

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Efeitos do extrato de *Huperzia quadrifariata* no modelo de
Hipóxia-Isquemia neonatal em ratos**

Felipe Kawa Odorcyk

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Porto Alegre, dezembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto por ter me aceito como orientando e sob a sua supervisão me permitir desenvolver este projeto de pesquisa.

Ao professor Eduardo Konrath que cedeu o extrato e a fisostigmina para a realização desse trabalho e que ajudou no delineamento do estudo.

À Prof. Carla Dalmaz que nos ajudou com os cálculos das doses e pela convivência no laboratório.

À Prof. Angela Wyse e suas alunas Janaína Kolling, Cassina Siebert e Aline Longoni do Laboratório 36 que conduziram os experimentos bioquímicos apresentados neste trabalho.

Não posso deixar de agradecer ao pessoal do laboratório 35 que me ajudou bastante, em especial os colegas Thamiris Delgado e Fabrício Nicola.

Esse trabalho, no entanto, não teria sido possível sem a participação ativa do Doutorando Eduardo Farias Sanches em todas as etapas do processo, estando sempre presente nas horas mais difíceis.

Muito obrigado a todos! Sem vocês este trabalho não teria sido possível.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Hipóxia-isquemia neonatal	8
1.2 Inibição da acetilcolinesterase e inflamação	11
2. OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Animais	16
3.2 Modelo Experimental	16
3.3 Desenho Experimental	17
3.3.1 Hipóxia-isquemia	18
3.3.2 Administração das substâncias	18
3.4 Desenvolvimento sensorio-motor	20
3.4.1 Geotaxia Negativa	20
3.4.2 Reflexo de Endireitamento Postural	20
3.4.3 Teste Olfatório	20
3.4.4 Teste do cilindro	20
3.5 Testes Cognitivos	21
3.5.1 Labirinto Aquático de Morris	21
3.5.3 Esquiva Inibitória	22
3.6 Análises bioquímicas	22
3.6.1 Atividade da butirilcolinesterase	22
3.6.2 Parâmetros de estresse oxidativo no baço	23
3.6.2.1 Medida da oxidação da 2'7'diclorofluoresceína (DCF)	23
3.6.2.2 Medida da Superóxido Dismutase (SOD)	24
3.6.2.3 Medida da Catalase (CAT)	24
3.6 Análise histológica	24
3.7 Análise Estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Pesos	26
4.2 Desenvolvimento sensorio-motor	27
4.3 Teste do Cilindro	28
4.4 Testes Cognitivos	29
4.4.1 Labirinto Aquático de Morris: memória de referência	29
4.4.2 Labirinto Aquático de Morris: memória de trabalho	30
4.4.3 Esquiva Inibitória	31
4.6 Análise Bioquímica	32
4.7 Análise Histológica	33
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES GERAIS	41
7. BIBLIOGRAFIA	42

LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1. Mecanismos fisiológicos causadores da lesão HI	11
2. Figura 2. Funcionamento da via colinérgica antiinflamatória..	12
3. Figura 3. Desenho experimental.....	17
4. Figura 4. Ganho de peso.....	26
5. Figura 5. Pesos.....	27
6. Figura 6. Desenvolvimento sensório-motor.....	28
7. Figura 7. Cilindro.....	29
8. Figura 8. Memória de referência.....	30
9. Figura 9. Memória de trabalho.....	31
10. Figura 10. Esquiva Inibitória.....	32
11. Figura 11. Atividade da BuchE.....	32
12. Figura 12. Parâmetros de estresse oxidativo.....	33
13. Figura 13. Áreas encefálicas.....	34
14. Figura 14. Imagens representativas dos encéfalos dos grupos experimentais.....	35

ABREVIATURAS

2VO: oclusão de dois vasos

Ach: Acetilcolina

AchE: Acetilcolinesterase

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Trifosfato de adenosina

BuchE: Butirilcolinesterase

CAT: Catalase

CREB: Proteína ligante ao elemento responsivo do AMPcíclico

DCF: 2'7'diclorofluoresceína

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPN: Dia pós-natal

DTNB: Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

H₂DCF: 2'7'-diclorofluoresceína

H₂DCF-DA: diacetato de diclorofluoresceína

HI: Hipóxia-isquemia

I.P.: Intra peritoneal

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno

PBS: Tampão fosfato-salino

SOD: Superóxido dismutase

TNF-alfa: Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) é quadro nosológico que faz parte da etiologia de diversas patologias neurológicas e causa de graves sequelas. Os mecanismos patofisiológicos dessa lesão começam com o insulto imediato após a HI e se estendem por dias ou semanas, sendo a resposta inflamatória parte importante no processo de lesão. A acetilcolina é um importante neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC) e parece ter uma importante ação neuroprotetora após a HI, uma vez que seu agonista carbacol provoca redução do volume da lesão, enquanto seus antagonistas a potencializam. A *Huperzia quadrifariata* é uma planta nativa do Rio Grande do Sul e seu extrato parece ter propriedades de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Inibidores da AChE vêm sendo usados para o tratamento de distúrbios neurológicos e sua ação positiva sobre a inibição da resposta inflamatória já foi demonstrada em uma planta chinesa de mesmo gênero, a *Huperzia serrata*.

Para testar os efeitos do extrato de *Huperzia quadrifariata* na HI perinatal, ratos Wistar no 7º dia de vida pós-natal (DPN7) foram submetidos à combinação da oclusão unilateral da artéria carótida direita e exposição a uma atmosfera hipóxica (8% de O₂) durante 60 minutos. Os animais foram divididos em 7 grupos: 3 grupos de controle cirúrgico (Sham, Sham+Veículo, Sham+Extrato); e 4 grupos lesão (HI, HI+Veículo, HI+Extrato e HI+Fisostigmina). Entre DPN7 e DPN10 foram aplicadas injeções intraperitoneais de salina nos grupos Sham e HI, de veículo, dimetilsulfóxido (DMSO) 20%, nos grupos +Veículo, de extrato (10 mg/kg dissolvidos em uma solução de DMSO 20%) nos grupos +Extrato e de fisostigmina (0,2 mg/kg dissolvidos em salina) no grupo HI+Fisostigmina.

No DPN11, 24 horas após a última dose, parâmetros do desenvolvimento sensório-motor foram testados nos reflexos de endireitamento, geotaxia negativa e reconhecimento olfatório. A partir do DPN30 foram realizados testes cognitivos, utilizando o labirinto aquático de Morris e esQUIVA inibitória, e motor (teste do cilindro). Os animais do grupo HI+Extrato tiveram desempenho significativamente melhor comparado aos demais grupos HI nas tarefas cognitivas, evidenciando uma proteção funcional ao insulto HI. No DPN45, os animais foram sacrificados e as amostras coletadas para as análises bioquímicas e histológicas. A atividade da BuchE (enzima responsável pela degradação da AChE - medida indireta da presença de acetilcolina) no soro revelou que a lesão reduz a atividade dessa enzima e esse efeito é revertido pelo extrato. A análise de parâmetros do estresse oxidativo no baço evidenciou um aumento deles nos animais HI, e tal aumento foi revertido pela administração do extrato. A análise da área da lesão mostrou a propriedade neuroprotetora morfológica do extrato sobre a área hemisférica total e hipocampal. A partir destes resultados é possível observar, sob diferentes parâmetros, a ação benéfica desse extrato sobre a HI neonatal representando uma interessante e pouco estudada abordagem terapêutica no tratamento dessa patologia.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia (HI), *Huperzia quadrifariata*, acetilcolina (ACh), inflamação, neuroproteção e memória.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Hipóxia-isquemia neonatal (HI)

A HI é uma importante causa de dano encefálico ocorrido durante o desenvolvimento de recém-nascidos. Ela pode levar a óbito ou gerar incapacidade neurológica em variados graus que vão desde comprometimentos leves (como alterações do tônus muscular) a danos cognitivos severos (como os observados nos casos graves de paralisia cerebral) (Volpe, 2008). A HI é considerada uma das principais etiologias de paralisia cerebral, epilepsia, autismo, déficit de atenção e dos transtornos de aprendizagem, além de acarretar deficiências cognitivas e intelectuais nos indivíduos acometidos (Volpe, 2009; Huang et al., 2009).

Disfunções circulatórias e/ou complicações obstétricas como a hipóxia materna, o descolamento prematuro da placenta e a compressão do cordão umbilical podem interferir na transferência de substratos e levar à asfixia fetal, causando a hipóxia-isquemia neonatal (Volpe, 2009; Ferriero, 2004; Jensen, 2005; Berger & Garnier, 1999). Complicações sistêmicas da asfixia neonatal frequentemente ocorrem e incluem alterações cardiovasculares, respiratórias, metabólicas e renais, sendo, no entanto, o SNC a estrutura mais comprometida (Vanucci & Perlman, 1997).

O modelo experimental de hipóxia-isquemia perinatal desenvolvido em roedores, combina a ligação unilateral de uma das artérias carótidas comuns à posterior exposição dos animais a um período variável de hipóxia, visando mimetizar a combinação de hipoxemia e isquemia encontrada em neonatos humanos após um quadro de asfixia (Rice et al., 1981). A soma da isquemia com a hipóxia causa danos localizados predominantemente no hemisfério ipsilateral à carótida ocluída, sendo o hemisfério contralateral afetado em menor grau ou mesmo não afetado morfológicamente (Rice et al., 1981; Jansen & Low, 1996). O modelo de HI perinatal é realizado no sétimo dia após o nascimento e causa lesões no córtex cerebral,

substância branca periventricular e subcortical, estriado (núcleos da base) e hipocampo (Arteni et al., 2010; Pereira et al., 2007; Hossain, 2005; Vanucci & Vanucci, 2005). Dados prévios de nosso grupo evidenciam que lesões em tais estruturas após a HI causam danos bioquímicos tais como aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e diminuição das defesas antioxidantes (Dafre et al. 2003). Essa lesão causa também danos histológicos em regiões responsáveis por controlar diversos processos cognitivos como de memória espacial, aversiva e de trabalho (Arteni et al., 2010; Pereira et al., 2007).

A HI é decorrente de uma diminuição da oferta de oxigênio e glicose aos tecidos. Inicialmente ocorre uma hipoxemia seguida de acidemia, o que por sua vez, gera perturbações nos fatores que regulam a circulação fetal provocando hipotensão e consequente isquemia. (Berger & Garnier, 1999; Engidawork et al., 1997). O dano cerebral causado pela hipóxia-isquemia é um processo evolutivo, que se inicia durante o insulto e estende-se no período de recuperação após a ressuscitação (lesão por reperfusão). Com a diminuição do fluxo sanguíneo, a atividade neuronal é imediatamente afetada e conforme o dano isquêmico progride, a atividade metabólica necessária para a manutenção da integridade funcional das células nervosas diminui (Hossmann, 1998). Este processo pode levar a um dano encefálico através da ativação de mecanismos excitotóxicos e apoptóticos, causadores de dano e morte celular (Portera-Cailliau et al., 1997; Barks & Silverstein, 1992).

O déficit energético decorrente da HI leva a uma alteração no metabolismo celular, com excessiva liberação de neurotransmissores excitatórios (ocasionando excitotoxicidade glutamatérgica) e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio. Como a falência energética altera o funcionamento das enzimas antioxidantes, ocorrendo o que se denomina estresse oxidativo.

Na fase de isquemia ocorre inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e à queda da produção de trifosfato de adenosina (ATP) devido à falta de aporte sanguíneo provocando

falência nos mecanismos de manutenção dos potenciais da membrana (Erecinska et al., 1994). Como a glicólise anaeróbica é insuficiente para manter a produção de ATP, não há energia para manter as funções cerebrais, ocorrendo desativação das bombas iônicas, despolarização das membranas e abertura dos canais iônicos dependentes de voltagem (Dugan et al., 1999). Mecanismos celulares responsáveis pela lesão hipóxico-isquêmica também envolvem a ativação de caspases (em particular a caspase-3), uma família de enzimas ativadas durante o episódio hipóxico e que atua dando início e executando a apoptose neuronal (Rossiter et al., 2002; Low et al., 2002). O dano celular pode ser agravado pela ativação (em resposta ao dano inicial) de citocinas e consequente infiltração e ativação de células inflamatórias (McLean et al., 2004; Mishra et al., 1999).

É bem descrito na literatura que eventos que provocam estresse ao sistema nervoso, assim como a HI, causam uma alteração na atividade do sistema imune (Neveu et al., 2008). A ativação da resposta imune é um dos fatores mais importantes que determinam a gravidade de lesões, sendo mais severas as sequelas quanto maior for a resposta imune (Jin et al., 2009).

A resposta imune no sistema nervoso central é mediada principalmente por células gliais, como astrócitos e microglia, atuando como sensores intrínsecos, reagindo a insultos de forma rápida e efetiva, principalmente pela liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Figura 1) (Zhao et al., 2013). Altos níveis dessas citocinas e quimiocinas provocam uma mobilização de células do sistema imune em todo o organismo, principalmente no baço, como células T e NK ocasionando aumento da morte de células nervosas (Fathali et al., 2013).

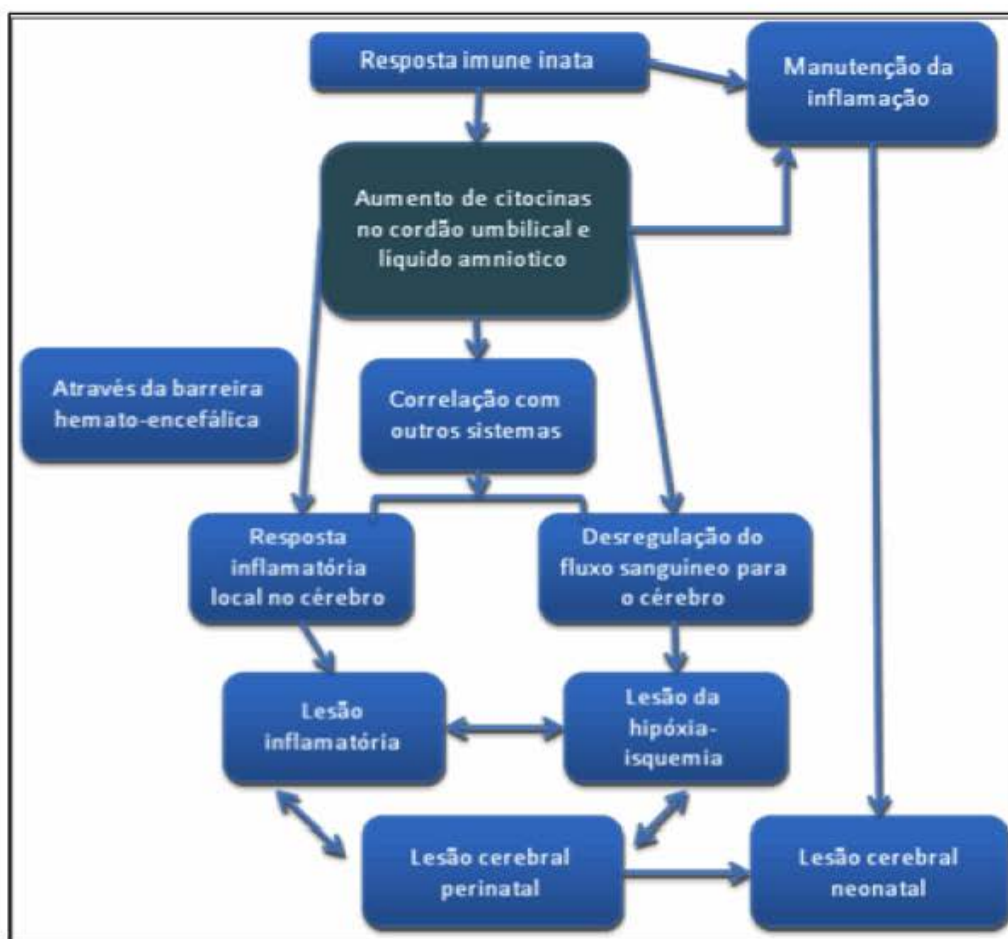


Figura 1. Mecanismos fisiológicos causadores da lesão HI (adaptado de Zhao et al., 2013).

1.2 Inibição da acetilcolinesterase e inflamação

Neurônios da via colinérgica estão amplamente distribuídos pelo sistema nervoso e possuem comprovada importância em diversas funções centrais, tais como: aprendizado e memória, controle motor, controle do fluxo sanguíneo encefálico e na regulação de crescimento e diferenciação de neurônios no sistema nervoso central (Wang et al., 2010; Okada et al., 2013)

A acetilcolina (ACh) possui uma importante função na regulação da ativação do sistema imune utilizando a via colinérgica antiinflamatória (Kutsuna et al. 2010). Essa via se utiliza do nervo vago e inerva diversas estruturas imunes importantes, como o baço. Este, quando estimulado pelo nervo vago, através do gânglio esplênico com sinalização colinérgica,

provoca liberação de noradrenalina pelo nervo esplênico. Algumas das células T presentes no baço podem sintetizar e liberar Ach quando estimuladas pela noradrenalina. A Ach liberada liga-se a receptores nicotínicos alfa-7 presentes em células imunes como mastócitos e microglia. Uma vez que a Ach liga-se a esse receptor, a adenilato ciclase é ativada produzindo AMP cíclico, esse ativa cinases que irão ativar o fator de transcrição CREB que transcreverá proteínas que vão inibir a síntese de citocinas, como o TNF-alfa (Andersson et al., 2012; Tracey et al., 2002). Um resumo do mecanismo de inibição está ilustrado na Figura 2.

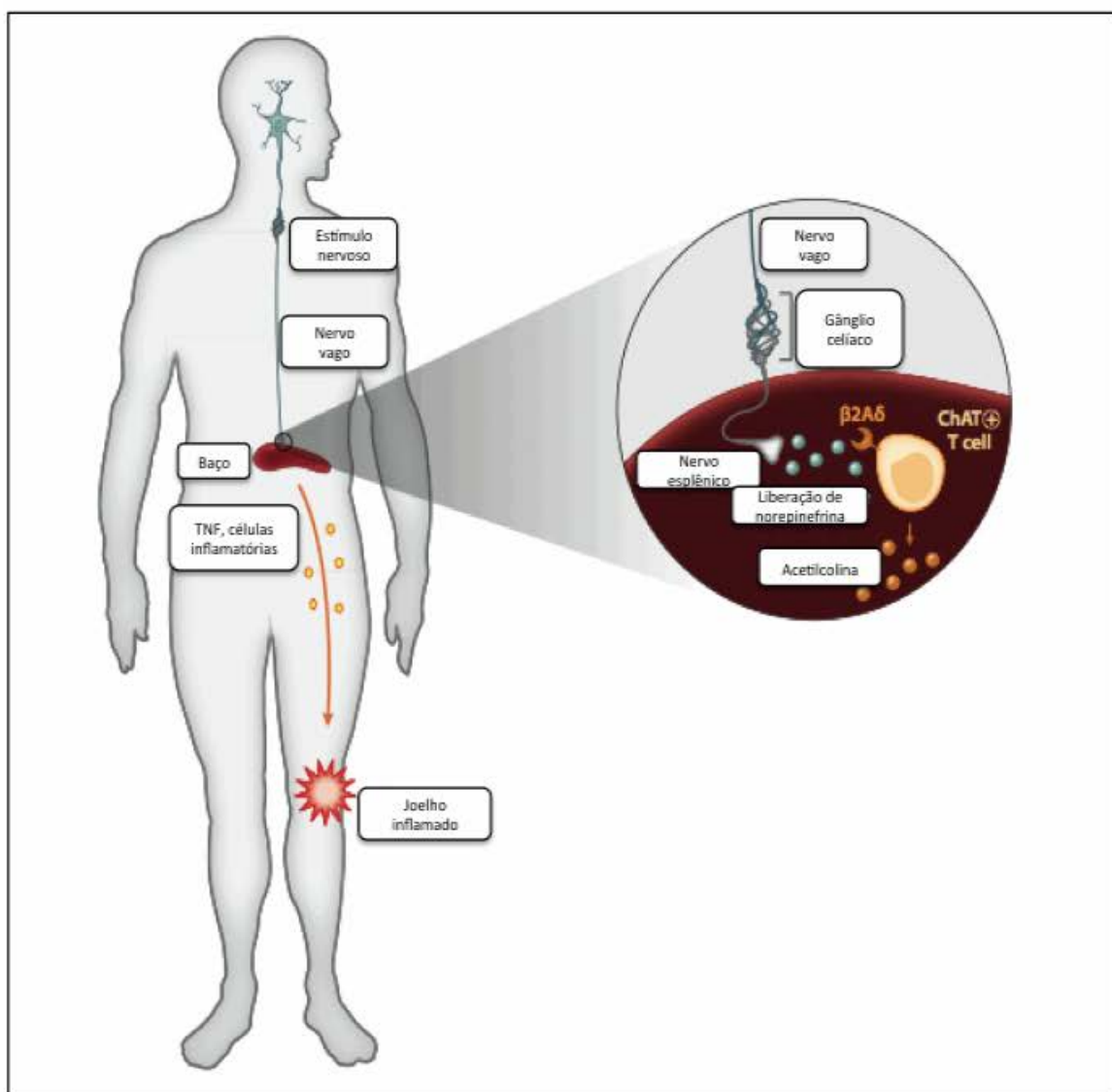


Figura 2. Funcionamento da via colinérgica anti-inflamatória (adaptado de Anderson et al., 2012).

Uma enzima de grande importância no sistema colinérgico é a acetilcolinesterase (AChE), que hidrolisa a Ach ocasionando sua inativação, e controla a transmissão colinérgica regulando a concentração deste neurotransmissor (Soreq et al., 2001). Inibidores de AChE são usados no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (Schwarz et al., 2012). Inibidores dessa enzima, como a Huperzina A (substância extraída da planta chinesa *Huperzia serrata*) também reduzem significativamente a resposta imune, inibindo a ativação de astrócitos e células microgлияis, além de suprimir a secreção de TNF-alfa e reduzir a fosforilação das MAPKs no modelo de oclusão de dois vasos (2VO) (Wang et al., 2010) e atenuam os déficits cognitivos e a lesão encefálica após a HI (Wang et al., 2002).

Kutsuna e colaboradores em 2010 demonstraram que a fisostigmina (conhecido inibidor da AChE) reduziu o estresse oxidativo, a inflamação e o dano nas células endoteliais no encéfalo de ratos submetidos a um modelo de isquemia/reperfusão. Neste sentido, no modelo de hipóxia-isquemia neonatal já foi demonstrado que agonistas da ACh reduzem significativamente o volume da lesão, além de reduzir o acúmulo de células microgлияis no local (Furakawa et al., 2011), da mesma forma que antagonistas da ACh aumentam a lesão causada pela HI (Furakawa et al., 2013).

Logo após a HI os níveis de AChE apresentam uma pequena redução, porém 72 horas pós-lesão há um grande aumento na expressão dessa enzima, retornando a níveis basais dentro de 8 dias (Pimentel et al. 2013). Esse aumento na expressão de AChE levaria a uma redução nos níveis de Ach, inibindo o sistema colinérgico anti-inflamatório o que aumentaria a resposta imune.

Konrath e colaboradores (2012) realizaram testes *in vivo* com extratos de plantas nativas do RS que demonstraram ser inibidoras da AChE. Nesse estudo, foi o extrato de alcalóides da planta *Huperzia quadrifariata* mostrou ser um potente inibidor dessa enzima, inibindo em 50% da atividade da AChE no córtex e em aproximadamente 30% no hipocampo.

Esse extrato, embora obtido de uma planta pertencente ao mesmo gênero da qual se obtém a Huperzina A, não possui essa substância, o que sugere que outros alcalóides produzem o efeito inibidor da AchE (Konrath et al., 2013).

Tendo em vista o potencial neuroprotetor dos inibidores da AchE sobre lesões no sistema nervoso central, hipotetizamos que o extrato da *Huperzia quadrifariata* seja capaz de promover neuroproteção após a lesão hipóxico-isquêmica reduzindo os déficits cognitivo-motores e o dano histológico causados pela HI.

2.OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos do extrato de *Huperzia quadrifariata* no modelo experimental de HI perinatal em ratos sobre parâmetros bioquímicos, comportamentais e histológicos.

2.2 Específicos

- 1) Avaliar o desenvolvimento sensório-motor através dos testes de geotaxia negativa, endireitamento e reconhecimento olfatório aos 11 dias de vida (DPN11). A partir dos 30 dias, o déficit motor foi analisado pelo teste do cilindro, a memória espacial pelo labirinto aquático de Morris e a memória aversiva através do teste da esQUIVA inibitória.
- 2) Ao final dos testes comportamentais (DPN45), avaliar o efeito neuroprotetor do extrato sobre a área da lesão HI através da técnica de hematoxilina-eosina no encéfalo dos animais.
- 3) Avaliar a atividade da butirilcolinaesterase (BuChE) no soro e parâmetros de estresse oxidativo (formação de espécies reativas de oxigênio e atividade das enzimas anti-oxidantes SOD e CAT) no baço aos 45 dias de vida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas 6 ratas fêmeas Wistar prenhas de cujas ninhadas foram obtidos os animais a serem utilizados no experimento. As ratas-mães tinham idade superior a 90 dias e foram obtidas no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. As fêmeas foram mantidas em caixas isoladas (a partir do 19º dia gestacional) até o momento do parto. As proles de ambos os sexos destas fêmeas foram utilizadas em número máximo de 12 por ninhada (procedimento realizado no DPN1). Os animais excedentes foram separados das ninhadas, anestesiados com halotano e decapitados. O desmame dos animais foi realizado aos 21 dias e os animais foram divididos de acordo com o sexo e mantidos em um número de 4 a 5 animais por caixa. Todos os animais foram mantidos em ciclos claro e escuro de 12h em salas climatizadas ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS com alimentação e água *ad libitum* durante todas as etapas do projeto. Os procedimentos foram realizados de acordo com *Principles of Laboratory Animal Care* (NIH publication 85-23, 1985), com aprovação nº 25807 do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade.

3.2 Modelo Experimental

Os animais foram divididos em 7 grupos: 3 grupos controle cirúrgico (Sham (n=5), Sham+Veículo (n=5), Sham+Extrato (n=5)) e 4 grupos com lesão, HI (n=8), HI+Veículo(n=11), HI+Extrato (n=10) e HI+Fisostigmina (n=6). Entre o DPN7 e 10 foram aplicadas injeções intraperitoneais (i.p) de salina para os grupos Sham e HI, de veículo, dimetilsulfóxido (DMSO) 20%, nos grupos +Veículo, de extrato no grupo HI+Extrato e de Fisostigmina no grupo HI+Fisostigmina.

3.3 Desenho Experimental

Após a realização da HI (DPN7) os animais foram pesados e tratados diariamente até DPN11. Neste dia foram realizados testes para detectar alterações sensório-motoras causadas pela HI. A partir do DPN30 foram realizados os testes do cilindro, do labirinto aquático de Morris e da esQUIVA inibitória. No DPN45 (após os testes comportamentais), os animais foram anestesiados com halotano e tiveram amostras sanguíneas coletadas (correspondentes a 6% do peso corporal de cada animal) por punção cardíaca para testar a atividade da enzima butirilcolinesterase no soro e sofreram eutanásia a fim de coletar amostras para a análise histológica da área da lesão encefálica.

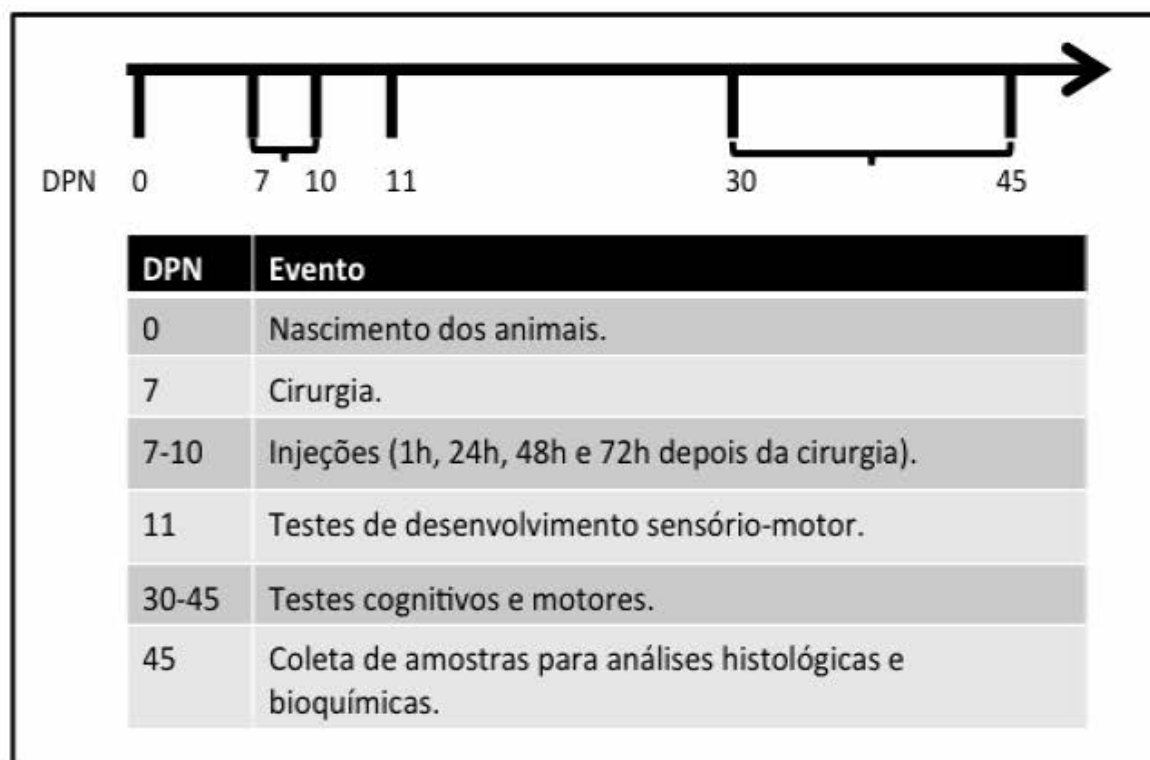


Figura 3. Esquema do desenho experimental indicando os dias contados após o nascimento (DPN0) e os procedimentos a serem realizados.

3.3.1 Hipóxia-isquemia

Aos 7 dias de vida (DPN7), os animais foram anestesiados com halotano 4% e submetidos ao procedimento cirúrgico de oclusão carotídea, com duração máxima de 10 minutos por animal. O animal foi anestesiado e posicionado em decúbito dorsal. O procedimento se iniciou através de uma incisão na linha média da face anterior da região cervical, sendo então a artéria carótida comum direita identificada, isolada das estruturas adjacentes e ocluída com fio cirúrgico de seda 4.0 (isquemia). Os animais receberam aplicação tópica de lidocaína 10% (Xilocaína®) após a oclusão da carótida. Os animais do grupo Sham (controle cirúrgico) foram anestesiados, foi feita a incisão tiveram a carótida exposta, porém sem oclusão e não sofreram hipóxia. Ao final deste procedimento, os animais permaneceram aquecidos durante um período de recuperação de 15 minutos antes de serem devolvidos às caixas moradia, onde permaneceram por um intervalo de 2 horas junto às mães. Por fim, foram gentilmente colocados em uma câmara (1500 ml) e expostos a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio e 92% de nitrogênio, com fluxo de 5 L/min.) durante 60 minutos em grupos de quatro a seis animais. A câmara de hipóxia permanece parcialmente submersa em banho-maria a 37°C a fim de manter a temperatura corporal dos ratos lactentes dentro dos limites fisiológicos. Ao final da hipóxia, os animais são retirados da câmara, permanecendo durante 15 minutos sob aquecimento para recuperação e posteriormente devolvidos à caixa de origem junto às mães (Arteni et al., 2003).

3.3.2 Administração das substâncias

O extrato de alcalóides da *Huperzia quadrifariata* utilizado nesse trabalho foi cedido pelo professor Eduardo Konrath (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio

Grande do Sul), sendo a obtenção e caracterização descritas pelo mesmo (Konrath et al. 2012). Os fármacos foram administrados por injeções i.p em 4 tempos distintos: 1h, 24h, 48h e 72h após a HI. O extrato foi administrado na dose de 10mg/kg dissolvido em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 20% (Konrath et al., 2012) nos grupos Sham+Extrato e HI+Extrato. O veículo (DMSO) 20% foi administrado da mesma forma nos grupos Sham+Veículo e HI+Veículo. A fisostigmina (0,2 mg/kg) foi dissolvida em solução salina e administrada no grupo HI+Fisostigmina. Nos grupos Sham e HI foi feita a injeção de solução salina.

O extrato foi obtido das partes aéreas da planta após terem sido moídas e ressecadas. A parte remanescente do material foi extraída com etanol pelo mesmo procedimento, até o fluido ficar negativo ao reagente de Dragendorff. Os extratos de etanol foram concentrados por vácuo; os resíduos secos foram suspensos em uma solução 5% de HCl e lavados com CH₂Cl₂. As camadas aquosas obtidas foram basificadas com NH₄OH (pH11) e particionadas com CH₂Cl₂, formando, depois de filtragem com Na₂SO₄, um extrato cru de alcalóides. Após isso, o extrato foi submetido à análise de espectroscopia de massa utilizando o aparelho Perkin-Elmer Qmass-910 com colunas capilarizadas SE 30 de 30m de comprimento para verificar a composição química. O volume de injeção foi de 0,5 µl utilizando He como carreador, com taxa de fluxo de 1 ml/min. O programa de temperatura foi: 140°C (3 min), 140–250 °C at 5°C/min, 250°C (5 min), 250–280°C at 5°C/min, 280°C (5 min). As temperaturas do injetor, interface e fonte foram de: 300, 280 e 280°C respectivamente. A energia de ionização foi de 70 eV e a identificação dos alcalóides individuais foi feita pela comparação dos padrões de quebra encontrados na literatura e pelo banco de dados de alcalóides isolados de *Lycopodium* próprio (MacLean 1963; Alam et al. 1964; Sun et al. 1993; Ortega et al. 2004).

3.4 Desenvolvimento sensório-motor

3.4.1 Geotaxia Negativa: O animal foi submetido a um plano inclinado 30° com relação ao solo a face virada em direção a ele. A reação esperada é que o animal adote uma posição contrária, ou seja, vire-se 180° e adote a direção cefálica contrária ao solo. Mede-se a latência deste comportamento num tempo máximo de 60 segundos (Kunko et al., 1996).

3.4.2 Reflexo de Endireitamento Postural: O animal é colocado em decúbito ventral em uma superfície, onde logo após, sua cauda é torcida pra que ele assuma a posição de decúbito dorsal. É medida a latência do animal para voltar à postura original, sendo estabelecido um tempo máximo de 15 segundos (Sanches et al., 2012; Kunko et al., 1996).

3.4.3 Teste Olfatório: O teste é realizado em uma caixa acrílica retangular transparente, onde em um dos lados há maravalha da caixa-moradia e do outro, maravalha limpa. O teste visa avaliar a capacidade do animal em identificar, pela olfação a maravalha da sua caixa-moradia. O tempo máximo destinado ao teste foi de 180 segundos (Favero et al., 2006).

3.4.4 Teste do cilindro: Após o DPN30 os animais foram colocados no interior de um cilindro de plexiglass (20 cm de diâmetro x 40 cm de altura) situado sobre uma mesa de vidro e filmados pelo ângulo inferior com um espelho angulado que permita a visão das suas 4 patas. A atividade espontânea de contatos com as patas dianteiras na parede do cilindro foram gravadas durante 4 minutos e o número de toques com as patas representado pela fórmula ((número de contatos ipsilateral à lesão/número total de toques) x 100) (Sanches et al., 2013b).

3.5 Testes Cognitivos

Para avaliar a capacidade cognitiva dos animais os seguintes testes foram realizados:

3.5.1 Labirinto Aquático de Morris

A partir dos 30 dias de vida foi avaliada a memória espacial dos animais utilizando-se o labirinto aquático de Morris. O labirinto consiste de um tanque circular de 200cm de diâmetro, sendo 40cm de profundidade cobertos por água (temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$), situada em uma sala contendo pistas visuais nas paredes que o cercam. Uma plataforma com 10cm de diâmetro encontra-se submersa 2cm abaixo da superfície da água. Esta piscina é dividida, virtualmente, em 4 quadrantes e possui 4 pontos de partida para o teste, designados como N (norte), S (sul), L (leste) e O (oeste).

Para a avaliação da memória, foram utilizados 2 protocolos distintos, descritos abaixo:

3.5.1.1 Protocolo de Memória de Referência

Neste protocolo, a posição da plataforma permanece no mesmo local durante todo o período de treino. Os animais realizaram 4 “trials” por dia, durante 5 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a fase de treino será realizado o teste, em uma sessão de 60 segundos sem a plataforma, para avaliar a memória de longa duração para a posição da plataforma. No dia do teste (probe trial) os animais são colocados individualmente no labirinto em um mesmo ponto, o mais longe possível da posição da plataforma. Foram analisados: Curva de aprendizado e tempo de latência para encontrar a plataforma no dia do teste (Sanches et al., 2013a). Os animais foram filmados e os dados registrados pelo software ANY-MAZE.

3.5.1.2 Protocolo de Memória de Trabalho

Neste protocolo, foram realizadas 4 sessões por dia, com 5 minutos de intervalo entre elas, com uma diferente posição da plataforma durante os 4 dias. A memória de trabalho foi

avaliada pela diferença das latências de cada animal entre os dois primeiros trials nos quatro dias (Sanches et al., 2013a; Arteni et al., 2010).

3.5.3 Esquiva Inibitória

Os animais foram submetidos a uma caixa onde há uma plataforma elevada e outra região onde há grades de barras de bronze que permitem a aplicação de um choque elétrico (50x25x25)cm. O animal é gentilmente colocado na plataforma e, ao descer dela e encostar as 4 patas na grade, o animal recebeu um choque de 0,5 mA/2s. A latência de descida da plataforma foi anotada na sessão de treino. Após 3h (memória de curta duração) e 24 horas (longa duração), a retenção foi avaliada, em que a latência de descida da plataforma foi tomada como índice de memória (Sanches et al., 2013b). O tempo limite do teste para descida da plataforma foi de 180 segundos.

3.6 Análises bioquímicas

Para a realização das análises bioquímicas (aos 45 dias), os animais foram anestesiados e as amostras sanguíneas coletadas e armazenadas em eppendorfs a -80°C até a análise.

3.6.1 Atividade da butirilcolinesterase

A butirilcolinesterase (BuChE) cataliza a hidrólise de Ach, sendo importante na regulação do sistema colinérgico. A atividade dessa enzima é um indicativo do funcionamento do sistema colinérgico. O sangue foi coletado por punção cardíaca após anestesia por inalação de halotano. Após a retirada, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm a 4°C por 10 minutos para a obtenção do soro. Para determinar a taxa de hidrólise pela BuChE no plasma foi utilizado o método descrito por Ellman e colaboradores (1961). Essa taxa é medida numa

solução contendo 0,8mM de acetiltioclonia em 1 mL de solução com 100mM de tampão de fosfato de potássio pH 7,5 e 1mM de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB). 50 µl de plasma são adicionados à mistura e pré-incubados por 3 minutos. A hidrólise é medida pela formação do diânion de tiolato (DTNB) a 412nm por 2 minutos a 25°C. A atividade específica da enzima está expressa em mmol de acetilcolina hidrolizada por hora por miligrama de proteína (Ribas et al., 2012).

3.6.2 Parâmetros de estresse oxidativo no baço

O baço foi homogeneizado: (1:10, p/v) em 20 mM PBS, pH 7.4 contendo 140 mM KCl. Após, o material foi centrifugado a 800xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi novamente diluído no mesmo tampão e estocado até as análises bioquímicas.

3.6.2.1 Medida da oxidação da 2'7'diclorofluoresceína (DCF)

A produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada de acordo com Lebel e colaboradores (1990). O método se baseia na oxidação da 2'7'-diclorofluoresceína (H₂DCF). 60 µL da amostra foram incubados em uma solução contendo 240 µL de 100 µM 2'7'-diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCF-DA) por 30 minutos a 37 °C no escuro em uma placa de 96 poços. O H₂DCF-DA é clivado por esterases celulares e o H₂DCF resultante é por vezes oxidada por espécies reativas de oxigênio presentes nas amostras. A última reação produz um composto fluorescente que é medido a 488 nm de excitação e 525 nm de emissão, sendo os resultados expressos como nmol DCF/mg de proteína. A curva de calibração foi realizada com DCF purificado como padrão.

3.6.2.2 Medida da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida usando o leitor de microplacas SpectraMax M5/M5 (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California, USA). Esse método de análise da atividade da SOD é baseado na capacidade do pirogalol se auto-oxidar, um processo altamente dependente de superóxido, que é substrato para a SOD. A inibição da auto-oxidação desse composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode ser medida indiretamente a 420 nm, usando espectrofotômetro de dupla emissão à temperatura ambiente (Marklund, 1985). A curva de calibração foi realizada com SOD purificada como padrão, a fim de calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma inibição de 50% da auto-oxidação do pirogalol é definida como uma (01) unidade de SOD e a atividade específica está representada como unidades/mg de proteína.

3.6.2.3 Medida da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida usando leitor de microplacas SpectraMax M5/M5 (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California, USA). O método usado é baseado no consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 240 nm em um meio de reação contendo 20 mM de H_2O_2 , 0.1% de Triton X-100, 10 mM de PBS pH 7,0, e entre 0,1-0,3 mg de proteína/mL (Aebi, 1984). Uma (01) unidade de CAT é definida como um mmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades/mg de proteína.

3.6 Análise histológica

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uma dose letal de tiopental sódico na dose de 100mg/kg de massa corporal por via intraperitoneal, submetidos à

perfusão transcardíaca com solução salina (0,9%) seguida de uma solução de paraformaldeído (4%). Os encéfalos foram removidos, pesados e mantidos na mesma solução de paraformaldeído por 4 horas. Após, foram crioprottegidos com soluções de concentrações crescentes de sacarose 15% e 30%. A análise da área foi realizada no Bregma -3,80 mm, onde foram medidas as áreas do hemisfério total, estriado e hipocampo ipsi e contralaterais à lesão. As imagens das áreas foram capturadas com uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio (Nikon) utilizando-se o software Image-J.

3.7 Análise Estatística

Foi verificada a normalidade dos resultados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para fins estatísticos, nos testes comportamentais, os animais dos grupos Sham, Sham+Extrato e Sham+Veículo foram analisados conjuntamente, uma vez que não apresentaram diferenças estatísticas significativas nos testes realizados. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do *post hoc* de Duncan para múltiplas comparações. Quando necessário (memória de trabalho no labirinto aquático de Morris e análise histológica, foi usado teste *t* pareado). Os dados não-paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney e/ou de Wilcoxon. A significância aceita foi de $p < 0,05$ e os testes foram realizados utilizando o programa SPSS versão 19.0.

4.RESULTADOS

4.1 Pesos

A ANOVA de medidas repetidas das pesagens feitas diariamente a partir do dia da HI (entre os DPN7 e 11) revelou uma interação entre o ganho de peso dos animais dos diferentes grupos e os dias das pesagens ($F(4,55)=3,98$, $p<0,05$). Foram realizadas ANOVAs para cada um dos dias, onde diferenças significativas foram encontradas no DPN10 ($F(4,59)=4,54$, $p<0,05$) e PND11 ($F(4,54)=4,83$, $p<0,05$) onde o grupo HI+extrato teve um ganho de peso inferior comparado aos demais grupos (Figura 4). No entanto, esse efeito não se manteve após cessar a administração do extrato no DPN45, não havendo diferença significativa entre o peso corporal dos animais nos diferentes grupos (Figura 5).

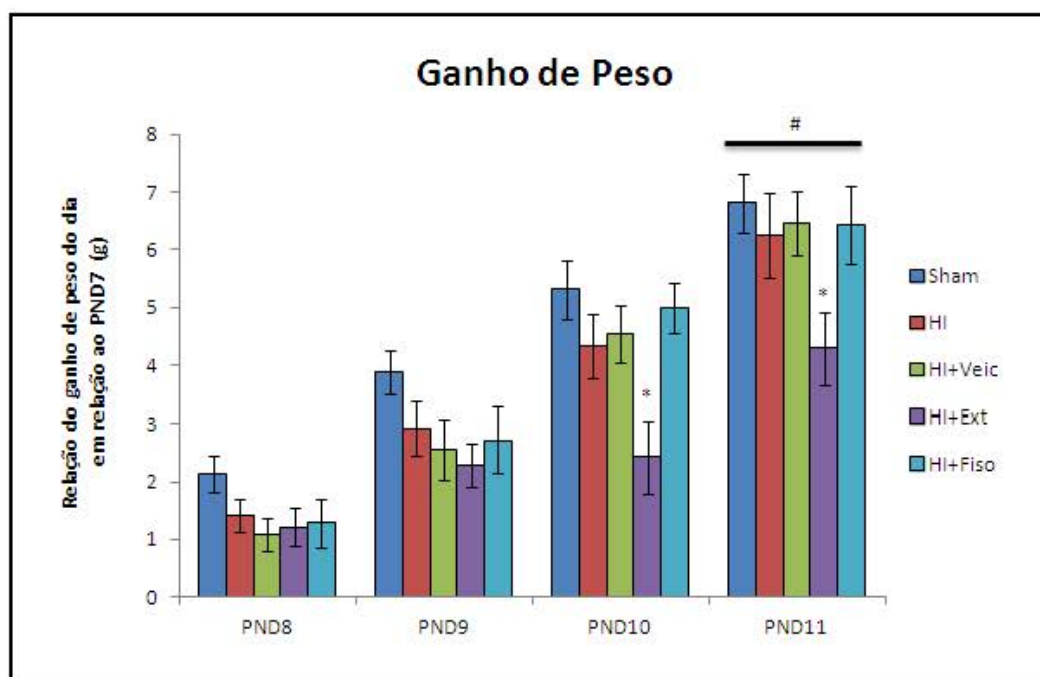


Figura 4. Ganho de peso. Os dados estão expressos como peso(g) \pm EP ganhos em relação ao dia da cirurgia (DPN7). n=7-13 animais por grupo. * ANOVA de medidas repetidas. Interação entre grupo e dia de pesagem. #Diferente dos demais grupos.

Não houve diferença significativa entre o peso corporal total e encefálico dos animais aos 45 dias. Já o peso do baço se mostrou reduzido nos animais dos grupos HI ($F(4,49)=2,60$, $p<0,05$) (Figura 5c).

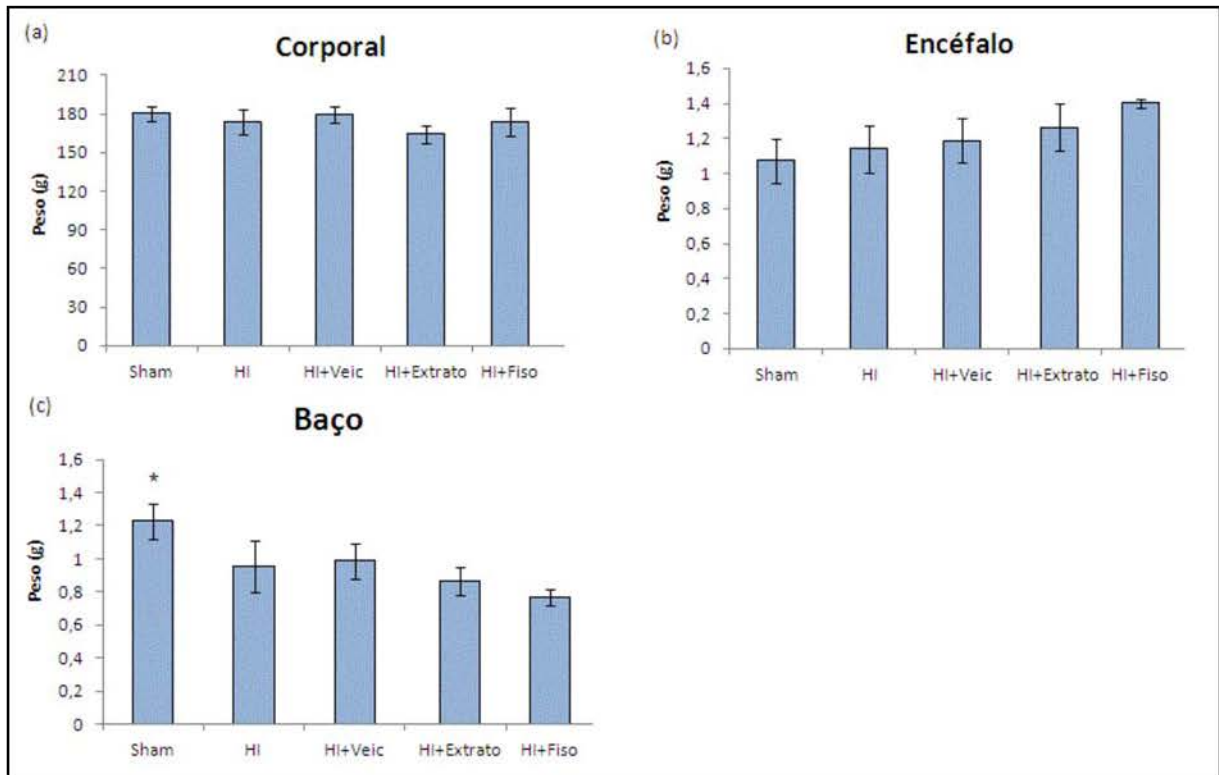


Figura 5. Peso corporal (a), do baço (b) e do encéfalo (c) dos animais aos 45 dias de vida. Os dados estão expressos como média \pm EP do peso (g). $n=7-13$ animais por grupo. * Diferente dos grupos HI.

4.2 Desenvolvimento sensório-motor

No teste do endireitamento a ANOVA evidenciou que os animais do grupo HI+Fisostigmina e HI apresentaram um desempenho pior na tarefa comparado aos demais grupos ($F(4,58)=2,91$, $p<0,05$) (Figura 6b). Os animais do grupo HI+Extrato novamente tiveram latências similares aos do grupo Sham comparados aos demais grupos HI, mostrando o efeito protetor do extrato sob o déficit motor na tarefa causado pela HI. Não foram

encontradas diferenças significativas entre os grupos nos testes de geotaxia negativa (Figura 6a) e reconhecimento olfatório (Figura 6c).

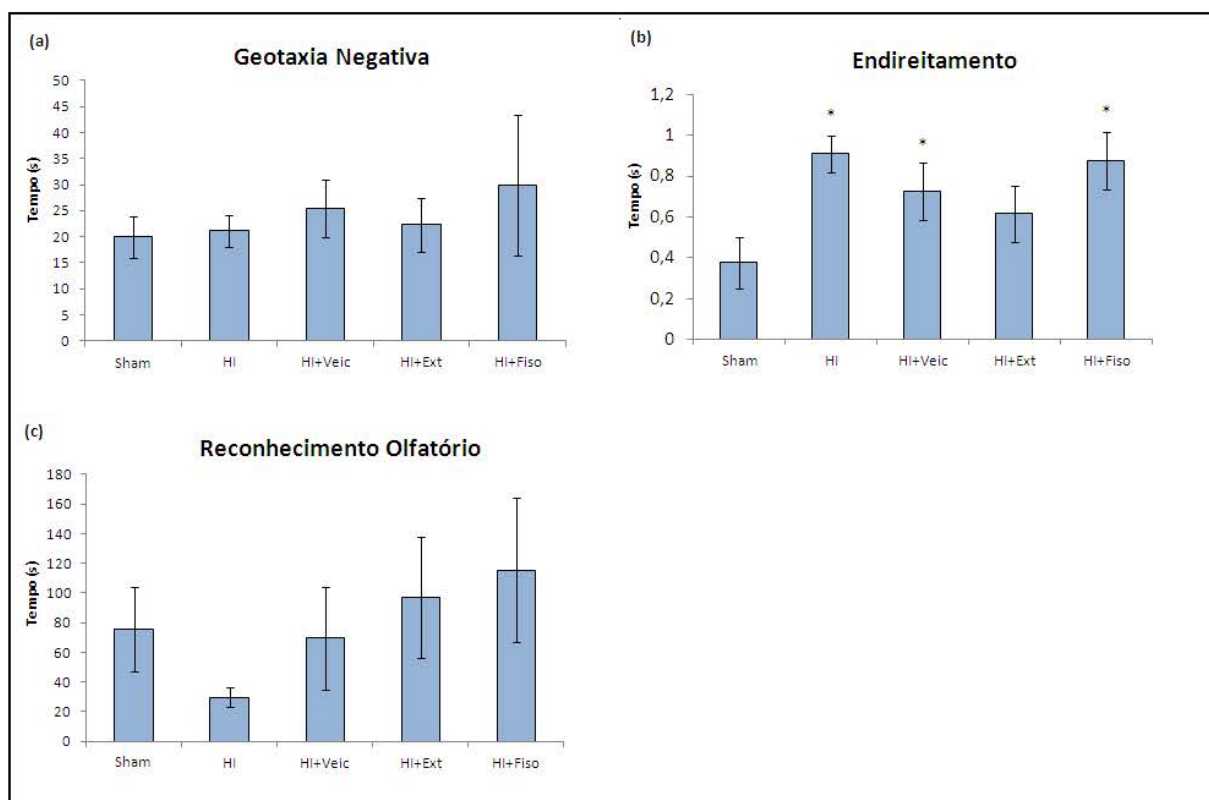


Figura 6. Desenvolvimento sensorio-motor. Os dados estão expressos como média \pm EP do tempo para realizar os testes de (a) Geotaxia Negativa, (b) Endireitamento, (c) Reconhecimento olfatório. $n=7-13$ animais por grupo. *Diferente do Sham, ($p<0,05$).

4.3 Teste do Cilindro

Após o PND30, a comparação entre o percentual de toques com as patas dianteiras ipsilaterais e contralaterais à lesão não evidenciou diferenças significativas entre os grupos experimentais como esperado nos grupos HI, havendo apenas uma tendência ($p=0,06$) do grupo HI+Fisostigmina a usar com maior frequência a pata contralateral à lesão (Figura 7).

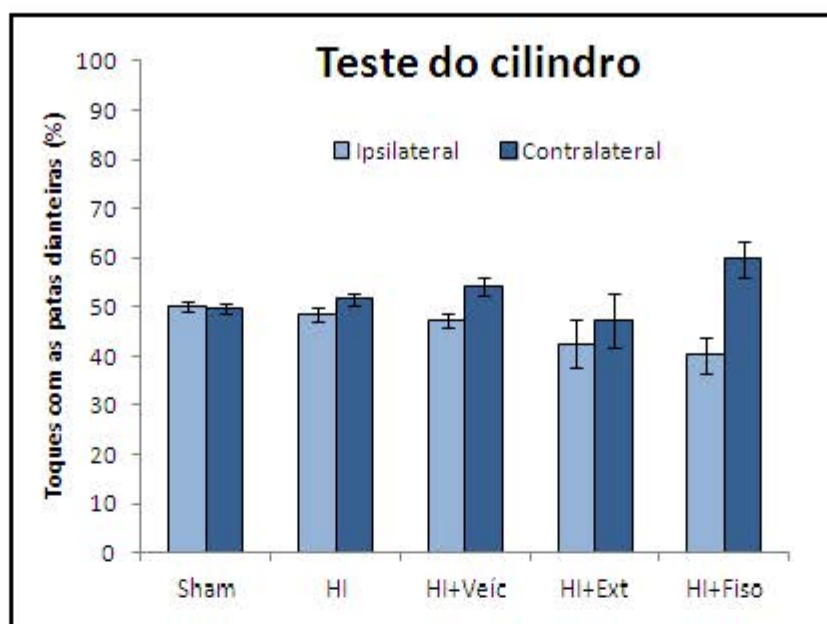


Figura 7. Teste do cilindro. As colunas representam a porcentagem de toques feitos com as patas ipsilaterais (coluna à esquerda) e contralaterais (coluna à direita) nas paredes do cilindro. $n=7-13$ animais por grupo ($p<0,05$).

4.4 Testes Cognitivos

4.4.1 Labirinto Aquático de Morris: memória de referência

A ANOVA de medidas repetidas evidenciou uma interação entre os dias de treinamento e os grupos experimentais, em que o grupo Sham foi diferente dos grupos HI. O grupo HI+Extrato diferiu dos demais grupos HI e do Sham ($F(4,45)=5,07$, $p<0,05$). No primeiro dia de treino não houve diferenças significativas entre os grupos. No dia 2 do treino a ANOVA revelou que o grupo Sham foi diferente dos demais grupos, exceto do grupo HI ($F(4,49)=4,90$, $p<0,05$). No dia 3 a ANOVA mostrou que o grupo Sham foi diferente de todos os grupos exceto do grupo HI+Extrato ($F(4,49)=5,71$, $p<0,05$). Este efeito permaneceu no dia 4, onde o grupo HI+Extrato teve desempenho igual ao grupo Sham e diferente dos grupos HI e HI+Veículo ($F(4,49)=7,98$, $p<0,05$). No dia 5 a ANOVA evidenciou que o grupo Sham foi diferente de todos os grupos exceto do grupo HI+Extrato ($F(4,49)=6,10$, $p<0,05$) (Figura 8a).

No dia do teste (probe trial) os grupos HI tiveram desempenho inferior ao dos grupos Sham e HI+Extrato, apresentando maiores latências para alcançar a zona da plataforma ($F(4,49)=3,82, p<0,05$) (Figura 8b).

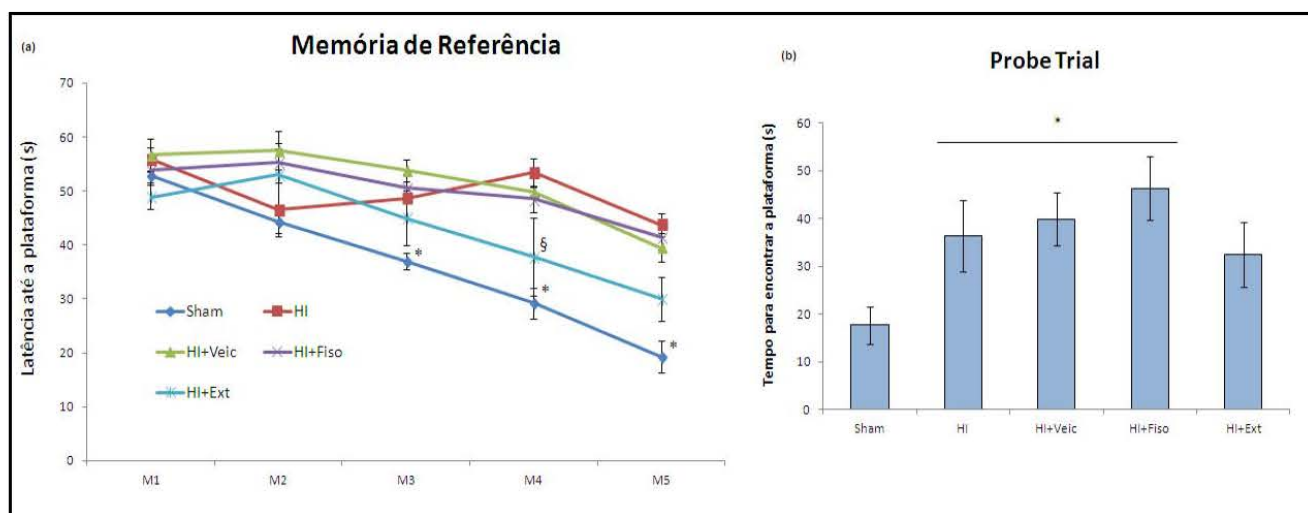


Figura 8. Labirinto aquático de Morris. Memória de Referência. (a) Latência para encontrar a plataforma nas sessões de treino. *Diferença do Sham para os demais grupos, exceto HI+Extrato. §Diferença do grupo HI+Extrato para os demais grupos HI. (b) Latência para alcançar a zona da plataforma no dia do teste (probe trial). *Diferentes dos grupos Sham e HI+Extrato. Os dados estão expressos como média \pm EP. N=7-13 animais por grupo. ($p<0,05$).

4.4.2 Labirinto Aquático de Morris: memória de trabalho

No protocolo de memória de trabalho o trial 1(aquisição) não evidenciou diferenças entre os grupos após a ANOVA. No trial 2 (índice de retenção) o grupo HI teve desempenho significativamente pior comparado ao grupo Sham ($F(4,49)=3,57, p<0,05$). Quando analisada a diferença entre os trials 1 e 2 usando o teste t-pareado, apenas o grupo HI não demonstrou ter aprendido a tarefa, mantendo o tempo de latência similar entre os trials 1 e 2. Os demais grupos, Sham ($t=4,02; p<0,05$), HI+Veículo ($t=2,77; p<0,05$), HI+Extrato ($t=2,68; p<0,05$) e HI+Fisostigmina ($t=4,19; p<0,05$) apresentaram diferença entre o primeiro e segundo trials indicando um aprendizado da tarefa (Figura 9).

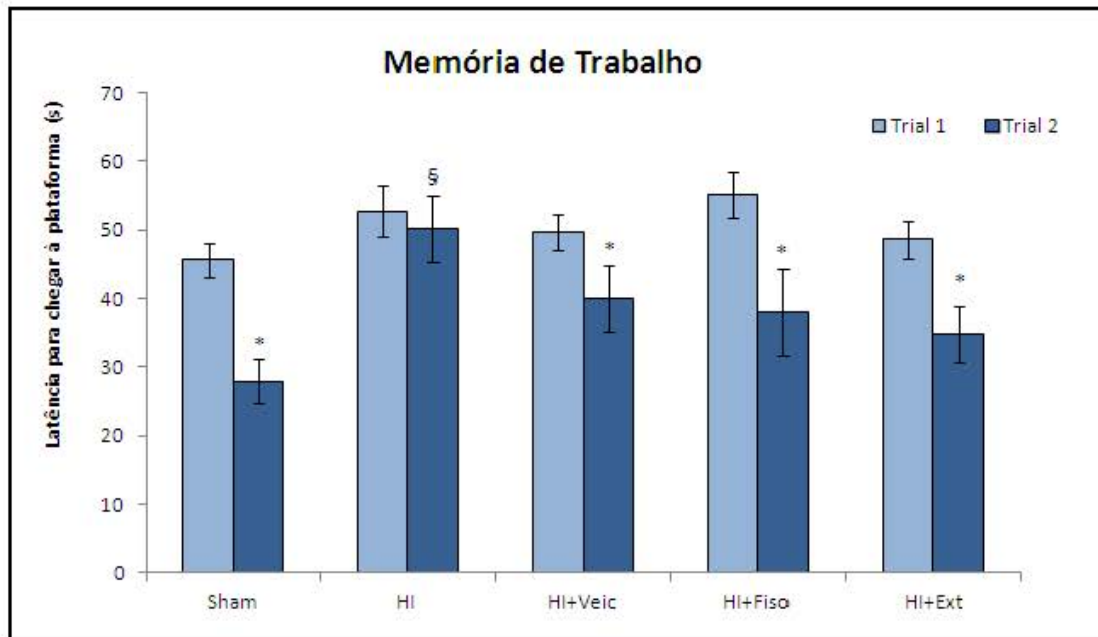


Figura 9. Labirinto aquático de Morris. Memória de trabalho. Latência para encontrar a plataforma nas sessões de treino na primeira tentativa (trial 1 - coluna à esquerda) e segunda tentativa (trial 2 - coluna à direita). Os dados estão expressos como média \pm EP. $n=7-13$ animais por grupo. ($p<0,05$). *Diferença entre o trials 1 e 2. [§] Diferença entre grupos Sham e HI.

4.4.3 Esquiva Inibitória

O teste de Kruskal-Wallis evidenciou diferenças significativas entre os grupos experimentais quando testada a memória de longa duração ($H=13,48$ $p<0,05$) (Figura 10). O teste de Wilcoxon revelou diferenças entre treino e testes de curta e longa duração no grupo Sham ($Z=-3,32$, $p<0,05$; $Z=-3,29$ $p<0,05$, respectivamente). O mesmo teste revelou que o grupo HI+Extrato teve o mesmo padrão de aprendizado comparando treino e memória de curta duração ($Z=-2,52$ $p<0,05$), treino e longa duração ($Z=-2,52$ $p<0,05$). O grupo HI+Fisostigmina teve o pior desempenho na tarefa, em especial no teste de longa duração, em que teve desempenho significativamente pior comparado aos demais grupos.

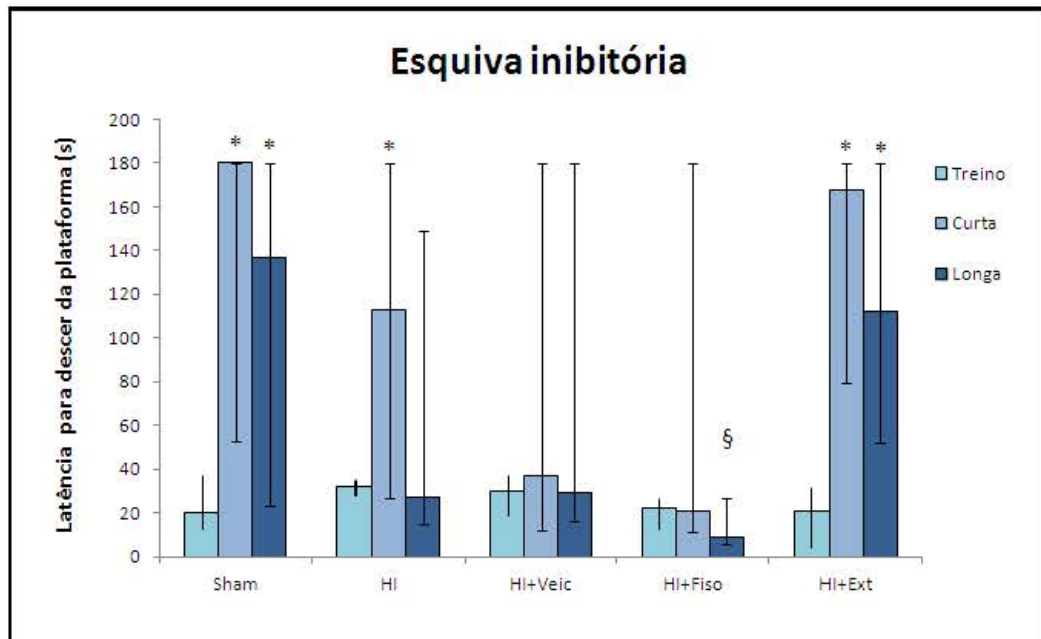


Figura 10. Esquiva inibitória. Latência para descer da plataforma no treino (barra à esquerda), teste da memória de curta duração (barra central) e da memória de longa duração (barra à direita). Os dados representam a mediana e percentis 25 e 75%. n=7-13 animais por grupo. *Diferença dos grupos comparados ao treino. §Diferença para os demais grupos no teste de memória de longa duração. (p<0,05).

4.6 Análise Bioquímica

Os resultados da atividade da BuchE sérica no DPN45 mostram uma redução da atividade dessa enzima nos grupos HI, exceto no grupo HI+Extrato ($F(6,52)=4,53$ p<0,05) (Figura 11).

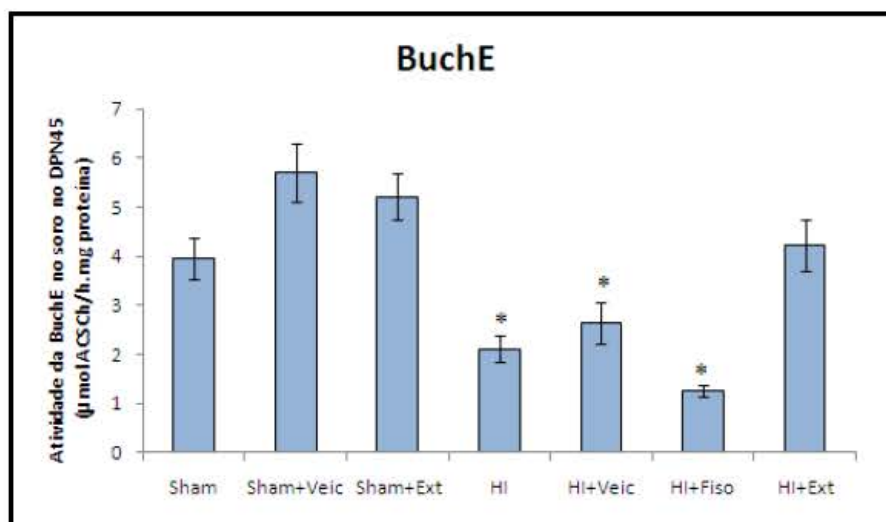


Figura 11. Atividade da enzima BuchE no soro no DPN45. Dados expressos em µmolACSh/h.mg de proteína ±EP. n=5-11 animais por grupo. (p<0,05) *Diferente do grupo Sham.

A análise de parâmetros de estresse oxidativo e atividade anti-oxidante no baço realizados no DPN45 revelou que houve um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (através do aumento na produção de DCF) no grupo HI em comparação ao grupo Sham ($F(6,52)=4,53$ $p<0,05$); esse aumento foi revertido no grupo HI+Extrato (Figura 12a). Quanto às enzimas anti-oxidantes, a superóxido dismutase (SOD) teve sua atividade reduzida em todos os grupos HI em comparação ao grupo Sham ($F(6,52)=5,30$ $p<0,05$) (Figura 12b), assim como a catalase (CAT) ($F(6,47)=7,89$ $p<0,05$) (Figura 12c). A administração do extrato não foi capaz de reverter esse efeito.

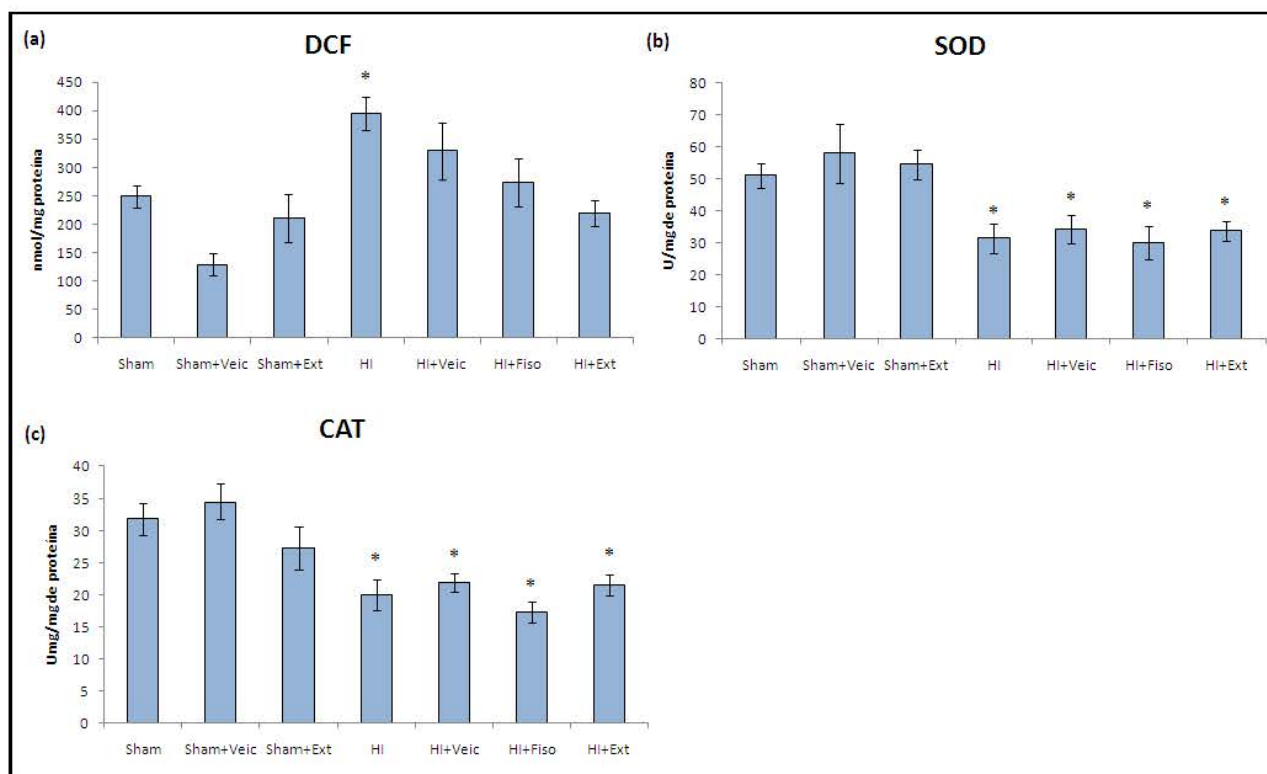


Figura 12. Parâmetros de estresse oxidativo no baço no DPN45. (a) Formação de DCF (nmol/mg de proteína \pm EP); (b) Atividade da enzima SOD (U/mg de proteína \pm EP); (c) Atividade da enzima CAT (U/mg de proteína \pm EP). ($p<0,05$) *Diferente do Sham.

4.7 Análise Histológica

A análise estatística da área dos hemisférios, assim como dos estriados ipsi e contralaterais à lesão na região do Bregma -3,80mm (Imagem dos cortes na figura 14) não evidenciou diferenças significativas entre os grupos (Figuras 13a e 13c). A análise das áreas dos hipocampos revelou diferença entre a área dos hipocampo ipsi e contralaterais, apenas nos grupos HI e HI+veículo ($t=-2,92$; $-15,06$, $p<0,05$ respectivamente). A comparação da área do hipocampo ipsilateral à lesão revelou que os grupos HI e HI+Veículo possuem uma área significativamente menor que a do grupo Sham ($F(4,23)=3,06$ $p<0,05$) (Figura 13b).

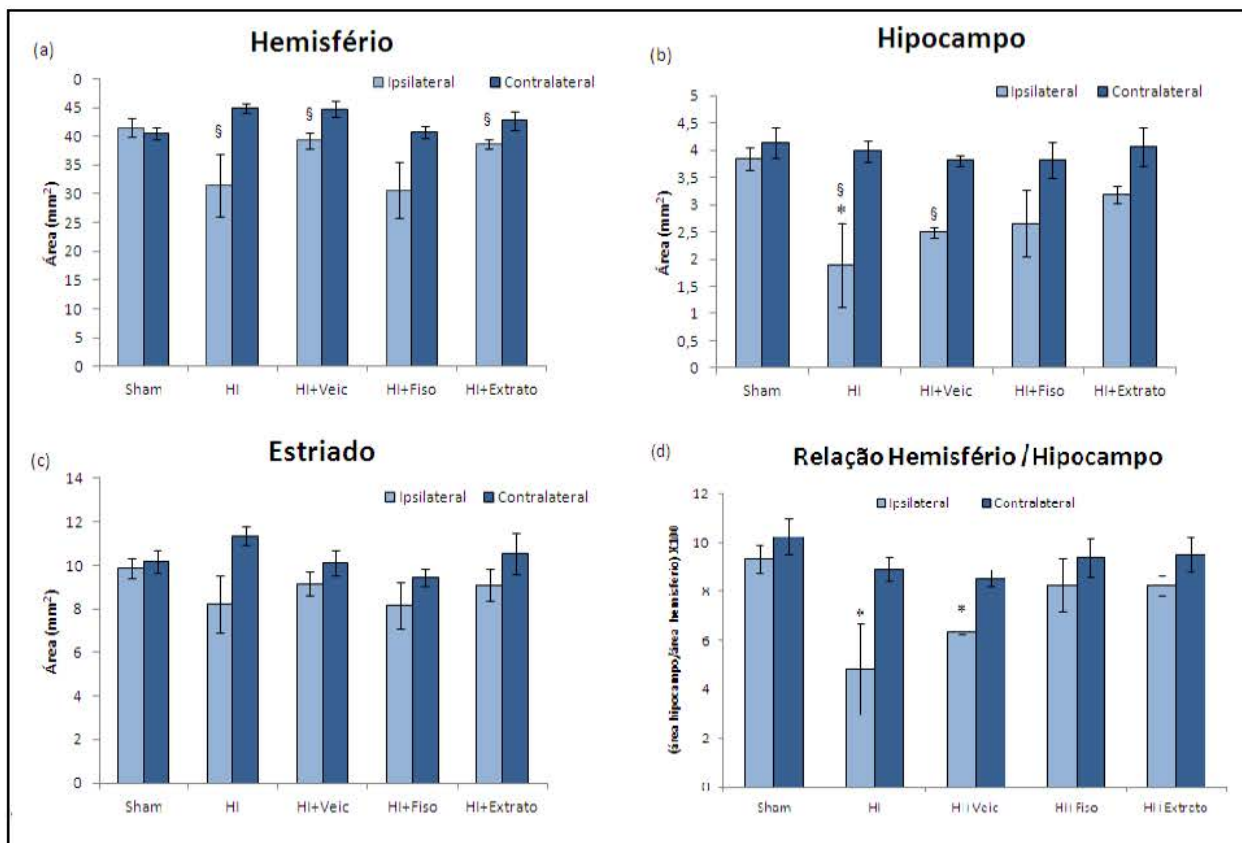


Figura 13. Análise histológica das áreas (a) dos hemisférios, (b) hipocampos e (c) dos estriados ipsilaterais (coluna à esquerda) e contralaterais (coluna à direita) à oclusão da carótida avaliadas na região do Bregma - 3,80mm. Os dados expressam a área (mm²) ±EP. n= 4-6 animais grupo. (d) Área do hipocampo. Os dados estão expressos como porcentagem ±EP da área do hemisfério direito representada pelo hipocampo ipsi [(Área do hipocampo ipsilateral/Área do hemisfério ipsilateral)x100] e contralateral hipocampo contra [(Área do hipocampo contralateral/Área do hemisfério contra)x100]. n=7-13 animais por grupo. *Diferente do grupo Sham. §Diferente do lado contralateral. (p<0,05).

Outro resultado importante foi obtido pela análise da porcentagem da área ocupada pelo hipocampo em cada hemisfério; isto nos revelou que nos grupos HI e HI+Veículo o hipocampo representa uma área significativamente menor no hemisfério ipsilateral à lesão em comparação ao hemisfério contralateral ($F(4,23)=3,24$ $p<0,05$) (Figura 13d).

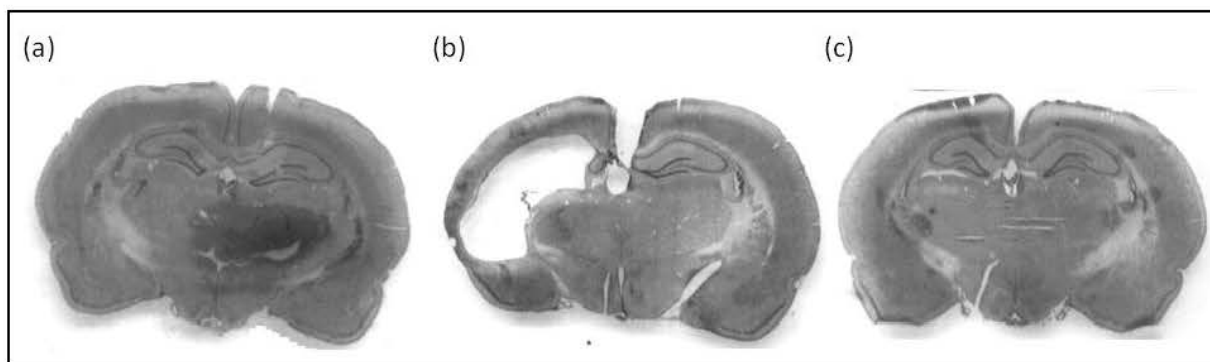


Figura 14. Imagens representativas dos encéfalos dos animais dos grupos (a) Sham (b) HI e (c) HI+Extrato no Bregma -3,80mm.

5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho investigamos os efeitos da administração do extrato de *Huperzia quadrifariata* no modelo experimental de HI neonatal. Observamos, como esperado, o efeito prejudicial da HI em parâmetros comportamentais, histológicos e bioquímicos. Nosso estudo mostra que o extrato de *Huperzia quadrifariata* reduziu os efeitos da HI em alguns dos parâmetros avaliados, possivelmente por possuir o potencial de inibir a enzima AchE, que possui um importante papel no sistema colinérgico, que é alterado pela lesão hipóxico-isquêmica (Pimentel et al., 2013).

O desenvolvimento dos animais foi avaliado a partir da análise dos pesos e de testes sensório-motores após a HI. O ganho de peso entre DPN7 e 11 não revelou prejuízo do desenvolvimento nos grupos HI (Figura 4). Porém, o grupo HI+Extrato mostrou um ganho de peso significativamente menor que os demais grupos nesse intervalo. Esse efeito, provavelmente se deve a outras propriedades desse extrato, não apenas às inibidoras da AchE, visto que esse é um extrato dos alcalóides da planta e possui, portanto, propriedades ainda não conhecidas que podem provocar alterações metabólicas ainda não estudadas. Ao final dos experimentos (DPN45), não houve diferença significativa entre os grupos, o que sugere que as alterações provocadas pelo extrato e que atrasaram o ganho de peso dos animais já não possuem influência sobre seu crescimento.

Entre as medidas do desenvolvimento sensório-motor abordadas (Figura 6), apenas o reflexo de endireitamento se mostrou alterado pela HI, tendo esse efeito sido parcialmente revertido nos animais do grupo HI+Extrato. O grupo HI+Fisostigmina apresentou um desempenho inferior comparado ao grupo Sham nesse teste. Uma possível explicação para esse resultado é o fato de a dose utilizada (0,2 mg/kg) ter sido um pouco elevada. Csernansky e colaboradores (2005), utilizando um modelo de esquizofrenia mostraram que a fisostigmina

quando administrada em doses mais baixas (0,03 mg/kg aplicados i.p.) não prejudica a função locomotora, enquanto doses mais altas (0,3 mg/kg aplicados i.p.) têm efeito prejudicial em testes locomotores como o teste de locomoção espontânea.

Após o DPN30 realizamos o teste do cilindro a fim de avaliar a capacidade motora dos animais. Não foi detectado nenhum déficit motor significativo, porém, o grupo HI+Fisostigmina teve um desempenho pior comparado aos demais grupos (Figura 7), o que reforça a hipótese de que a dose de fisostigmina tenha sido muito alta e causado déficits motores. É importante ressaltar que esses danos ao sistema motor podem ter prejudicado o desempenho dos animais desse grupo nas tarefas cognitivas, como discutiremos adiante.

A lesão HI é caracterizada por provocar déficits cognitivos em diferentes tipos de memória: espacial, de trabalho e aversiva já bem descritos na literatura e por nosso grupo (Arteni et al., 2010; Pereira et al., 2007). Nesse trabalho observamos o efeito protetor do extrato sobre os déficits causados pela lesão HI à memória de referência durante o treino (Figura 8a) e ao avaliar o tempo de latência para chegar à zona da plataforma no dia do teste (Figura 8b). Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Wang e colaboradores (2002) que administrou Huperzina A (substância obtida de uma planta chinesa que pertence ao mesmo gênero que a *Huperzia quadrifariata*) após a HI e um modelo de hipoperfusão 2VO (Wang et al., 2010) e obteve um efeito protetor dessa substância no desempenho desses animais no Labirinto aquático de Morris.

Ao avaliarmos a memória de trabalho, verificamos que ela foi afetada somente no grupo HI (que não evidenciou diminuição na latência do primeiro trial em comparação ao segundo)(Figura 9). A melhora observada nos grupos tratados com extrato e fisostigmina deve-se, possivelmente, ao efeito protetor dos inibidores de AchE nessa lesão. O efeito do veículo (DMSO) pode ser explicado por suas propriedades neuroprotetoras (Rivers-Auty &

Ashton, 2013; Bardutzky, 2005). Porém, a literatura é divergente quanto ao uso de inibidores de AchE e melhora na memória de trabalho. Estudos mostram que os efeitos dos inibidores de AchE não melhoram a capacidade cognitiva na memória de trabalho, como demonstrado por Nagakura e colaboradores (2013), que não observaram melhora na memória de trabalho utilizando o Y-maze ao testarem a administração de Donepezil, um inibidor de AchE em um modelo de doença de Alzheimer.

Outro teste cognitivo realizado foi a esQUIVA INIBITÓRIA, a fim de avaliar a memória aversiva de curta e longa duração. Esse teste demonstrou o prejuízo causado pela lesão HI que foi revertido pelo extrato nos testes de memória de curto e de longo prazo. Os únicos grupos que recordaram a experiência aversiva quando testada a memória de longa duração foram os grupos Sham e HI+Extrato (Figura 10). Nossos resultados corroboram os de Csernansky e colaboradores (2005), que demonstraram que inibidores de AchE têm a propriedade de melhorar a memória aversiva na tarefa de medo condicionado em um modelo de esQUIZOFRENIA. Como mencionado anteriormente, o desempenho dos animais do grupo HI+Fisostigmina nessa tarefa foi o pior. A alta dose da fisostigmina pode ter causado déficits motores que prejudicaram o desempenho desses animais nos testes cognitivos, ainda que a análise da área da lesão não evidencie dano histológico significativo.

A lesão HI afeta diversas estruturas encefálicas dentre as quais se destaca o hipocampo (Furukawa et al. 2013; Arteni et al. 2010; Towfighi et al., 1996). No presente trabalho encontramos uma diminuição da lesão (verificada pela área hemisférica) nos grupos HI+Extrato e HI+Veículo (Figura 13a). Também foi observada uma proteção à lesão hipocampal nos grupos que receberam tratamento com os inibidores da AchE (HI+Fisostigmina e HI+Extrato) (Figura 13b). Esses resultados estão de acordo com estudos demonstrando que agonistas de Ach diminuem a extensão da lesão, enquanto antagonistas de Ach a aumentam (Furukawa et al., 2011;2013), e estudos de Wang e colaboradores (2002)

que demonstraram o efeito protetor da Huperzina A na lesão hipocampal provocada pela HI. A preservação dos hipocampos no grupo tratado com o extrato ajuda a responder a explicar o melhor desempenho nas tarefas cognitivas.

Vários sistemas são afetados pela HI (Volpe, 2008). Um deles é o sistema imune, estudos demonstram que há uma redução do tamanho do baço e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio no mesmo após a HI (Jellema et al., 2013; Fathali 2013). Nesse trabalho nota-se que o peso do baço é maior no grupo Sham comparado aos dos grupos HI (figura 5c). A análise bioquímica de alguns parâmetros de estresse oxidativo no baço mostraram uma redução na atividade das enzimas anti-oxidantes SOD e CAT em todos os grupos submetidos à HI quando comparados ao grupo Sham. A atividade dessas enzimas é similar em todos os grupos HI, porém os resultados do DCF revelam que o extrato possui uma capacidade de reverter o aumento do estresse oxidativo provocado pela lesão HI no baço, possivelmente por sua ação anti-inflamatória provocar uma diminuição na atividade desse órgão, reduzindo a lesão causada pela HI. O bloqueio da formação de espécies reativas em tecidos periféricos causado por uma lesão no sistema nervoso após o tratamento com inibidores de AchE já foi descrita Kutsuna e colaboradores (2010), num estudo com fisostigmina administrada após a isquemia/reperfusão cerebral.

Pimentel e colaboradores (2013) demonstraram que a atividade da enzima AchE no sangue é aumentada após HI. Uma medida indireta da atividade da AchE é obtida pela atividade da BuchE. Nossos resultados evidenciam que, mesmo após 38 dias da lesão HI essa enzima tem sua atividade reduzida em todos os grupos que sofreram a lesão, exceto nos animais do grupo HI+Extrato, que possuem níveis iguais aos apresentados pelo grupo Sham. Uma possível explicação para esse resultado a ação protetora do extrato no sistema colinérgico contra os danos causados pela lesão hipóxico-isquêmica.

A resposta imune é um importante componente da lesão HI, sendo a lesão mais severa quanto maior for essa resposta. O sistema colinérgico inibe a resposta imune (Furukawa et al. 2013, Karimi 2010 e outros) e inibidores da AchE apresentam ação neuroprotetora em diversas lesões e patologias que afetam o sistema nervoso, tais como a lesão encefálica traumática (Holschneider et al. 2011), a isquemia reperusão (Kutsuna et al. 2010), o autismo (Karvat et al. 2013), a esquizofrenia (Csernansky et al. 2005), a doença de Alzheimer (Schwarz et al., 2012), a doença de Huntington (Park et al. 2008) e lesão hipóxico isquêmica (Wang et al., 2002). Sugerimos que as melhoras cognitivas e histológicas observadas no grupo HI+Extrato devem-se à inibição da AchE que havia causado uma maior ativação do sistema colinérgico e por consequência uma inibição no sistema imune, o que reduziu a lesão e minimizou os déficits cognitivos causados pela HI. Contudo, em função do curto prazo, não foram realizadas análises diretas da atividade do sistema imune. Experimentos já estão sendo conduzidos em que serão verificados os níveis de citocinas (IL-1beta e TNF-alfa) nos DPN11 e 45 a fim de verificar o efeito do tratamento com o extrato sobre a HI.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o extrato de *Huperzia quadrifariata* apresentou um efeito protetor contra os prejuízos causados pela HI neonatal, Nosso trabalho é o primeiro registro do uso do extrato de *Huperzia quadrifariata* como potencial estratégia terapêutica na lesão HI, revertendo os déficits cognitivos e morfológicos causados pela lesão.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos permitem concluir que o extrato de alcalóides de *Huperzia quadrifariata*:

- a) reduz os déficits cognitivos causados pela lesão HI em tarefas de memória espacial e aversiva;
- b) reduz lesão encefálica provocada pela lesão HI, principalmente no hipocampo;
- c) reduz o aumento da formação de radicais livres no baço causado pela HI;
- d) reverte a diminuição da atividade da BuchE no soro provocada pela HI;
- e) possui ação neuroprotetora sobre os efeitos metabólicos, morfológicos e comportamentais causados pela hipóxia-isquemia neonatal.

7. BIBLIOGRAFIA

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879.

ALAM, S.N., et al. Lycopodium alkaloids XV. Structure and mass spectra of some minor alkaloids of *Lycopodium flabelliforme*. *Canadian Journal of Chemistry* 42, 2456–2466, 1964.

ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev Immunol*, v. 30, p. 313-35, 2012. ISSN 1545-3278.

ARTENI, N. S. et al. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav Brain Res*, v. 210, n. 1, p. 92-8, Jun 2010. ISSN 1872-7549.

ARTENI, N. S. et al. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res*, v. 973, n. 2, p. 171-8, May 2003. ISSN 0006-8993.

BARDUTZKY, J. et al. Effects of intravenous dimethyl sulfoxide on ischemia evolution in a rat permanent occlusion model. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 25, n. 8, p. 968-77, Aug 2005. ISSN 0271-678X.

BARKS, J. D.; SILVERSTEIN, F. S. Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Pathol*, v. 2, n. 3, p. 235-43, Jul 1992. ISSN 1015-6305.

BERGER, R.; GARNIER, Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 30, n. 2, p. 107-34, Aug 1999.

CSERNANSKY, J. G. et al. Cholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits induced by MK-801 in mice. *Neuropsychopharmacology*, v. 30, n. 12, p. 2135-43, Dec 2005. ISSN 0893-133X.

DAFRE, A. L. et al. Perturbations in the thiol homeostasis following neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats. *Neurosci Lett*, v. 345, n. 1, p. 65-8, Jul 2003. ISSN 0304-3940.

DUGAN, J. M. et al. Automation and integration of components for generalized semantic markup of electronic medical texts. *Proc AMIA Symp*, p. 736-40, 1999. ISSN 1531-605X.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, v. 7, p. 88-95, Jul 1961. ISSN 0006-2952.

ENGIDAWORK, E. et al. Effect of perinatal asphyxia on systemic and intracerebral pH and glycolysis metabolism in the rat. *Exp Neurol*, v. 145, n. 2 Pt 1, p. 390-6, Jun 1997. ISSN 0014-4886.

ERECIŃSKA, M. et al. Energetics of the nerve terminal in relation to central nervous system function. *Biochem Soc Trans*, v. 22, n. 4, p. 959-65, Nov 1994. ISSN 0300-5127.

FATHALI, N. et al. Splenic Immune Cells In Experimental Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Transl Stroke Res*, v. 4, n. 2, p. 208-219, Apr 2013. ISSN 1868-4483.

FAVERO, A. M. et al. Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. *Neurotoxicol Teratol*, v. 28, n. 5, p. 607-16, 2006 Sep-Oct 2006. ISSN 0892-0362.

FERRIERO, D. M. Neonatal brain injury. *N Engl J Med*, v. 351, n. 19, p. 1985-95, Nov 2004. ISSN 1533-4406.

FURUKAWA, S. et al. Acetylcholine receptor agonist reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. *Reprod Sci*, v. 18, n. 2, p. 172-9, Feb 2011. ISSN 1933-7205.

FURUKAWA, S. et al. Activation of acetylcholine receptors and microglia in hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Dev*, v. 35, n. 7, p. 607-13, Aug 2013. ISSN 1872-7131.

HOLSCHNEIDER, D. P. et al. Acetylcholinesterase inhibition and locomotor function after motor-sensory cortex impact injury. *J Neurotrauma*, v. 28, n. 9, p. 1909-19, Sep 2011. ISSN 1557-9042.

HOSSAIN, M. I.; WAHED, M. A.; AHMED, S. Increased food intake after the addition of amylase-rich flour to supplementary food for malnourished children in rural communities of Bangladesh. *Food Nutr Bull*, v. 26, n. 4, p. 323-9, Dec 2005. ISSN 0379-5721.

HOSSMANN, K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res*, v. 39, n. 1, p. 106-20, Jul 1998. ISSN 0008-6363.

HUANG, Z. et al. Long-term cognitive impairment and myelination deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res*, v. 1301, p. 100-9, Dec 2009. ISSN 1872-6240.

JANSEN, E. M.; LOW, W. C. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav Brain Res*, v. 78, n. 2, p. 189-94, Aug 1996. ISSN 0166-4328.

JELLEMA, R. K. et al. Cerebral inflammation and mobilization of the peripheral immune system following global hypoxia-ischemia in preterm sheep. *J Neuroinflammation*, v. 10, p. 13, 2013. ISSN 1742-2094. JENSEN, F. E. Role of glutamate receptors in periventricular leukomalacia. *J Child Neurol*, v. 20, n. 12, p. 950-9, Dec 2005. ISSN 0883-0738.

JIN, Y.; SILVERMAN, A. J.; VANNUCCI, S. J. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Stroke*, v. 40, n. 9, p. 3107-12, Sep 2009. ISSN 1524-4628.

KARIMI, K. et al. The vagus nerve modulates CD4+ T cell activity. *Brain Behav Immun*, v. 24, n. 2, p. 316-23, Feb 2010. ISSN 1090-2139.

KARVAT, G.; KIMCHI, T. Acetylcholine Elevation Relieves Cognitive Rigidity and Social Deficiency in a Mouse Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*, Oct 2013. ISSN 1740-634X.

KONRATH, E. L. et al. *Huperzia quadrifariata* and *Huperzia reflexa* alkaloids inhibit acetylcholinesterase activity in vivo in mice brain. *Phytomedicine*, v. 19, n. 14, p. 1321-4, Nov 2012. ISSN 1618-095X.

KONRATH, E. L. et al. Alkaloid profiling and anticholinesterase activity of South American Lycopodiaceae species. *J Enzyme Inhib Med Chem*, v. 28, n. 1, p. 218-22, Feb 2013. ISSN 1475-6374.

KUNKO, P. M. et al. Perinatal methadone exposure produces physical dependence and altered behavioral development in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 277, n. 3, p. 1344-51, Jun 1996. ISSN 0022-3565.

KUTSUNA, S. et al. Cholinergic agonist physostigmine suppresses excessive superoxide anion radical generation in blood, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Res*, v. 1313, p. 242-9, Feb 2010. ISSN 1872-6240.

LEBEL, C. P. et al. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 104, n. 1, p. 17-24, Jun 1990. ISSN 0041-008X.

LOW, J. A.; KILLEN, H.; DERRICK, E. J. The prediction and prevention of intrapartum fetal asphyxia in preterm pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, v. 186, n. 2, p. 279-82, Feb 2002. ISSN 0002-9378.

MACLEAN, D.B. Lycopodium alkaloids XIII. Mass spectra of representative alkaloids. *Canadian Journal of Chemistry* 41, 2654-2670, 1963.

MARKLUND, S. L. Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp 243-247, 1985.

MCLEAN, C.; FERRIERO, D. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol*, v. 28, n. 6, p. 425-32, Dec 2004. ISSN 0146-0005.

MISHRA, O. P.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res Bull*, v. 48, n. 3, p. 233-8, Feb 1999. ISSN 0361-9230.

NAGAKURA, A. et al. Characterization of cognitive deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease and effects of donepezil and memantine. *Eur J Pharmacol*, v. 703, n. 1-3, p. 53-61, Mar 2013. ISSN 1879-0712.

NEVEU, M. M. et al. The fovea regulates symmetrical development of the visual cortex. *J Comp Neurol*, v. 506, n. 5, p. 791-800, Feb 2008. ISSN 0021-9967.

OKADA, H. et al. Alterations in $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors in cognitive decline in Alzheimer's aetiopathology. *Brain*, v. 136, n. Pt 10, p. 3004-17, Oct 2013. ISSN 1460-2156.

ORTEGA, M.G., et al. Anticholinesterase activity in alkaloids extract of *Huperzia saururus*. *Phytomedicine* 11, 539–543, 2004.

PARK, J. E. et al. Galantamine reduces striatal degeneration in 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Neurosci Lett*, v. 448, n. 1, p. 143-7, Dec 2008. ISSN 0304-3940.

PEREIRA, L. O. et al. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem*, v. 87, n. 1, p. 101-8, Jan 2007. ISSN 1074-7427.

PERLMAN, J. M.; BROYLES, R. S.; ROGERS, C. G. Neonatal neurologic characteristics of preterm twin infants <1,250 gm birth weight. *Pediatr Neurol*, v. 17, n. 4, p. 322-6, Nov 1997. ISSN 0887-8994.

PIMENTEL, V. C. et al. Evaluation of acetylcholinesterase and adenosine deaminase activities in brain and erythrocytes and proinflammatory cytokine levels in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia model. *Mol Cell Biochem*, v. 378, n. 1-2, p. 247-55, Jun 2013. ISSN 1573-4919.

PORTERA-CAILLIAU, C.; PRICE, D. L.; MARTIN, L. J. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol*, v. 378, n. 1, p. 70-87, Feb 1997. ISSN 0021-9967.

RIBAS, G. S. et al. Reduction of butyrylcholinesterase activity in plasma from patients with disorders of propionate metabolism is prevented by treatment with L-carnitine and protein restriction. *Clin Biochem*, v. 45, n. 1-2, p. 77-81, Jan 2012. ISSN 1873-2933.

RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, v. 9, n. 2, p. 131-41, Feb 1981. ISSN 0364-5134.

RIVERS-AUTY, J.; ASHTON, J. C. Vehicles for lipophilic drugs: implications for experimental design, neuroprotection, and drug discovery. *Curr Neurovasc Res*, v. 10, n. 4, p. 356-60, Nov 2013. ISSN 1875-5739.

ROSSITER, J. P. et al. Caspase-3 activation and caspase-like proteolytic activity in human perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Acta Neuropathol*, v. 103, n. 1, p. 66-73, Jan 2002. ISSN 0001-6322.

SANCHES, E. F. et al. (a) Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience*, v. 237, p. 208-15, May 2013. ISSN 1873-7544.

SANCHES, E. F. et al. (b) Are the consequences of neonatal hypoxia-ischemia dependent on animals' sex and brain lateralization? *Brain Res*, v. 1507, p. 105-14, Apr 2013. ISSN 1872-6240.

SANCHES, E. F. et al. Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. *Brain Res*, v. 1438, p. 85-92, Feb 2012. ISSN 1872-6240.

SCHWARZ, S.; FROELICH, L.; BURNS, A. Pharmacological treatment of dementia. *Curr Opin Psychiatry*, v. 25, n. 6, p. 542-50, Nov 2012. ISSN 1473-6578.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n. 4, p. 294-302, Apr 2001. ISSN 1471-003X.

SUN, C.M., HO, L.K., SUN, M.L., Revised stereochemistry of so-called isoselagine and spectroscopic analysis of 6 β -hydroxylicopodine from *Lycopodium serratum* var. *longipetiolatum*. *Planta Medica* 59, 467-471, 1993.

TOWFIGHI, J. et al. Ganglion cell-containing tumors of the pituitary gland. *Arch Pathol Lab Med*, v. 120, n. 4, p. 369-77, Apr 1996. ISSN 0003-9985.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 853-9, 2002 Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836.

VANNUCCI, R. C.; PERLMAN, J. M. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*, v. 100, n. 6, p. 1004-14, Dec 1997. ISSN 1098-4275.

VOLPE, J. J. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol*, v. 8, n. 1, p. 110-24, Jan 2009. ISSN 1474-4422.

WANG, J.; ZHANG, H. Y.; TANG, X. C. Huperzine A improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion. *J Neurosci Res*, v. 88, n. 4, p. 807-15, Mar 2010. ISSN 1097-4547.

WANG, L. S. et al. Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury in neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Brain Res*, v. 949, n. 1-2, p. 162-70, Sep 2002. ISSN 0006-8993.

ZHAO, J. et al. Effect of intrauterine infection on brain development and injury. *Int J Dev Neurosci*, v. 31, n. 7, p. 543-549, Jul 2013. ISSN 1873-474X.