilustra as cascatas dos eventos que contribuem para lesão de HI (adaptado de Benjamin Y. Huang (2008)).

Associado à excitotoxicidade glutamatérgica ocorre o estresse oxidativo. Mclean e Ferriero (2004) descreveram o estresse oxidativo como um termo geral, que engloba o aumento da produção de radicais livres como resultado do metabolismo oxidativo, geralmente associado com condições patológicas. A diminuição de defesas antioxidantes decorrentes da hipóxia associada com imaturidade encefálica pode originar acúmulo de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido. Isto leva à peroxidação lipídica, alteração no potencial de membrana com aumento de glutamato extracelular e acúmulo de cálcio citosólico (Ferriero, 2001). Ainda, devido ao alto conteúdo lipídico, o encéfalo imaturo é mais suscetível à ação de radicais livres e, sob condições de hipóxia o tecido encefálico sofre peroxidação lipídica muito mais rápida que o tecido maduro e o nível de peroxidação lipídica é superior (Mishra *et al.*, 1989). O que gera também mais estresse oxidativo é o fato de que os sistemas de defesa antioxidante envolvendo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase demonstram menor atividade em encéfalo imaturo do que em adulto- (Khan e Black, 2003). A SOD1 é a enzima responsável pela conversão citosólica de superóxido a peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio pode ser reconvertido em $H_2O + O_2$ pela enzima catalase, pode ser totalmente reduzido à H_2O pela enzima glutathione peroxidase, com elétrons provenientes da glutathione ou então, na presença de ferro (reação de Fenton) pode originar o radical hidroxila (Halliwell *et al.*, 2006). O encéfalo do recém-nascido é rico em ferro quando comparado ao encéfalo adulto, podendo então favorecer a produção de várias espécies reativas de oxigênio (Ferriero, 2001). O potencial nocivo do ferro abundante e a menor quantidade de defesas antioxidantes enzimáticas do encéfalo imaturo estão estreitamente inter-relacionados, culminando com aumento na geração de radicais livres (Subbarao e Richardson, 1990). Então se sabe que a excitotoxicidade glutamatérgica ocorre

concomitantemente com o estresse oxidativo, porém há muito ainda a esclarecer a respeito desta relação.

O insulto hipóxico isquêmico conduz o encéfalo a uma resposta imune adaptativa envolvendo resposta inflamatória pela liberação de citocinas pela microglia, acarretando uma maior lesão tecidual após HI (McClean e Ferriero, 2004). Além de liberação de citocinas, as células microgliais estimulam a liberação de glutamato, radicais livres e óxido nítrico (Mishra *et al.*, 2000). Yoon e colaboradores (2007) descreveram aumento de interleucina (IL)-1 no líquido após lesão HI em neonatos humanos e a administração de antagonistas do receptor da IL-1 acarretou diminuição do dano encefálico.

Os modelos animais nos auxiliam para o maior conhecimento e compreensão dos mecanismos e evolução de inúmeras patologias neurais e também contribuem de forma efetiva no desenvolvimento de estratégias terapêuticas (Yager, 2004). O modelo experimental que reproduz com maior semelhança o insulto hipóxico-isquêmico humano é o sugerido por Rice *et al.*, baseado no procedimento de Levine em ratos adultos (Levine, 1960; Rice *et al.*, 1981; Rooney *et al.*, 1997; Vannucci e Vanucci, 1997; Vannucci *et al.*, 1999; Vannucci e Vannucci, 2005) (Figura 3). O modelo consiste na associação da ligação permanente da artéria carótida comum de um dos lados com a exposição a uma atmosfera hipóxica buscando produzir um dano unilateral no encéfalo do rato. A lesão é realizada precisamente com sete dias, pois o encéfalo de ratos nessa idade tem sido histologicamente comparado ao encéfalo em desenvolvimento de neonatos (Sanders *et al.*, 2005). Este modelo animal é bastante estudado por apresentar um prejuízo cognitivo irrefutável nos animais submetidos à lesão. Os estudos com o modelo de Levine e Rice são facilmente desempenhados, pois os animais são de fácil manuseio, possui uma reprodutibilidade alta com custos baixos e demonstram mudanças histopatológicas consolidadas. (Raju, 1992; Jansen e Low, 1996; Vanucci *et al.*, 1999; Vanucci e Vanucci,

2005). As alterações decorrentes deste modelo de lesão hipóxica-isquêmica encefálica neonatal são convergentes com achados clínicos em recém-nascidos após insulto HI, logo, este modelo é fundamental para melhor entendimento da fisiopatologia da lesão e ampliar o desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras.

Este modelo animal acarreta danos encefálicos bilaterais, porém com lesão mais significativa no hemisfério ipsilateral à lesão, sendo as regiões mais acometidas o córtex cerebral, substância branca periventricular e subcortical, núcleos da base e hipocampo. Estudos prévios demonstraram que ratos com esse tipo de lesão apresentam déficits cognitivos na memória de referência espacial e de trabalho (Young *et al.*, 1986; Jansen e Low, 1996; Ikeda *et al.*, 2001; Alscher, 2002; Arteni *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004; Chávez *et al.*, 2008; De Paula *et al.*, 2009). Diversos estudos relataram prejuízo na memória espacial em ratos submetidos à lesão hipóxico-isquêmica (Mishima *et al.* 2005; Mcauliffe *et al.* 2006; Ikeda *et al.*, 2001). Ainda, o estudo de Arteni e colaboradores relata déficit na memória aversiva em ratos submetidos à HI. Porém, mesmo sabendo da importância da memória emocional na sobrevivência e adaptação de roedores ao ambiente, não se tem dados na literatura que relate as consequências da HI neste tipo de memória. Estudos envolvendo outros aspectos emocionais na HI também são escassos. Alguns demonstraram não haver diferença entre animais lesionados e não lesionados (Arteni *et al.*, 2010; Ikeda *et al.*, 2001). Por outro lado, há relatos de redução no grau de ansiedade em animais submetidos à HI (Hei *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2005).

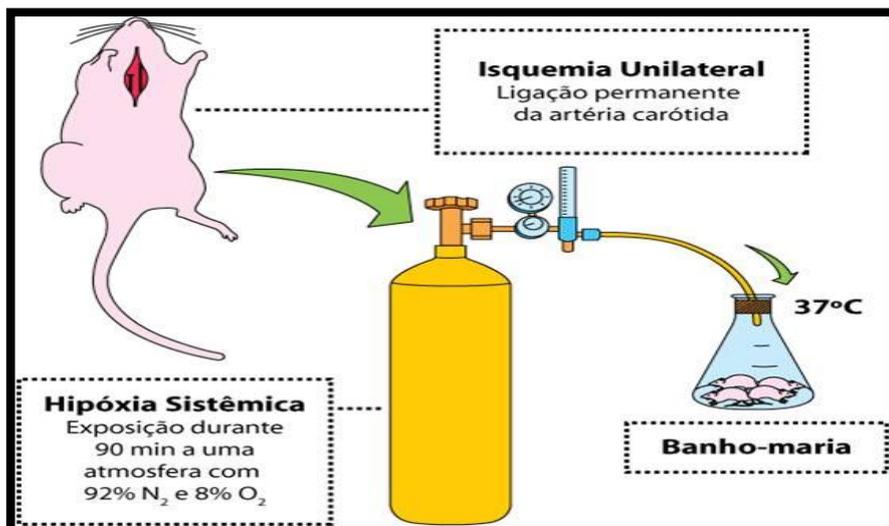


Figura 3: Procedimento modificado de Levine, utilizando a combinação de hipóxia e isquemia.

Embora em número menos expressivo, existem estudos mostrando que animais submetidos ao modelo de Levine e Rice apresentam déficits sensório-motores (Jansen e Low, 1996; Bona *et al.*, 1997). O estudo de Spandou e colaboradores (2005) descreveu que a força muscular e a coordenação motora estão rigorosamente afetadas nos animais submetidos à HI neonatal, dados estes obtidos através dos testes de preensão, de colocação da pata e rota-rod, e análise de reflexos com diferentes estímulos sensoriais. Problemas posturais e assimetria das patas também foram relatados por Bona e colaboradores (1997). Déficits severos na coordenação distal das patas são também relatados após lesão hipóxico-isquêmica (Andrews *et al.*, 2008). Ten e colaboradores (2004) ao avaliar função motora no campo aberto relataram não haver diferença entre os animais lesados e o grupo controle. Assim como outros estudos que não demonstraram alterações motoras em animais lesados e testados no rotarod (Balduini *et al.*, 2006; Lubics *et al.*, 2005).

Além de alterações cognitivas e motoras, estudos envolvendo o modelo de HI descrevem mudanças na morfologia encefálica como: atrofia do hipocampo e do córtex

sensorio motor (Jansen e Low, 1996; Rodrigues *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2007; De Paula *et al.*, 2009), morte celular dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo (Pulsinelli *et al.*, 1982; Kirino e Sano, 1984). Foram descritas também atrofia cortical e alteração no padrão de mielinização de ratos de 3 dias submetidos à lesão hipóxico-isquêmica (Sizonenko *et al.*, 2003). Ainda, Nakajima e colaboradores (2000) relataram aumento de células apoptóticas durante 6 h, 12 h e 7 dias após a HI na região CA1 do hipocampo de ratos, sugerindo um papel prolongado da apoptose neste tipo de lesão. Sabe-se também que os astrócitos tornam-se reativos após lesão no SNC, este mecanismo é denominado astrogliose reativa (Eng *et al.*, 2000, Theodosis *et al.*, 2008). As modificações astrocitárias ocorrem em paralelo com mudanças neuronais (Spolidoro *et al.*, 2008). Este fenômeno prejudica a recuperação funcional após uma lesão encefálica (Hudgins e Levison 1998; Ridet *et al.*, 1993). Sizonenko e colaboradores (2008) relataram alteração na arquitetura das células gliais e proliferação aguda de astrócitos após a lesão hipóxico-isquêmica.

Estudos recentes têm demonstrado funções gliais potencialmente ativas, relatando que os astrócitos possuem uma série de funções no SNC (Volterra e Meldolesi, 2005). Além de atuarem na modulação da plasticidade e função sináptica, o que sugere o seu envolvimento no processo de informação do SNC, os astrócitos desempenham funções fundamentais na fisiologia do SNC. Essas células gliais estão envolvidas no suporte trófico e metabólico dos neurônios, na sobrevivência e diferenciação neuronal, no crescimento de neuritos, na sinaptogênese e na manutenção da homeostase neural (Araque, Parpura *et al.*, 1999; Araque, 2008; Perea, Navarrete *et al.*, 2009).

A proteína fibrilar glial ácida (GFAP) é uma proteína integrante do citoesqueleto astrocitário que faz parte da classe III de filamentos intermediários gliais e está implicada com uma série de modificações na estrutura e funções dessas células (Rutka, Murakami *et*

al., 1997; Araque, 2008). Trata-se de uma proteína que fornece estabilidade além de atuar na manutenção da estrutura e definição da forma celular (Rutka, Murakami *et al.*, 1997). Esta proteína é expressa em astrócitos maduros e sua detecção pode ser utilizada como um dos principais marcadores astrocitários no SNC, embora apresente expressão heterogênea dentre as diferentes regiões encefálicas e uma distribuição celular e regional irregular (pés terminais expressam mais GFAP comparado à ramificação que circunda a região sináptica) (Nishiyama, 2005; Zilles, Hajos *et al.*, 1991; Taft, Vertes *et al.*, 2005). Além disso, mudanças na expressão ou fosforilação desta proteína podem promover modificações na morfologia astrocítica, o que geralmente ocorre em paralelo com mudanças neuronais (Theodosios, Poulain *et al.*, 2008) e podem alterar as propriedades funcionais das regiões encefálicas envolvidas (Gomes, Paulin *et al.*, 1999; Viola, Rodrigues *et al.*, 2009).

A GFAP é comumente utilizada para avaliar a participação dos astrócitos em diferentes processos neuropatológicos, por meio da técnica de imunohistoquímica (Theodosios *et al.*, 2008). Em resposta a uma injúria neurológica ou mediante o processo de neuroplasticidade, os astrócitos tornam-se reativos com o objetivo de proteger as células do SNC (Coleman *et al.*, 2004) e/ou de regular o microambiente sináptico em decorrência ao aumento da atividade neural (Dong; Greenough, 2004).

A resposta astrocítica pode ser avaliada pela intensidade na expressão gênica e protéica da GFAP e por alterações morfológicas (Sofroniew, Vinters, 2010). Deste modo, um aumento na quantidade da GFAP pode indicar hiperplasia e/ou hipertrofia dos astrócitos, podendo ser seguido por modificação no número e no comprimento dos prolongamentos dessas células (Sofroniew; Vinters, 2010). Contrapondo, a diminuição na quantidade de GFAP pode indicar morte celular, redução de proliferação, número e/ou extensão de ramificações (Sofroniew, Vinters, 2010; Pekny, Pekna, 2004). Ennen e

colaboradores (2011), em um estudo com humanos, descreveram que recém-nascidos (RN) com lesão hipóxico-isquêmica apresentavam aumento do nível sérico de GFAP quando comparados com RN do grupo controle. No mesmo estudo foram analisadas imagens de ressonância magnética e foi demonstrada uma relação direta entre a presença de imagens alteradas e aumento sérico de GFAP indicando extravasamento protéico por lesão neural.

Sabe-se que a prática de atividade física e situações de aprendizagem evocam neuroplasticidade, determinando a necessidade de alterações morfológicas de neurônios e astrócitos (Theodosis *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005). O ambiente enriquecido (AE) é um paradigma experimental utilizado para estudar eventos relacionados à neuroplasticidade em diferentes regiões encefálicas, de diversas espécies de animais criados em laboratório, em diferentes idades, desde neonatos de fêmeas criadas em AE até animais idosos (Arnaiz, Bustamante *et al.*, 2004; Sale, Cenni *et al.*, 2007). As características do AE incluem proporcionar aos animais um aumento da interação social, dos estímulos visuais e sensoriais, além de possibilitar a realização de atividade física voluntária, estimulando assim diversas regiões encefálicas conforme ilustrado na figura 4. A troca dos objetos com os quais os animais interagem e a troca de posição desses objetos dentro do ambiente constituem características importantes do modelo de AE, juntamente com a formação de mapas espaciais e concomitante modulação da plasticidade hipocampal (Van Praag, Kempermann *et al.*, 2000; Nithianantharajah e Hannan, 2006).

Dentre as diversas mudanças plásticas geradas pelo AE no SNC de diferentes espécies, destacam-se: neurogênese (Van Praag, Kempermann *et al.*, 2000), aumento de neutrofinas (Rossi, Angelucci *et al.*, 2006), aumento de sobrevivência neuronal, sinaptogênese e proliferação celular (Kempermann, Kuhn *et al.*, 1997; Mohammed, Zhu *et al.*, 2002), indução de cascatas de sinalização (Li, Tian *et al.*, 2006), além de uma

mudança na arborização dendrítica dos neurônios de diversas regiões encefálicas (Faherty, Kerley *et al.*, 2003). Estas mudanças ocorrem em diversas estruturas, sendo que se destacam de forma particular os efeitos observados sobre o hipocampo de animais expostos ao AE (Mohammed, Zhu *et al.*, 2002).

O estudo de Viola e colaboradores (2009), comprovou a alteração da densidade da GFAP no *stratum radiatum* de ratos saudáveis submetidos ao AE; ainda, o mesmo trabalho estudou as ramificações astrocitárias e mostrou haver alteração no formato fusiforme dos astrócitos para um formato mais estrelado (Viola *et al.*, 2009). O estudo de Ziv e colaboradores (2006) demonstrou aumento na expressão de antígenos e ativação da microglia em ratos submetidos ao enriquecimento ambiental. Assim como, estudos com animais submetidos ao AE relatam aumento no fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (During and Cao, 2006; Ickes *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2006; Young *et al.*, 1999). Um estudo de Moser e colaboradores (1994) em animais submetidos ao AE indicou um aumento da sinaptogênese na região de CA1 do hipocampo. Faherty e colaboradores (2003) descreveram um aumento da arborização dendrítica na região CA1 do hipocampo em animais expostos ao AE. Também foi demonstrado que a exposição de animais intactos ao AE resulta em aumento no número de células gliais, assim como aumento no número, comprimento e ramificações de processos primários (Sirevaag e Greenough, 1991; Viola, Rodrigues *et al.*, 2009).

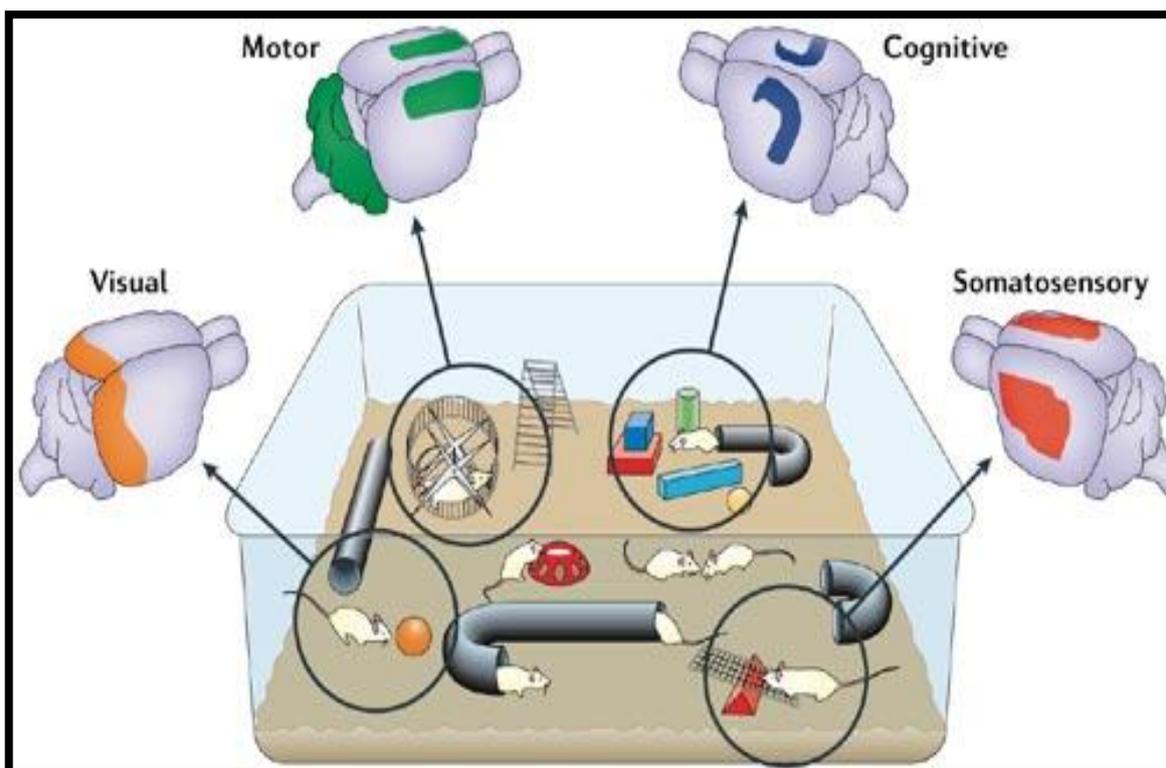


Figura 4 : Esquema ilustrativo dos efeitos visuais, motores, cognitivos e somatosensoriais do AE (modificado de Nithianantharajah e Hannan, 2006).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa têm buscado identificar os efeitos da estimulação em AE em animais submetidos à HI neonatal. O enriquecimento ambiental diário, iniciando-se duas semanas após a HI, resultou em recuperação do prejuízo na memória espacial no labirinto aquático de Morris (Pereira *et al.*, 2007). Em outro estudo subsequente investigamos o efeito de um protocolo precoce de enriquecimento ambiental, iniciando 24 h após a HI. Neste trabalho avaliamos a memória espacial e de reconhecimento de ratos jovens, machos e fêmeas, e como resultado tivemos uma recuperação dos prejuízos de memória resultantes da HI, pela estimulação pelo AE (Pereira, Strapasson *et al.*, 2008).

Inúmeros são os estudos que demonstram os efeitos morfológicos do enriquecimento ambiental em ratos adultos submetidos à isquemia encefálica, porém em ratos neonatos estes relatos são escassos. Trabalhos utilizando o modelo de HI neonatal que aplique

estratégia neuroprotetora, tal como o enriquecimento ambiental e analise as consequências morfológicas e comportamentais são imprescindíveis. Pereira e colaboradores (2007; 2008) investigaram a extensão do dano hipocampal em consequência da lesão HI e verificaram a atrofia do hipocampo sem recuperação significativa após exposição ao AE. Por outro lado, um estudo verificou que ratos expostos a um AE por duas semanas antes e seis dias após um evento isquêmico mostraram maior preservação das células piramidais da região CA1 do hipocampo em relação a animais não expostos ao AE. (Yang *et al.*, 2012) Outro estudo demonstrou que os neurônios piramidais da camada II e III do córtex do hemisfério não lesados em ratos isquêmicos expostos ao AE apresentavam maior número de espinhos dendríticos em comparação com animais mantidos em um ambiente padrão (Johansson, 1996).

Foi demonstrado em animais saudáveis que os astrócitos possuem fundamental importância na plasticidade neural induzida pela experiência, o que é evidenciado pelo aumento da expressão de GFAP após manipulações comportamentais e ambientais, tais como AE (Sirevaag e Greenough, 1991). Um estudo de Briones e colaboradores (2006) relatou aumento da superfície ocupada por prolongamento de astrócitos hipocampais em ratos submetidos ao AE. Ainda, outro estudo demonstrou que o AE provoca uma facilitação na transcrição do DNA e subsequente aumento na síntese de proteínas no SNC (Fischer, Sananbenesi *et al.*, 2007; Pizzorusso, Berardi *et al.*, 2007).

Sabendo de todos os danos encefálicos gerados pela lesão HI, suas consequências ao longo da vida e a escassez de estudos relativos ao tema, este trabalho tem o intuito de analisar em ratos jovens submetidos à HI neonatal: 1. Modificações astrocíticas por meio dada expressão de GFAP; 2. O grau de ansiedade e os déficits de memória emocional no labirinto em cruz elevado; 3. O déficit motor através de análise de cinemetria e 4. O possível efeito do enriquecimento ambiental como estratégia neuroprotetora.

2.OBJETIVOS

2.1 GERAL

2.1.1 Avaliar o efeito do ambiente enriquecido sobre parâmetros comportamentais e aspectos da morfologia de astrócitos do hipocampo, em ratos submetidos à lesão hipóxico-isquêmica neonatal.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Pesquisar o comportamento motor através da cinemetria, analisando a altura e tamanho da passada.

2.2.2 Avaliar a memória emocional e a ansiedade através do labirinto em cruz elevado.

2.2.3 Estudar possíveis alterações na morfologia astrocitária hipocampal através da imunorreatividade da GFAP.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 96 ratos Wistar (machos e fêmeas), 24 animais por grupo, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em condições padrão de biotério (ração e água *ad libitum*, temperatura controlada 22 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12 horas). O protocolo experimental foi desenvolvido de acordo com as diretrizes do Comitê de Cuidado e Uso de Pesquisa com Animais Experimentais, Escola de Medicina Veterinária e Ciência Animal da Universidade de São Paulo, Brasil. O projeto foi aprovado pelo CEUA/UFRGS e PPG-Ciências Biológicas: Neurociências/UFRGS.

Os grupos experimentais foram designados da seguinte forma:

Grupo Controle mantido em ambiente padrão (CTAP);

Grupo Controle exposto a ambiente enriquecido (CTAE);

Grupo HI mantido em ambiente padrão (HIAP);

Grupo HI exposto a ambiente enriquecido (HIAE);

3.2 HIPÓXIA-ISQUEMIA

Os animais, aos 07 dias pós-natal, foram anestesiados com halotano 2-4% conforme rotina do nosso laboratório e submetidos ao procedimento cirúrgico. Este processo iniciou-se com uma incisão na linha média da face anterior da região cervical, sendo então a artéria carótida comum esquerda identificada, isolada de estruturas adjacentes, e ligada com fio cirúrgico de seda 4.0.

Finalizado este procedimento, os animais permaneceram em recuperação sob temperatura controlada durante 15 minutos antes de serem devolvidos às caixas moradia com a mãe, onde permaneceram por 3 horas.

Para o procedimento de hipóxia, em grupos de cinco, os animais foram colocados em uma câmara (1500 mL) e expostos à atmosfera hipóxica (8% de oxigênio e 92 % de nitrogênio, com fluxo de 5L/min) durante 90 min. A câmara permaneceu parcialmente submersa em banho-maria a 37⁰ C a fim de que fosse mantida a temperatura corporal dos ratos lactantes dentro de limites fisiológicos. Ao final da hipóxia, os animais eram retirados da câmara e devolvidos à sua caixa de origem. Os animais controle (Sham) eram submetidos à manipulação e incisão cirúrgica sem haver sido realizada a oclusão arterial e sem a exposição ao ambiente hipóxico.

3.3 AMBIENTE ENRIQUECIDO

O modelo de enriquecimento ambiental utilizado foi o mesmo proposto por Pereira *et al.* (2007, 2008). Conforme o protocolo, os animais dos grupos CTAE e HIAE iniciavam a exposição ao primeiro modelo de AE junto das mães no 8^o DPN, onde permaneciam durante duas semanas. Este modelo consistia em uma gaiola (30 cm X 20 cm X 20 cm) de três andares com brinquedos de diferentes texturas, formas, rodas para exercícios e rampa. Uma vez por semana as gaiolas eram limpas e os brinquedos eram trocados. Aos 21 DPN os animais foram separados da mãe e divididos por sexo em grupos de 7 a 10 animais, dando início ao segundo modelo de AE. A partir de então os animais eram expostos ao AE 1 hora por dia, 6 dias por semana, durante duas semanas. Este segundo modelo de AE consistia em uma grande gaiola (50 cm X 40 cm X 70 cm) com rampas, rodas e diversos objetos com diferentes formas e texturas. Ao final de cada exposição a gaiola era limpa e uma vez por semana os brinquedos eram trocados. Durante as

exposições ao enriquecimento ambiental, os animais dos grupos CTAP e HIAP eram trocados de caixa e permaneciam em ambiente padrão.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O LCE é um aparato em forma de cruz com dois braços em oposição, formando quatro braços, dois deles protegidos por paredes laterais e os outros dois abertos. No ponto de intersecção dos dois braços opostos é determinado um quadrante central. O LCE é utilizado para estudo da ansiedade baseando-se no medo inato que roedores apresentam em espaços abertos. A tendência na primeira exploração é que os animais expostos ao LCE evitem os braços abertos, mesmo possuindo instinto exploratório, e optem pela permanência nos braços fechados, devido à segurança. Este conflito caracteriza uma atitude ansiogênica. Na segunda exposição ao LCE, que é realizada 24 h após a primeira, é possível a análise de outro comportamento além da ansiedade. A tendência na segunda exposição é o aumento da esquivas dos braços abertos, sugerindo um processo de aprendizagem e um envolvimento cognitivo na escolha de uma situação segura (braços fechados) ou aversiva (braços abertos), característico da memória emocional.

Tanto na primeira quanto na segunda exposição os animais foram colocados no quadrante central com o focinho voltado para um dos braços fechados e permaneciam no LCE pelo tempo de cinco minutos. Durante este período o roedor era observado sempre pelo mesmo pesquisador, que considerava as seguintes variáveis:

- número de entradas nos braços abertos;
- percentual de entradas nos braços abertos;
- tempo de permanência nos braços abertos;

- percentual de tempo de permanência nos braços abertos;
- número de entradas nos braços fechados;
- número de avaliações de risco;
- número de *rearings*.

3.4.2 CINEMETRIA

Os animais foram colocados em uma plataforma retangular (10 cm X 20 cm X 100 cm) sendo a parede externa anterior de vidro transparente por onde foram capturadas as imagens laterais da marcha do hemicorpo contralateral à lesão. Todos os animais tinham em sua pata posterior direita, na região do calcanhar, um marcador reflexivo para melhorar a captura de imagens.

Os dados cinemáticos bidimensionais foram coletados através de um computador conectado a uma câmera digital (taxa de amostragem de 50 Hz), que registrava e armazenava *on line* as sequências de imagens da caminhada de cada animal avaliado. Os dados cinemáticos foram adquiridos durante o período de 40 segundos de filmagem e posteriormente foram escolhidos 3 ciclos de passada consecutivas para análise.

As imagens foram captadas, digitalizadas e reconstruídas através do software Dvideow (*Digital Video for Biomechanics for Windows 32 bits* LIB/UNICAMP, versão 5.0). Rotina computacional foi construída para o cálculo do comprimento e altura da passada (Labview versão 8.5, National Instruments, Austin, USA).

3.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Os animais foram submetidos aos protocolos histológicos e imunoistoquímicos consolidados e realizados em estudos prévios (Gharbawie, Gonzalez *et al.*, 2005; Maclellan, Auriat *et al.*, 2006; Derksen, Ward *et al.*, 2007). Para isso, os animais foram

anestesiados com cetamina e xilazina pela via intraperitoneal, sendo realizada, posteriormente, a toracotomia com exposição do coração. A seguir, foram injetados 1000 UI de heparina sódica (cristália) no ventrículo esquerdo e por meio de incisão neste mesmo ventrículo foi inserida uma cânula ligada a uma bomba de perfusão (control company). Após uma segunda incisão, desta vez, no átrio direito, foi perfundida, primeiramente, uma solução salina (150 mL), para lavagem da árvore vascular e posteriormente, uma solução fixadora (200 mL) composta de paraformaldeído (PF) 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M pH 7,4. Após este procedimento, os encéfalos foram retirados por meio da abertura da calota craniana sendo pós fixados na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão, por mais 4 h à temperatura ambiente. Posteriormente, eles foram crioprotégidos pela imersão em sacarose 30% diluídas em TF a 4° C, onde permaneceram até submergirem. Depois de realizar a crioproteção, os encéfalos foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido até a realização das secções (40 µm) em criostato (Leica).

A imunofluorescência foi realizada em secções que continham áreas do hipocampo dorsal, as secções foram fixadas em PF 4 %, lavadas em PBS e após então, bloqueadas por 30 minutos em uma solução contendo 3% de soro normal de cabra (NGS) (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS Triton-X a 0,3% (PBX-Tx) em temperatura ambiente. Em seguida as secções foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário (anti-GFAP 1:200, Sigma-Aldrich) diluído em PBS-Tx e NGS e mantidas em câmara fria (4° C) sob constante agitação. No dia seguinte, as secções foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente (1:500, anti-rabbit IgG Alexa 555, Molecular Probes) diluído em PBS-Tx e NGS por 2 horas em uma sala escura (temperatura ambiente), seguida de lavagem em PBS. Depois disso, os cortes foram montados em lâminas, cobertos com meio de montagem PVA-DABCO (Fluka Analytical) e lamínulas. Para o controle negativo alguns cortes tiveram a exposição ao anticorpo primário omitida, sendo o mesmo substituído por

PBS-Tx durante a realização do protocolo descrito. Todas as amostras foram processadas concomitantemente e incubadas durante o mesmo tempo médio.

Finalizado os procedimentos acima descritos, foi utilizado um microscópio confocal (Zeiss, LSM 700, Axio Observer) para a visualização das marcações fluorescentes (excitação no comprimento de onda 488nm) de modo que foram obtidas 8 imagens de eixo-z (x:0,31 μ m; y:0,31 μ m; z:0,94 μ m) por animal (sendo 3 eixos-z do hipocampo dorsal) de cada hemisfério.

A microscopia confocal permitiu o seccionamento óptico de tecidos relativamente grossos. A escolha cuidadosa da lente juntamente com a seleção apropriada da abertura confocal permitiu que a espessura da secção fosse controlada. Usando uma variedade numérica de lentes o microscópio confocal permitiu secções de aproximadamente 1 μ m de espessura obtidas a uma distância de 150 μ m do tecido. O microscópio confocal acrescentou enormemente o poder de abordagens estereológicas, tanto reduzindo as dificuldades e o trabalho envolvido na obtenção de imagens adequadas. Utilizamos em conjunto com software de análise, permitindo o processamento de amostras prontas que são demasiadamente pequenas, facilitando a subdivisão do tecido que se tornou essencial para manter a orientação específica para a interpretação (Howell, Hopkins *et al.*, 2002).

A densidade numérica dos astrócitos marcados com GFAP positivos no hipocampo dorsal foi estimada, selecionando-se uma área óptica de interesse (AOI) medindo 51165,09 μ m² sobre a imagem resultante da sobreposição das fatias obtidas em eixo z (aumento de 40X, profundidade padronizada em 30 μ m). Dessa forma, os astrócitos que foram localizados dentro do AOI foram contabilizados. A menor AOI foi utilizada em alguns dos animais submetidos ao procedimento de HI (n=3), os quais apresentarem uma grande perda tecidual na região CA1. Os astrócitos localizados dentro das AOI ou intersectando suas bordas lateral direita e superior foram contadas. Dificuldades observacionais a

respeito de células sobrepostas foram resolvidas por meio da verificação das mesmas na sequência de imagens do eixo-z. Todas as marcações inespecíficas e os astrócitos não identificados claramente foram excluídos das análises. A densidade de astrócitos positivos para GFAP (número de células por mm³) foi determinada de acordo com o procedimento estereológico previamente descrito (Mestriner *et al.*, 2011):

$$DA = (nAST / VOI)$$

onde:

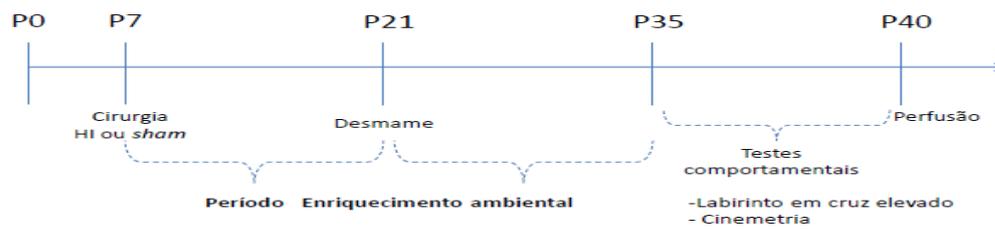
DA = densidade dos astrócitos GFAP+;

nAST = número total de astrócitos presentes no volume de interesse;

VOI = volume de interesse (obtido pela AOI x profundidade total do eixo z).

Para a verificação da área ocupada pelos astrócitos, as imagens foram primeiramente transformadas em preto e branco e binarizadas, ou seja, um valor limiar constante foi aplicado para a mensuração da área percentual da figura ocupada pelo soma e pelos processos astrocitários. Em imagens binárias, cada pixel individual é considerado como “objeto” se sua intensidade estiver acima do limiar utilizado (assumindo que um objeto é mais brilhante do que o fundo) e os pixels abaixo desse valor são considerados sendo fundo ou ruído. No presente trabalho, o valor limiar foi determinado empiricamente através da escolha de um valor que permitia uma maior acurácia das imagens binárias (Centenaro *et al.*, 2011). Tal valor foi selecionado após a realização de vários testes em um grupo de imagens randomicamente selecionadas, as quais possuíam um número variável de astrócitos. O limiar escolhido foi único para todos os grupos experimentais e permitia uma representação fiel da área total ocupada pelos astrócitos, evitando erosões e dilatações. Imagens com artefatos, onde a representação dos astrócitos não se mantinha como o esperado após a aplicação do limiar, foram excluídas da análise.

3.6 DESENHO EXPERIMENTAL



O estudo foi dividido em etapas, explicadas abaixo:

Etapa 1: No sétimo dia de vida os animais foram submetidos à cirurgia de isquemia cerebral e posterior exposição à ambiente hipóxico. Após o procedimento cirúrgico os animais retornavam ao convívio com a mãe e conforme o grupo pertencente eram expostos ao AE.

Etapa 2: No vigésimo primeiro dia pós-natal os animais sofreram processo de desmame e foram divididos conforme os grupos (CTAP,CTAE,HIAP,HIAE), a partir do vigésimo segundo dia foi realizado à exposição ao AE.

Etapa 3: A partir do trigésimo quinto dia pós natal os animais foram submetidos à análises comportamentais. Finalizados os testes comportamentais os animais foram eutanasiados para análise morfológica.

Análise Estatística

Os dados do labirinto em cruz elevado foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, sendo as variáveis independentes lesão e ambiente e a variável repetida a exposição, seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações. As demais variáveis foram analisadas através da ANOVA de duas vias seguidas do teste de Duncan. Os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através de *software* Statistica.

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir referem-se à análise comportamental quanto ao desempenho da memória emocional e ansiedade avaliados no LCE, ao desempenho motor analisado através da locomoção (comprimento e altura da passada) sobre uma plataforma de madeira e à análise morfológica através da imunorreatividade para GFAP.

Ao analisarmos o número de entradas nos braços abertos no LCE, a ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo, considerando a variável exposição ao LCE ($F(1,39)=67,06;p=0,0001$). O teste de Duncan indicou uma diminuição no número de entradas nos braços abertos em todos os grupos experimentais, da primeira para a segunda exposição ao LCE (Figura 5a). Considerando a primeira exposição ao LCE, os animais dos quatro grupos estudados não apresentaram diferenças entre si no número de entradas nos braços abertos.

Em relação aos resultados da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE, foram encontradas diferenças significativas do primeiro para o segundo dia de exposição ($F(1,39)=25,3;p=0,0001$). O *post hoc* Duncan indicou uma diminuição na porcentagem de entradas nos braços abertos nos grupos CTAE ($p=0,011$), HIAE ($p=0,003$) e CTAP ($p=0,039$); este efeito não foi observado no grupo HIAP. Outro achado importante foi a diminuição do percentual de entradas nos braços abertos no segundo dia de exposição ao LCE no grupo HIAE, comparado ao grupo HIAP ($p=0,04$) (Figura 5b). Quando avaliada a porcentagem de entradas dos animais nos braços abertos na primeira exposição ao labirinto, os grupos CTAP, HIAP, CTAE, HIAE não demonstraram diferença entre eles.

A avaliação do tempo de permanência nos braços abertos do LCE mostrou diferenças significativas tanto para o fator exposição ($F(1,39)=33,35;p=0,0001$), quanto para a interação entre exposição e ambiente ($F(1,39)=5,20;p=0,02$). O teste de Duncan apontou uma diminuição no tempo de permanência nos braços abertos do primeiro para o segundo dia de exposição para os grupos CTAE ($p=0,001$) e HIAE ($p=0,003$). Em relação ao segundo dia de exposição, o grupo HIAE apresentou menor tempo de permanência nos braços abertos comparando-se com o grupo HIAP ($p=0,04$) (Figura 6a). A análise do tempo de permanência nos braços na primeira exposição ao LCE não demonstrou diferença significativa entre os grupos experimentais.

O resultado referente ao percentual de tempo de permanência nos braços abertos no LCE apresentou uma diferença significativa para o fator exposição ($F(1,39)=33,35;p=0,0001$) e para a interação entre exposição e ambiente ($F(1,39)=5,20;p=0,02$). O *post hoc* mostrou que há uma diminuição do percentual de tempo de permanência nos braços abertos entre a primeira e a segunda exposição ao LCE para

os grupos CTAE ($p=0,001$) e HIAE ($p=0,003$). Na segunda exposição houve uma menor porcentagem de tempo em braços abertos do grupo HIAE quando comparado ao grupo HIAP ($p=0,04$) (Figura 6b). Avaliando-se a porcentagem de tempo nos braços abertos durante a primeira exposição, os grupos CTAP, HIAP, CTAE e HIAE não demonstraram diferença entre eles.

No conjunto, os resultados das 4 variáveis acima apresentadas representam a exploração do braço aberto no LCE, ou seja, o espaço mais aversivo do aparato. A diminuição da exploração dos espaços abertos, da primeira para a segunda exposição, no labirinto representa a aquisição de uma memória motivada por medo. Assim sendo, aqui observamos um claro déficit na formação deste tipo de memória no grupo submetido à HI, sendo revertido pelo enriquecimento ambiental. Ainda, a ocorrência de mesmos níveis de exploração dos braços abertos na primeira exposição indica que não houve alteração no nível de ansiedade dos animais.

Ao analisarmos o número de entradas nos braços fechados do LCE, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo para a variável exposição ao LCE ($F(1,39)=39$; $p=0,0001$). Ainda, houve uma tendência para a interação entre exposição e ambiente ($F(1,39)=3,17$; $p=0,08$). O *post hoc* Duncan indicou uma diminuição no número de entradas nos braços fechados nos grupos experimentais da primeira para a segunda exposição ao LCE, exceto para o grupo HIAP ($p=0,104$) (Figura 7a).

Em relação ao resultado de exploração vertical (rearings) no LCE a ANOVA de medidas repetidas não mostrou diferenças para os fatores lesão ($F(1,39)=0,06$; $p=0,80$), ambiente ($F(1,39)=0,0002$; $p=0,98$) ou exposição ($F(1,39)=0,75$; $p=0,39$) em todos os grupos experimentais avaliados (Figura 7b). Da mesma forma, o resultado referente ao número de avaliações de risco no LCE não apresentou diferença significativa para os fatores lesão ($F(1,39)=0,31$; $p=0,58$), ambiente ($F(1,39)=1,90$; $p=0,17$) ou exposição ($F(1,39)=1,09$; $p=0,30$) para os grupos CTAP, CTAE, HIAP e HIAE (Figura 7c).

O comportamento locomotor dos animais, por sua vez, foi avaliado através da filmagem da caminhada em uma plataforma onde foi possível avaliar as variáveis comprimento e altura da passada. A ANOVA de medidas repetidas não mostrou diferenças significativas entre os grupos experimentais avaliados ($p>0,05$) tanto para comprimento (Figura 4a) quanto para altura da passada (Figura 8b).

ENTRADAS EM BRAÇOS ABERTOS

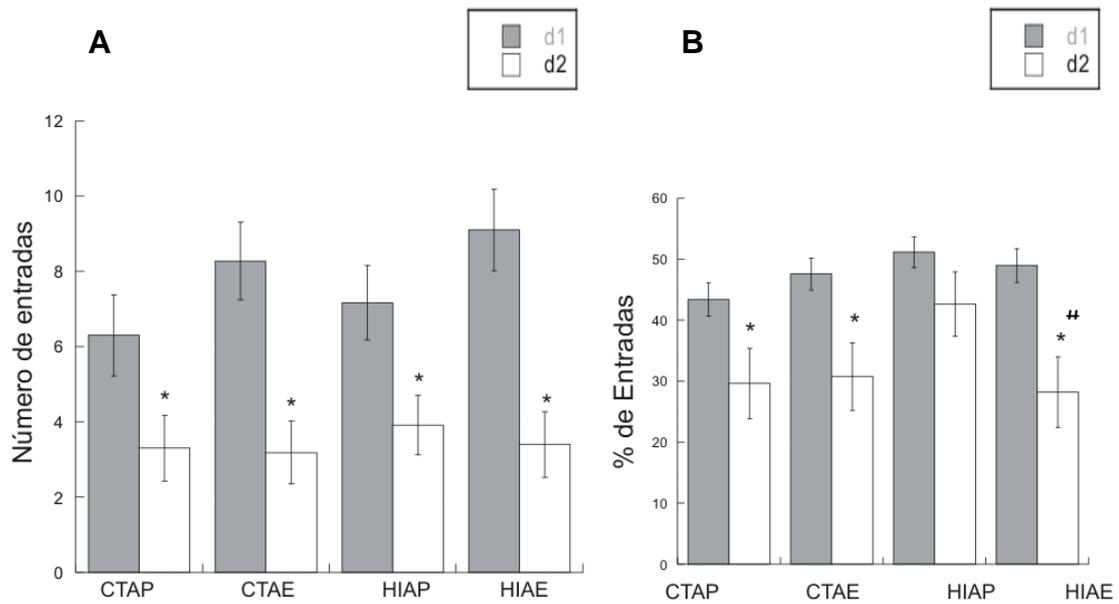


Figura 5: A) Número de entradas nos braços abertos e B) porcentagem de entradas nos braços abertos durante duas exposições de cinco minutos ao LCE. Os dados representam média±erro padrão. * Diferença em relação aos grupos CTAP, CTAE, HIAP e HIAE. #Diferença entre os grupos HIAP e HIAE no segundo dia de exposição.

TEMPO EM BRAÇOS ABERTOS

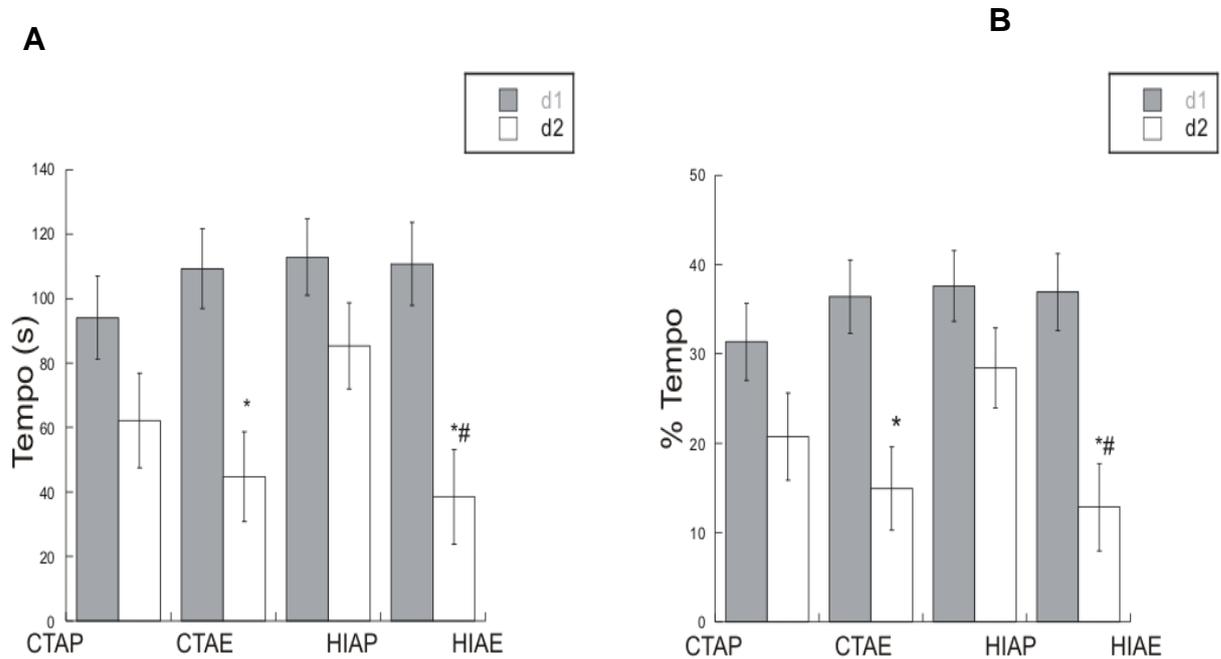


Figura 6: A) Tempo de permanência em braços abertos e B) porcentagem de tempo em braços abertos durante duas exposições de cinco minutos ao LCE. Os dados representam média±erro padrão. * Diferença no tempo de permanência do primeiro para o segundo dia nos grupos CTAE e HIAE. # Diferença no tempo de permanência no segundo dia entre os grupos HIAP e HIAE.

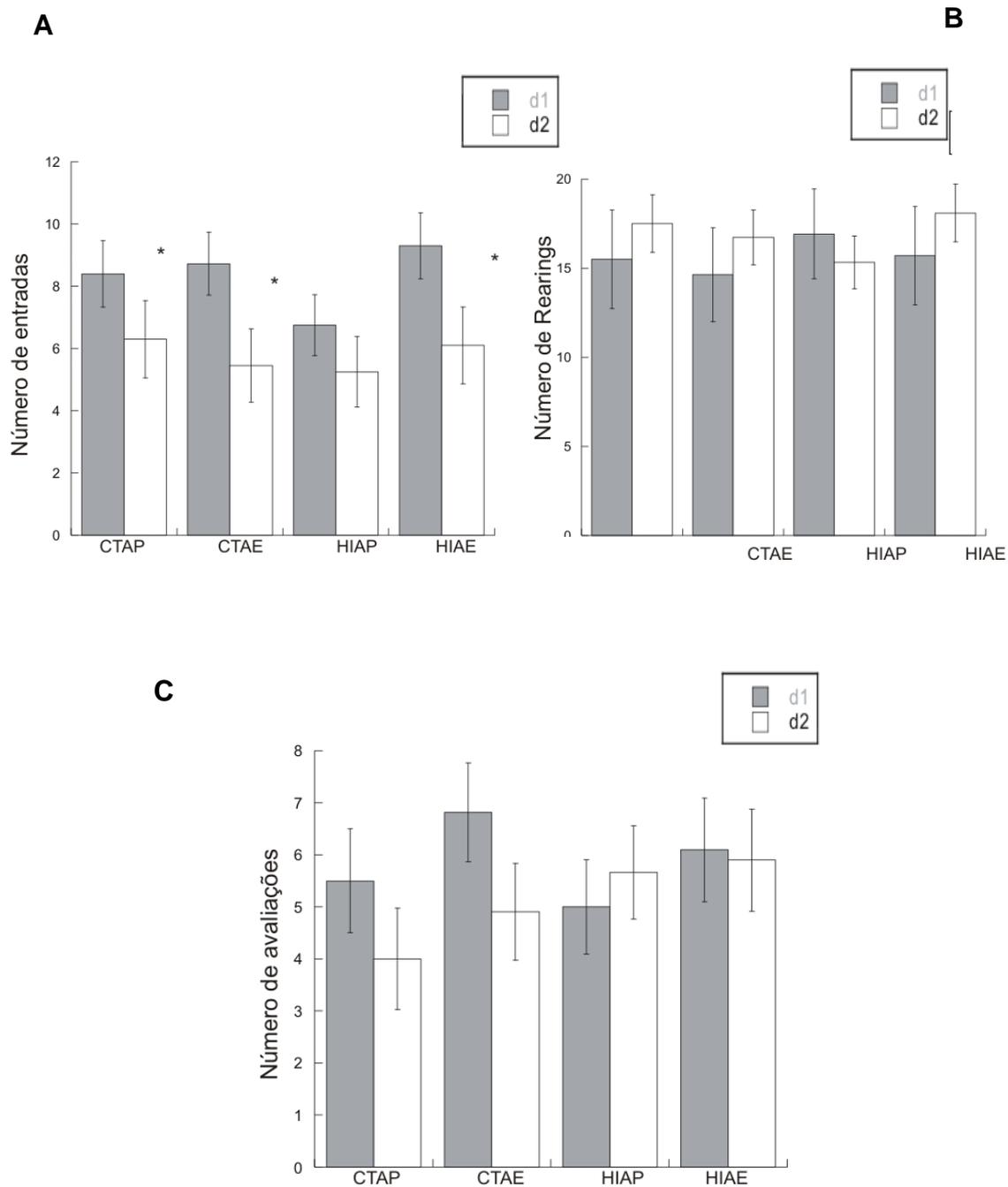


Figura 7: Comportamentos registrados durante duas exposições de cinco minutos ao LCE: A) número de entradas em braços fechados; B) número de *rearings* e C) número de avaliações de risco. Os dados representam média±erro padrão *Diferença em relação aos grupos CTAP, CTAE e HIAE.

CAMINHADA SOBRE A PLATAFORMA

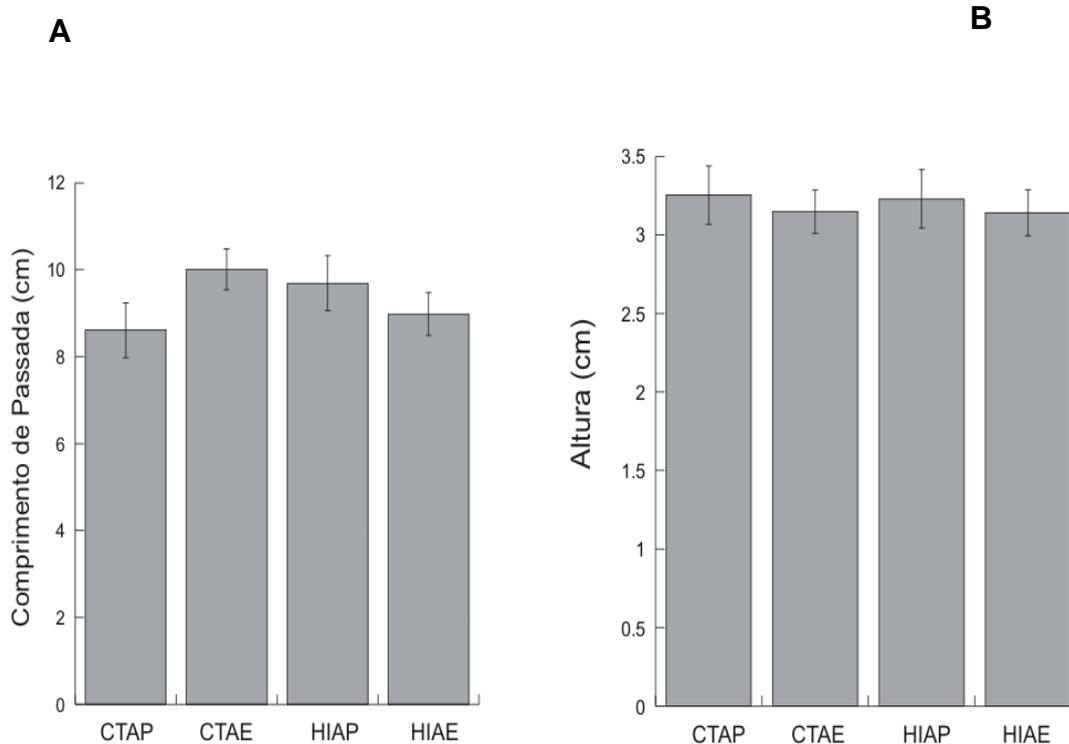


Figura 8: Caminhada sobre a plataforma horizontal. A) comprimento de passada e B) altura da passada, avaliados através de filmagem. Os dados representam média \pm erro padrão.

Em relação à análise morfológica por imunoreatividade para GFAP, foram avaliadas as variáveis densidade e porcentagem de área ocupada por astrócitos em ambos os hemisférios encefálicos.

Ao analisarmos a densidade astrocitária no hipocampo contralateral à lesão não foram encontradas diferenças significativas nos fatores lesão ($F(1,20)=1,72;p=0,20$), ambiente ($F(1,20)=0,96;p=0,33$) e interação entre lesão e ambiente ($F(1,20)=0,10;p=0,33$), entre os grupos experimentais avaliados. O resultado referente à densidade astrocitária no hipocampo do lado ipsilateral à lesão demonstrou uma tendência na interação entre lesão e ambiente ($F(1,20)=3,25;p=0,08$). O teste de Duncan revelou aumento da densidade de astrócitos GFAP+ no grupo HIAP ($p=0,03$) quando comparado aos demais grupos avaliados. Este achado sugere que o AE foi capaz de reverter e/ou prevenir a reação

astrocitária.(Figura 9). As imagens referentes à densidade de astrócitos GFAP+ estão ilustradas na figura 11.

A reação astrocitária, no hipocampo ipsilateral à lesão, avaliada através da porcentagem de área ocupada por astrócitos GFAP+ indicou diferença significativa para o fator lesão ($F(1,20)=5,81;p=0,02$) e na interação entre lesão e ambiente ($F(1,20)=4,60;p=0,04$). O *post hoc* mostrou uma maior porcentagem de área ocupada por astrócitos GFAP+ no grupo HIAP ($p=0,006$) quando comparado aos grupos CTAP, CTAE e HIAE. A porcentagem de área ocupada por astrócitos no hipocampo, no lado contralateral à lesão mostrou diferença significativa para a variável lesão ($F(1,20)=6,80;p=0,01$). O teste de Duncan indicou aumento na porcentagem de área ocupada por astrócitos GFAP+ no grupo HIAP ($p=0,007$) quando comparado aos demais grupos avaliados (Figura 10).

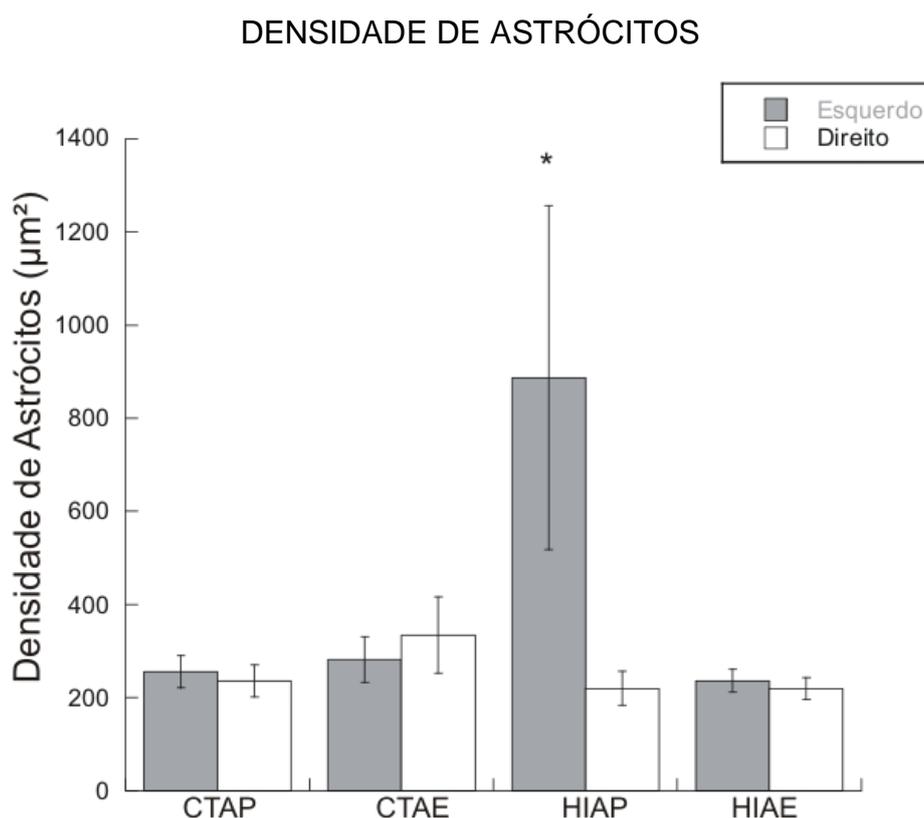


Figura 9: Densidade de astrócitos GFAP+ / μm^2 . * $p=0,03$ (ANOVA de duas vias).

PORCENTAGEM DE ÁREA OCUPADA

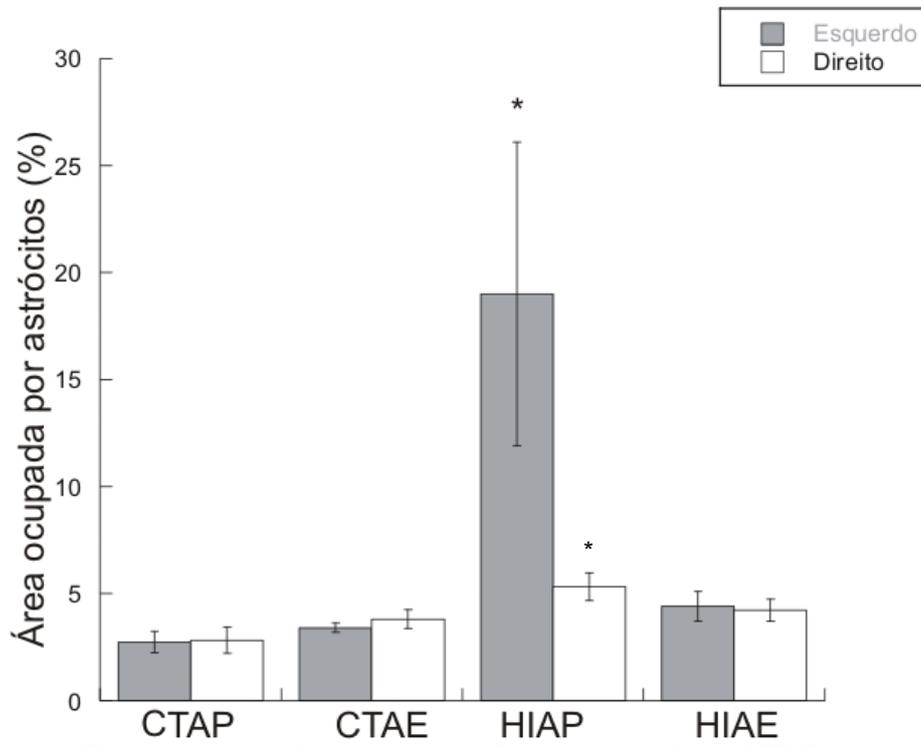


Figura 10: Porcentagem de área ocupada por astrócitos GFAP + / μm^2 .

* $p=0,007$ (ANOVA de duas vias).

DENSIDADE DE ASTRÓCITOS GFAP+ MARCADOS POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

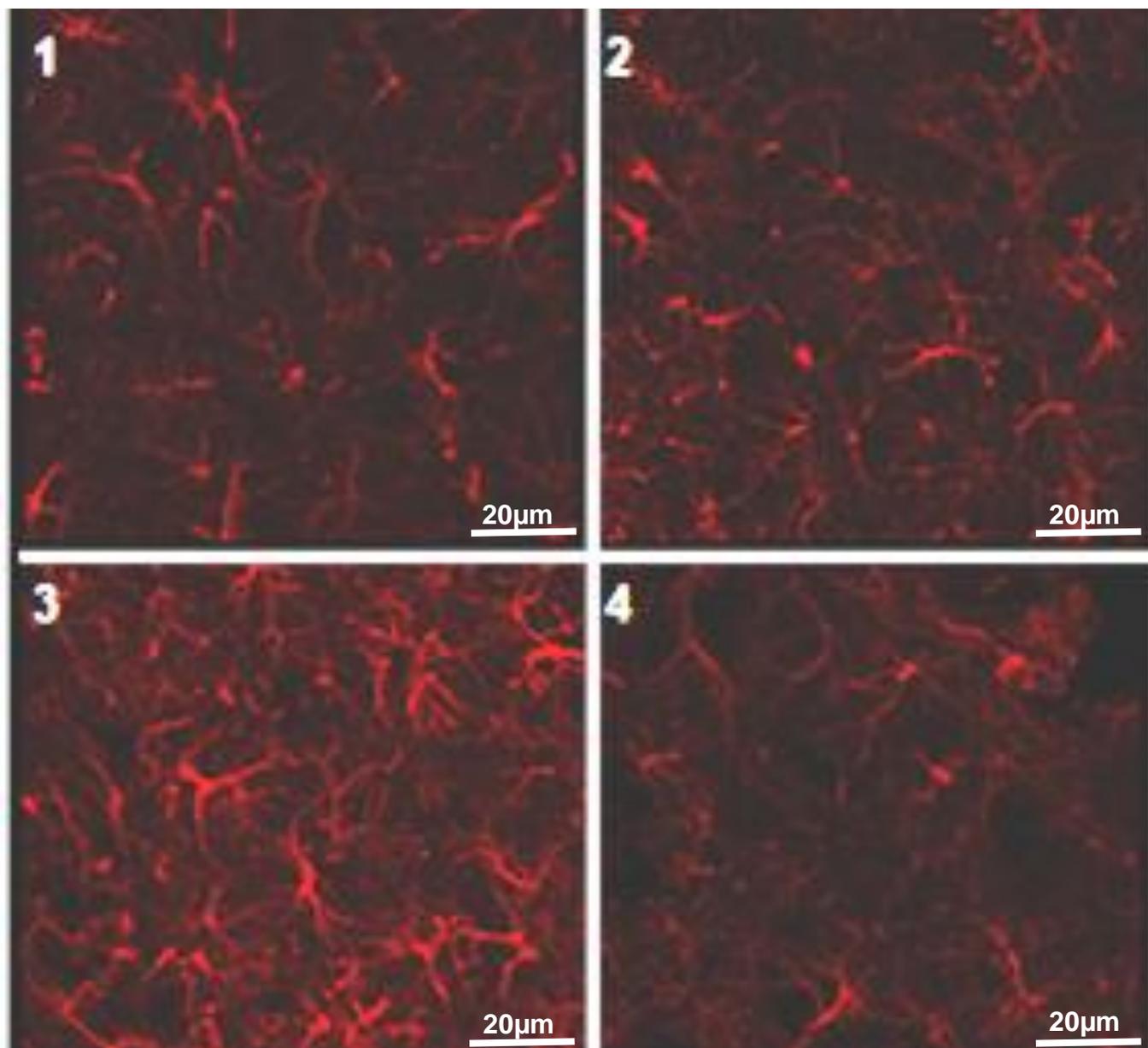


Figura 11: Fotomicrografias ilustrativas de astrócitos GFAP+ nos grupos CTAP; 2CTAE; 3HIAP e 4HIAE. As imagens foram capturadas ao microscópio confocal, na região CA1 do hipocampo ipsilateral à lesão.

5.DISSCUSSÃO

Os objetivos deste trabalho foram analisar os parâmetros comportamentais de locomoção, ansiedade, memória e alterações morfológicas astrogliais na região CA1 do hipocampo em ratos com lesão hipóxico-isquêmica e submetidos ao AE. Os resultados deste estudo demonstraram haver uma recuperação na memória emocional em ratos submetidos ao AE, em contrapartida não há diferença no padrão de locomoção entre os grupos estudados. Na análise morfológica, os animais lesados mantidos em ambiente padrão apresentaram aumento da densidade e porcentagem de área ocupada por astrócitos GFAP+, efeito este que foi revertido pelo AE.

O nosso estudo esteve focado no efeito do enriquecimento ambiental sobre a ansiedade e memória emocional de ratos após lesão hipóxica isquêmica por entendermos que estes aspectos comportamentais possuem relevante importância cognitiva em roedores, permitindo a sua sobrevivência e adaptação ao ambiente (Benfenati, 2007). O LCE foi introduzido por Handley e Mithani (1984) como um modelo para estudo da ansiedade; Pellow e colaboradores (1985) descreveram o LCE como um teste para a identificação dos efeitos de fármacos ansiolíticos e ansiogênicos. Este modelo é fundamentado no medo inato que roedores apresentam em espaços abertos, optando pela permanência em ambientes fechados (Montgomery 1955). Esta situação de conflito entre explorar os braços abertos e permanecer nos braços fechados é característica de ansiedade no LCE (Gray 1982). Em uma segunda exposição ao aparato, Treit e colaboradores (1993) relataram um aumento da esquia aos braços abertos, sugerindo o envolvimento de desempenho cognitivo caracterizando a formação de uma memória motivada por medo ou memória emocional.

Nossos dados em relação à ansiedade demonstraram que ao avaliarmos as variáveis número, porcentagem e tempo de entradas nos braços abertos, não houve mudança significativa no primeiro dia de exposição ao LCE entre os quatro grupos

estudados. Este resultado indica que nem a lesão hipóxico-isquêmica neonatal nem a estimulação em AE alteraram o nível de ansiedade dos animais. Estudos prévios envolvendo ansiedade no modelo de HI neonatal apresentam resultados conflitantes, o que torna os questionamentos em relação a este tema ainda indefinidos. Arteni e colaboradores (2010) relataram após exposição única ao LCE, não haver diferença no nível de ansiedade entre animais com lesão de HI, de ambos os sexos, quando comparados a animais não lesionados. Outro estudo relatou não haver diferença no nível de ansiedade de animais lesionados quando comparados a animais controle avaliados no LCE (Ikeda *et al.*, 2001). Em contrapartida Hei e colaboradores relataram uma diminuição do grau de ansiedade em animais lesionados. Do mesmo modo já foi relatado aumento na porcentagem e tempo de permanência em braços abertos em animais hipóxico-isquêmicos, indicando um efeito ansiolítico (Fan *et al.*, 2005). Em relação aos resultados de avaliação de risco e *rearings* (exploração vertical) não houve diferença entre o primeiro e o segundo dia de exposição. Este dado demonstra não haver importante comprometimento motor dos animais, visto que a exploração do aparato não difere entre os grupos.

Os resultados do nosso estudo relacionados à memória emocional no LCE mostraram que tanto os grupos controle, quanto o grupo HI estimulado em AE tiveram diminuição no número de entradas e porcentagem de entradas em braços abertos assim como houve diminuição no tempo e porcentagem de tempo de permanência em braços abertos, comparando-se a primeira com a segunda exposição. Estes dados são indicativos da formação da memória emocional no LCE. Por outro lado, o grupo HI mantido em ambiente padrão apresentou os mesmos níveis de exploração dos braços abertos na segunda exposição, em comparação com a primeira. Sendo assim, observamos um déficit na memória emocional conseqüente à lesão hipóxico-isquêmica, com recuperação pelo

enriquecimento ambiental. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo investigando a formação da memória emocional no LCE em animais submetidos à HI neonatal e / ou estimulados em AE.

Corroborando com nossos achados em relação ao déficit de memória após a HI, Mishima e colaboradores (2005), constataram que a lesão hipóxica-isquêmica resulta em dano progressivo na memória e aprendizado de roedores, verificados através do labirinto aquático de Morris e labirinto radial. Da mesma forma Mcauliffe e colaboradores (2006) relataram déficit de memória espacial em animais submetidos à HI. Já foi referido também déficit de memória espacial observado no labirinto aquático de Morris e labirinto radial de oito braços em animais isquêmicos (Ikeda *et al.*, 2001). Ainda, Arteni e colaboradores (2003) relataram a presença de déficit de memória aversiva no teste de esquiva inibitória em ratos hipóxico-isquêmicos. Os únicos trabalhos publicados envolvendo HI e AE são do nosso grupo de pesquisa. Pereira e colaboradores (2007) relataram recuperação da memória de referência, trabalho e aversiva em ratos com lesão HI e submetidos ao AE; outro estudo do nosso laboratório demonstrou que ratos adolescentes com lesão hipóxica isquêmica submetidos ao AE reverteram déficits de memória através do teste de reconhecimento de objetos (Pereira *et al.*, 2008). Diversos estudos com enriquecimento ambiental têm demonstrado que este paradigma de estimulação é capaz de recuperar déficits cognitivos em diversas patologias. Trabalho com modelo de doença de Alzheimer proposto por Asada e colaboradores (2011) relatou melhora no déficit de memória no labirinto aquático de Morris. Do mesmo modo, o enriquecimento ambiental se mostrou eficaz na extinção de traços comportamentais desenvolvidos em modelo de estresse social crônico (Schloesser *et al.*, 2010). Wood e colaboradores (2010) relataram melhora na memória espacial em animais com doença de Huntington. Também, um estudo com

modelo animal de autismo relatou um aumento no número de comportamentos sociais após exposição ao enriquecimento ambiental (Schneider *et al.*, 2006).

As estruturas encefálicas envolvidas na formação da memória emocional e também na ansiedade em humanos foram definidas por Sandford e colaboradores (2000): a substância cinzenta periaquedutal, estando relacionada com respostas automáticas; a amígdala, o sistema septohipocampal e as regiões corticais relacionadas com respostas cognitivas, havendo conexões entre estas regiões. Em relação às estruturas envolvidas com a ansiedade em roedores, Vicent e colaboradores (1994) citaram o hipotálamo, a amígdala e o hipocampo. Sabe-se que a amígdala é um complexo de núcleos que atuam na modulação da ansiedade e comportamentos condicionados por medo e memórias emocionais (Anglada-Figueroa e Quirk, 2005; Davis e Whalen, 2001; File, 2000). Já é sabido, também, que tanto o hipocampo dorsal quanto o ventral contribuem para o processamento e formação da memória condicionada pelo medo (Kenney *et al.*, 2012). Zhang e colaboradores (2012) relataram aumento da proteína PSD-95, proteína pós-sináptica já relacionada com a maturação de sinapses glutamatérgicas nos neurônios hipocámpais (El-Husseini *et al.*, 2000), no hipocampo e amígdala em ratos submetidos a isolamento social e com características de ansiedade no LCE.

Dados a respeito da locomoção também foram investigados neste estudo, através da filmagem do deslocamento horizontal dos animais em uma plataforma e, com posterior análise das imagens, foram verificadas altura e comprimento da passada. Nossos resultados não mostraram alterações nos parâmetros de locomoção entre os quatro grupos estudados. Inúmeros estudos envolvendo o modelo de HI neonatal de Levine-Rice demonstram a presença de importante déficit cognitivo (Young *et al.*, 1986; Jansen e Low, 1996; Ikeda *et al.*, 2001; Alscher, 2002; Arteni *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004; Pereira

et al., 2007; Chávez *et al.*, 2008; De Paula *et al.*, 2009). No entanto, achados referentes a déficits motores no modelo não são tão conclusivos. O trabalho de Lubics e colaboradores (2005) menciona o aumento da atividade motora em animais lesionados quando submetidos ao teste de campo aberto. Alguns estudos encontraram déficits motores após a HI, quando avaliados no teste de rotarod (Girardi *et al* 2009; Paizati *et al* 2009). Spandou e colaboradores (2005) demonstraram déficit de força muscular e coordenação motora em animais submetidos à lesão hipóxica-isquêmica através do teste de preensão, colocação da pata e rotarod. Ainda, Meier e colaboradores (2006) descreveram alteração na marcha de roedores após lesão de HI através do teste de marcação das patas. Em contrapartida, um estudo que avaliou a função motora no teste de campo aberto relatou não haver diferença entre o grupo lesado e o grupo controle (Ten *et al.* 2004). Da mesma forma, avaliando-se alterações motoras no teste de rotarod o estudo de Balduini e colaboradores (2006) não demonstrou alterações motoras em animais com lesão HI. Ainda que não haja consenso a respeito das características dos déficits motores após a HI neonatal, é possível também propormos que a avaliação das análises de imagens na marcha no nosso estudo não foi capaz de detectar possíveis sequelas motoras presentes nos animais estudados.

Para estudo da morfologia da lesão encefálica neonatal, analisamos a imunorreatividade para GFAP na região CA1 do hipocampo, primeiro alvo neste tipo de dano (Gee *et al* 1998). Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo envolvendo a lesão de hipóxia isquemia neonatal e a análise da morfologia astrocitária pela marcação da GFAP em animais expostos ao AE. Os resultados do nosso estudo indicaram haver um aumento na densidade e porcentagem de área ocupada por astrócitos GFAP+ na região CA1 do hipocampo no lado ipsilateral à lesão em animais submetidos à HI e mantidos em ambiente padrão. Também no hipocampo contralateral, houve um aumento na porcentagem de área ocupada pelos astrócitos no grupo HI não-estimulado. Esses

achados indicam um aumento na reatividade astrocitária consequente à HI neonatal, a qual é prevenida e/ou revertida pelo enriquecimento ambiental. Chamamos a atenção para o fato de que os grupos controle bem como o grupo HI estimulado em AE não demonstraram mudança na expressão dos astrócitos.

Sabe-se que astrócitos tornam-se reativos após injúrias resultantes de trauma, desordem genética ou insulto químico gerando a rápida síntese de GFAP, evento este denominado astrogliose (Eng *et al.*, 2000). Esta reação dos astrócitos é indicativa de lesão no SNC (Sofroniew e Winters, 2010; Matyash e Kettenmann, 2009; Pekny e Nilsson, 2005). O aumento na expressão de GFAP acarreta alterações morfológicas em astrócitos, modificando as propriedades das regiões encefálicas afetadas (Theodosis *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 1999). Entre as características destas alterações na morfologia está a facilitação das conexões entre neurônios (Spolidoro *et al.*, 2008).

Estas mudanças astrocitárias ocorrem paralelamente com alterações neuronais (Faherty *et al.*, 2003), sendo ambas responsáveis pela recuperação funcional após exposição ao AE. Esta estratégia de neuroproteção tem se mostrado eficaz em aumentar a neurogênese (Hicks 2007) e a sinaptogênese (Duffy 2001), o que poderia se relacionar diretamente com os achados do presente estudo. Sabe-se também que há maiores alternativas de modulação e adaptação frente a uma lesão quando o local lesado é devidamente estimulado (Ikeda *et al.*, 2008). Quando expostos a estímulos ambientais precoces, os animais apresentam diferenças comportamentais sociais, modificando níveis de neurotrofinas na região hipocampal (Branchi *et al.*, 2005). Ainda, tem sido proposto que atividades funcionais contribuam para a plasticidade encefálica induzida pela experiência (Reichenbach *et al.*, 2010; Sofroniew *et al.* 2010). Briones e colaboradores (2006) relataram um aumento da superfície ocupada por prolongamento GFAP+ no hipocampo de ratos expostos a AE. Os dados de Viola e colaboradores (2009) corroboram com esses achados

ao observarem uma alteração na morfologia astrocitária, passando de formato fusiforme para estrelado, na região de CA1 do hipocampo em camundongos jovens submetidos ao AE. Essas alterações morfológicas foram acompanhadas por uma melhora na memória de reconhecimento. Os benefícios da estimulação pelo enriquecimento ambiental em modelos de isquemia em adulto e doenças neurodegenerativas, bem como em roedores após evento hipóxico-isquêmico é bem aceito. Porém os mecanismos neuronais desta estimulação ainda necessitam de explicações mais contundentes que fundamentem terapias neuroprotetoras não farmacológicas. Tendo o conhecimento de que o aumento da expressão de GFAP é um marcador seguro para identificarmos lesões no SNC, o nosso estudo revelou que a exposição de animais com lesão HI, ao AE foi capaz de reverter e/ou prevenir a reação astrocitária, uma vez que identificamos maior densidade e percentual de área ocupada por astrócitos exclusivamente em animais mantidos em ambiente padrão. Este achado nos dá subsídio para propor que os efeitos funcionais do AE já identificados no modelo de HI de Levine e Rice podem ser mediados, provavelmente, por uma prevenção da lesão tecidual no hipocampo. A manutenção da integridade do tecido nervoso nos animais enriquecidos poderia, então, evitar a presença da astrogliose.

Sendo assim, nossos resultados demonstraram que os animais com lesão hipóxico-isquêmica apresentaram déficit de memória emocional no LCE e que o enriquecimento ambiental foi capaz de revertê-lo. Em relação à morfologia o enriquecimento ambiental mostrou-se eficaz como prevenção e/ou reversão da reatividade astrocitária na região CA1 do hipocampo após o a HI neonatal. Em contrapartida, a avaliação da locomoção dos animais não sofreu alteração nem pela lesão nem pela estimulação ambiental. Considerando que este é o primeiro estudo que relaciona a recuperação da memória motivada por medo decorrente de HI encefálica neonatal e imunoreatividade para GFAP,

novo estudos são necessários para que se possa confirmar essa recuperação e reforçar o papel neuroprotetor do enriquecimento ambiental.

6.CONCLUSÕES

Os resultados desta dissertação permitem concluir que:

A lesão hipóxico-isquêmica neonatal, assim como a estimulação em AE, não alteraram o nível de ansiedade dos animais;

O enriquecimento ambiental, iniciado logo após a lesão hipóxico-isquêmica encefálica neonatal, resultou em recuperação do prejuízo na memória emocional em ratos jovens. Isto indica que o AE é capaz de reverter e/ou prevenir este déficit;

A lesão causada pela HI não alterou o padrão de marcha e locomoção em ratos jovens, indicando que o teste utilizado para avaliação deste comportamento motor não foi sensível para o modelo estudado;

A HI encefálica neonatal aumentou a densidade e a porcentagem de área ocupada por astrócitos GFAP+ na região CA1 do hipocampo, o que nos leva a concluir que o modelo de lesão utilizado desencadeia astrogliose reativa;

O AE reverteu a reação astrocitária causada pela HI, concluindo que esta intervenção neuroprotetora reduz a astrogliose reativa;

Em resumo, o modelo de lesão utilizado neste estudo demonstrou não modificar o nível de ansiedade, assim como não alterou a marcha e locomoção dos animais. Em contrapartida, a lesão HI resultou em déficits de memória emocional e desencadeou astrogliose reativa na região CA1 do hipocampo. O AE por sua vez não alterou os parâmetros de ansiedade e locomoção, porém foi capaz reverter e/ou prevenir os déficits de memória e morfologia hipocampal.

7.PERSPECTIVAS

Analisados os dados encontrados no presente estudo surgem as seguintes perspectivas:

Investigar outras variáveis morfológicas que possam ser influenciadas pelo enriquecimento ambiental, tais como modificações na estrutura da barreira hematoencefálica e modificações astrogliais ao longo do desenvolvimento;

Analisar as modificações no SNC tais como neurogênese, sinaptogênese e proliferação celular em animais com lesão hipóxico-isquêmica e expostos ao AE.

Pesquisar o papel de outras estruturas envolvidas com a emoção e ansiedade, como a amígdala e correlacionar com comportamento de animais submetidos à lesão hipóxica isquêmica;

Avaliar a possível contribuição de fatores neurotróficos derivado do cérebro (BDNF) e da glia (GDNF) em animais expostos ao AE

8.BIBLIOGRAFIA

- Alscher, S. Estresse oxidativo na hipóxia-neonatal em cérebro de ratos. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002. p.101.
- Anglada-Figueroa, D.; Quirk, G. J. Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 42, p. 9680-9685. 2005.
- Andrews, E., S. Tsai, *et al.* Human adult bone marrow-derived somatic cell therapy results in functional recovery and axonal plasticity following stroke in the rat. *Experimental Neurology*, v.211, n.2, p.588-589. 2008.
- Araque, A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biology*, v.4, p.3-10. 2008.
- Araque, A., V. Parpura, *et al.* Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, v.22, n.5, p.208-215. 1999.
- Arnaiz, S., J. Bustamante, *et al.* Enriched environment, brain nitric oxide synthase and synaptic plasticity in pre-pubertal and young rats. XII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research. Buenos Aires, p.77. 2004
- Arteni, N. S., L. O. Pereira, *et al.* Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behavioural Brain Research*, v.210, n.1, p.92-98. 2010.
- Arteni, N. S., J. Salgueiro, *et al.* Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Research*, v.973, n.2, p.171-178. 2003.
- Bagary, M. *et al.* Is benzodiazepine-induced amnesia due to deactivation of the left prefrontal cortex? *Psychopharmacology*, v. 150, n. 3, p. 292-299. 2000.
- Balduini, W. *et al.* Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research*, v. 859, n. 2, p. 318-25. 2000.
- Benfenati, F. Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomedical*, v. 78 ,p. 58-66. 2007.
- Bona, E., B. Johansson, *et al.* Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatric Research*, v.42, n.5, p.678-683. 1997.
- Branchi, I.; Ricceril, L. Refining learning and memory assessment in laboratory rodents. An ethological perspective. *Ann Ist Super Sanita*, v. 40, n. 2, p. 231-236. 2004.
- Brinton, R. D. *et al.* Vasopressin-induction of the immediate early gene, NGFI-A, in cultured hippocampal glial cells. *Molecular Brain Research*, v. 57, n. 1, p. 73-85.1998.
- Briones, T. L. *et al.* Astrocytic changes in the hippocampus and functional recovery after cerebral ischemia are facilitated by rehabilitation training. *Behavioural Brain Research*, v. 171, n. 1, p. 17-25.2006.
- Cao, L. *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes olfactory ensheathing cells migration. *Glia*, v. 54, n. 6, p. 536-544. 2006.

- Centenaro, L. A. *et al.* Olfactory and respiratory lamina propria transplantation after spinal cord transection in rats: effects on functional recovery and axonal regeneration. *Brain Research*, v. 1426, p. 54-72.2011.
- Coleman, E. *et al.* Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia*, v. 48, n. 2, p. 166-178. 2004.
- De Paula, S., A. Vitola, *et al.* Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatric Research*, v.65, n.6, p.631-635. 2009.
- Derksen, M. J., N. L. Ward, *et al.* MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.87, n.3, p.404-415. 2007.
- Dong, W. K.; Greenough, W. T. Plasticity of nonneuronal brain tissue: roles in developmental disorders. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, v. 10, n. 2, p. 85-90, 2004.
- Duffy, S. N. *et al.* Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn Memory*, v. 8, n. 1, p. 26-34.2001.
- El-Husseinni, A. E. *et al.* PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, v. 290, n. 5495, p. 1364-1368. 2000.
- Engidawork, E., Y. Chen, *et al.* Effect of perinatal asphyxia on systemic and intracerebral pH and glycolysis metabolism in the rat. *Experimental Neurology*, v.145, n.2, p.390-396. 1997.
- Faherty, C., D. Kerley, *et al.* A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Developmental Brain Research*, v.141, n.1-2, p.55-61. 2003.
- Fan, C. L., P. J. Gao, *et al.* Therapeutic neovascularization by autologous transplantation with expanded endothelial progenitor cells from peripheral blood into ischemic hind limbs. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.26, n.9, p.1069-1075. 2005.
- Fan, L. W. *et al.* Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *Behavioural Brain Research*, v. 165, n. 1, p. 80-90.2005.
- Ferriero, D. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Developmental Neuroscience*, v.23, n.3, p.198-202. 2001.
- Fischer, A., F. Sananbenesi, *et al.* Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, v.447, n.7141, p.178-182. 2007.
- García-Chávez, D., I. González-Burgos, *et al.* Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. *Neuroscience Letter*, v.448, n.1, p.148-152. 2008.

Gharbawie, O. A., C. L. R. Gonzalez, *et al.* Skilled reaching impairments from the lateral frontal cortex component of middle cerebral artery stroke: a qualitative and quantitative comparison to focal motor cortex lesions in rats. *Behavioural Brain Research*, v.156, n.1, p.125-137. 2005.

Girard, S. *et al.* Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience*, v. 158, n. 2, p. 673-682.2009.

Golan, H. E M. Huleihel. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Developmental Science*, v.9, n.4, p.338-349. 2006.

Gomes, F., D. Paulin, *et al.*, Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.32, n.5, p.619-631. 1999.

Gray, J. A. Anxiety as a paradigm case of emotion. *Br Med Bull*, v. 37, n. 2, p. 193-7.1981.

Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v. 141, n. 2, p. 312-22, Jun 2006.

Handley, S. L.; Mithani, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, v. 327, n. 1, p. 1-5.1984.

Hanisch, U. K.; Kettenmann, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, v. 10, n. 11, p. 1387-1394. 2007.

Hei, M., F. Liu, *et al.*, Effect of Tanshinone IIA on phosphorylated NMDA receptor 1 expression and intracellular free calcium concentration in neonatal SD rats with hypoxic ischemic brain damage. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, v.35, n.9, p.940-946. 2010.

Himmelmann, K., G. Hagberg, *et al.* The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. X. Prevalence and origin in the birth-year period 1999-2002. *Acta Paediatrica*, v.99, n.9, p.1337-1343. 2010.

Hossain, M. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy & Behavior*, v.7, n.2, p.204-213. 2005.

Howell, K., N. Hopkins, *et al.* Combined confocal microscopy and stereology: a highly efficient and unbiased approach to quantitative structural measurement in tissues. *Experimental Physiology*, v.87, n.6, p.747-756. 2002.

Ikeda, T. *et al.* Rehabilitative training tasks improve spatial learning impairment in the water maze following hypoxic-ischemic insult in neonatal rats. *Pediatric Research*, v. 59, n. 1, p. 61-65. 2006.

Ikeda, T., K. Mishima, *et al.* Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behavioural Brain Res*, v.118, n.1, p.17-25. 2001.

- Jabaudon, D. et al. Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, v. 97, n. 10, p. 5610-5615. 2000.
- Jansen, E. M. E W. C. Low. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behavioural Brain Research*, v.78, n.2, p.189-94. 1996.
- Johansson, B. B. Functional outcome in rats transferred to an enriched environment 15 days after focal brain ischemia. *Stroke*, v.27, n.2, p.324-326. 1996.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn, *et al.* More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, v.386, n.6624, p.493-495. 1997.
- Kenney, J. W.; Raybuck, J. D.; Gould, T. J. Nicotinic receptors in the dorsal and ventral hippocampus differentially modulate contextual fear conditioning. *Hippocampus*. 2012.
- Khan, J. Y. Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. *Pediatric Research*, v. 54, n. 1, p. 77-82. 2003.
- Kirino, T., A. Tamura, *et al.* Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathology*, v.64, n.2, p.139-147. 1984.
- Levine, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *American Journal of Pathology*, v.36, p.1-17. 1960.
- Li, S., X. Tian, *et al.* The environment versus genetics in controlling the contribution of MAP kinases to synaptic plasticity. *Current Biology*, v.16, n.23, p.2303-2313. 2006.
- Lubics, A., D. Reglodi, *et al.* Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioural Brain Research*, v.10, n.1, p.157-165. 2005.
- Maclellan, C., A. Auriat, *et al.* Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for pytoprotection studies. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v.26, n.8, p.1031-1042. 2006.
- Magistretti, P. Neuron–glia metabolic coupling and plasticity. *Journal of Experimental Biology* v.209, p.2304-2311. 2006.
- Mcauliffe, J. J., L. Miles, *et al.* Adult neurological function following neonatal hypoxia-ischemia in a mouse model of the term neonate: water maze performance is dependent on separable cognitive and motor components. *Brain Research*, v.1118, n.1. p.208-221. 2006.
- Mestriner, R. G. *et a.* Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Experimental Neurology*, v. 227, n. 1, p. 53-61. 2011.
- Mcdonald, J., F. Silverstein, *et al.* Systemic administration of mk-801 protects against n-methyl-d-aspartate-mediated and quisqualate-mediated neurotoxicity in perinatal rats. *Neuroscience*, v.36, n.3, p.589-599. 1990.

- Meier, C. *et al.* Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatric Research*, v. 59, n. 2, p. 244-249.2006.
- Mishima, K. *et al.* Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neuroscience Letter*, v. 376, n. 3, p. 194-199. 2005.
- Mishima, Y., H. Harada, *et al.* Induction of neuronal tolerance by electroconvulsive shock in rats subjected to forebrain ischemia. *Kurume Medical Journal*, v.52, n.4, p.153-160. 2005.
- Mishra,O.P. Lipid peroxidation in developing fetal guinea pig brain during normoxia and hypoxia. *Brain Research Developmental*, v. 45, n. 1, p. 129-135.1989.
- Mishra, O. P. Hypoxia-induced generation of nitric oxide free radicals in cerebral cortex of newborn guinea pigs.*Neurochemical Research* v. 25, n. 12, p. 1559-1565. 2000.
- Mohammed, A. H., S. W. Zhu, *et al.* Environmental enrichment and the brain. *Plasticity in the Adult Brain: from Genes to Neurotherapy*, v.138, p.109-133. 2002.
- Montgomery, K. C.; Monkman, J. A. The relation between fear and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 48, n. 2, p. 132-136. 1955.
- Moser, M. B.; Trommald, M.; Andersen, P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proceedings of National Academy of Science of the U S A*, v. 91, n. 26, p. 12673-12685.1994.
- Nakajima, W., A. Ishida, *et al.* Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *Journal of Neuroscience*, v.20, n.21, p.7994–8004. 2000.
- Nithianantharajah, J. E A. Hannan. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, v.7, n.9, p.697-709. 2006.
- Pazaitil, A. *et al.* Evaluation of long-lasting sensorimotor consequences following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: the neuroprotective role of MgSO₄. *Neonatology*, v. 95, n. 1, p. 33-40, 2009.
- Pekny, M.; Pekna, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *Journal of Pathology*, v. 204, n. 4, p. 428-437. 2004.
- Pekny, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, v. 50, n. 4, p. 427-434. 2005.
- Perea, G., M. Navarrete, *et al.*, Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, v.32, n.8, p.421-431. 2009.
- Pereira, L. O., N. S. Arteni, *et al.* Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology Learn and Memory*, v.87, n.1, p.101-108. 2007.

- Pereira, L. O., A. C. Strapasson, *et al.* Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Research*, v.1218, p.257-266. 2008.
- Perlman, J. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*, v.117, n.3, p.28-33. 2006.
- Pizzorusso, T., N. Berardi, *et al.* A richness that cures. *Neuron*, v.54, n.4, p.508-510. 2007.
- Pulsinelli, W., J. Brierley, *et al.* Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals of Neurology*, v.11, n.5, p.491–498. 1982.
- Raju, T. Some animal models for the study of perinatal asphyxia. *Biology of Neonate*, v.62, n.4, p.202-214. 1992.
- Reichenbach, A.; DEROUICHE, A.; KIRCHHOFF, F. Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Research Review*, v. 63, n. 1-2, p. 11-25. 2010.
- Rice, J. E., R. C. Vannucci, *et al.* The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology*, v.9, n.2, p.131-141. 1981.
- Rodrigues, A., N. Arteni, *et al.* Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Research*, v.1002, n.1-2, p.94-99. 2004.
- Rooney, T., T. Raju, *et al.* Animal models for the study of perinatal hypoxic–ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Human Development*, v.47, n.2, p.115-146. 1997.
- Rossi, C., A. Angelucci, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, v.24, n.7, p.1850-1856. 2006.
- Rutka, J., M. Murakami, *et al.* Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *Journal of Neurosurgery*, v.87, n.3, p.420-430. 1997.
- Sale, A., M. Cenni, *et al.* Maternal enrichment during pregnancy accelerates retinal development of the fetus. *Plos One*, v.2, n.11. 2007.
- Sanders, R., N. Patel, *et al.* Isoflurane exerts antinociceptive and hypnotic properties at all ages in Fischer rats. *British Journal of Anaesthesia*, v.95, n.3, p.393-399. 2005
- Sandford, J. J.; Argyropoulos, S. V.; Nutt, D. J. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 88, n. 3, p. 197-212. 2000.
- Schlösser, R. G.; Wagner, G.; Sauer, H. Assessing the working memory network: studies with functional magnetic resonance imaging and structural equation modeling. *Neuroscience*, v. 139, n. 1, p. 91-103. 2006.
- Schneider, T.; Turczak, J.; Przewlocki, R. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 1, p. 36-46. 2006.

- Sirevaag, A. E. W. Greenough. Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual-cortex of rats reared in complex environments. *Brain Research*, v.540, n.1-2, p.273-278. 1991.
- Sizonenko, S., E. Sirimanne, *et al.* Selective cortical alteration after hypoxic-ischemic injury in the very immature rat brain. *Pediatric Research*, v.54, n.2, p.263-269. 2003.
- Sofroniew, M. V.; Vinters, H. V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathology*, v. 119, n. 1, p. 7-35.2010.
- Spandou, E., Z. Papadopoulou, *et al.* Erythropoietin prevents long-term sensorimotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Research*, v.1045, n.1-2, p.22-30. 2005.
- Spolidoro, M. *et al.* Plasticity in the adult brain: lessons from the visual system. *Experimental Brain Research*, v. 192, n. 3, p. 335-341. 2009.
- Subbarao, k. v. Iron-dependent peroxidation of rat brain: a regional study. *Journal of Neuroscience Research*, v. 26, n. 2, p. 224-32.1990.
- Taft, J., R. Vertes, *et al.* Distribution of GFAP plus astrocytes in adult and neonatal rat brain. *International Journal of Neuroscience*, v.115, n.9, p.1333-1343. 2005.
- Theodosis, D., D. Poulain, *et al.* Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological Reviews*, v.88, n.3, p.983-1008. 2008.
- Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemical Behavioural*, v. 44, n. 2, p. 463-469. 1993.
- Van Praag, H., G. Kempermann, *et al.* Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, v.1, n.3, p.191-198. 2000.
- Vannucci, R., J. Connor, *et al.* Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Journal of Neuroscience Research*, v.55, n.2, p.158–163. 1999.
- Vannucci, R. E S. Vannucci. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Developmental Neuroscience*, v.27, n.2-4, p.81-86. 2005.
- Vannucci, R. C. E S. Vannucci. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Annals of New York Academy of Sciences*, v.835, p.234-249. 1997.
- Vannucci, S. E H. Hagberg. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *Journal of Experimental Biology*, v.207, n.18, p.3149-3154. 2004.
- Vincent, S. R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, v. 42, n. 1, p. 129-160. 1994.
- Viola, G., L. Rodrigues, *et al.* Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Research*, v.1274, p.47-54. 2009.

- Volterra, A. E. J. Meldolesi. Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, v.6, n.8, p.626-640. 2005.
- Yager, Y. Animal models of hypoxic–ischemic brain damage in the newborn. *Pediatric Neurology*., v.40, n.3, p.156-167. 2009.
- Zilles, K., F. Hajos, *et al.* Mapping of glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in the rat forebrain and mesencephalon by computerized image-analysis. *Journal of Comparative Neurology*, v.308, n.3, p.340-355. 1991.
- Ziv, Y. *et al.* Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, v. 103, n. 35, p. 13174-13179. 2006.
- Yahata, N. *et al.*, Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One*, v. 6, n. 9, p. 25788-25812. 2011.
- Yoon, B. H. *et al.* Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *American Journal of Obstetric and Gynecology*, v. 177, n. 1, p. 19-26. 1997.
- Young, R., J. Kolonich, *et al.* Behavioral performance of rats following neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke* v.17, p.1313-1316. 1986.
- Whalen, M. J. *et al.* Traumatic brain injury in mice deficient in poly-ADP(ribose) polymerase: a preliminary report. *Acta Neurochirurgica Supplement*, v. 76, p. 61-64. 2000.
- Wood, N. I. *et al.* Responses to environmental enrichment differ with sex and genotype in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*, v. 5, n. 2, p. 9077-9086. 2010.