

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

SAMUEL GREGGIO

**EFEITO NEUROPROTETOR DO PEPTÍDEO NAP SOBRE O DANO
OXIDATIVO HIPOCAMPAL DE RATOS NEONATOS SUBMETIDOS
AO MODELO DE CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR HIPÓXIA**

PORTO ALEGRE

2009

SAMUEL GREGGIO

**EFEITO NEUROPROTETOR DO PEPTÍDEO NAP SOBRE O DANO
OXIDATIVO HIPOCAMPAL DE RATOS NEONATOS SUBMETIDOS
AO MODELO DE CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR HIPÓXIA**

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito para obtenção do grau
de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Pediatria e Saúde da
Criança, da Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa Dacosta

PORTO ALEGRE

2009

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

G819e Greggio, Samuel

Efeito neuroprotetor do peptídeo NAP sobre o estresse oxidativo hipocampal de ratos neonatos em modelo de crises convulsivas induzidas por hipóxia / Samuel Greggio. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

132 f.: il. graf. tab.

Orientação: Prof. Dr. Jaderson Costa Dacosta.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Pediatria e Saúde da criança. Área de Concentração: Neurociências.

1. HIPÓXIA ENCEFÁLICA. 2. CONVULSÕES. 3. ESTRESSE OXIDATIVO. 4. DANO AO DNA. 5. PEROXIDAÇÃO DE LÍPÍDEOS. 6. GLUTATIONA. 7. NEUROPEPTÍDEOS. 8. AGENTES NEUROPROTETORES. 9. MODELOS ANIMAIS. 10. EPIDEMIOLOGIA ANALÍTICA. 11. ENSAIO CLINICO CONTROLADO ALEATÓRIO. I. Dacosta, Jaderson Costa. II. Título.

C.D.D. 616.853

C.D.U. 616.8-08.24:577.112.6(043.3)

N.L.M. WL 104

SAMUEL GREGGIO

**EFEITO NEUROPROTETOR DO PEPTÍDEO NAP SOBRE O DANO
OXIDATIVO HIPOCAMPAL DE RATOS NEONATOS SUBMETIDOS
AO MODELO DE CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR HIPÓXIA**

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito para obtenção do grau
de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Pediatria e Saúde da
Criança, da Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

Aprovado em 02 de Março de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Roesler – UFRGS

Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes – PUCRS

Prof. Dr. Paulo Márcio Pitrez – PUCRS

“Happiness is nonetheless true happiness because it must come to an end, nor do thought and love lose their value because they are not everlasting. Many a man has borne himself proudly on the scaffold; surely the same pride should teach us to think truly about man's place in the world. Even if the open windows of science at first make us shiver after the cosy indoor warmth of traditional humanizing myths, in the end the fresh air brings vigour, and the great spaces have a splendour of their own.”

Bertrand Russell (1872 – 1970)

*Dedico esta dissertação aos meus queridos pais,
por tudo que me ensinaram, e pelo seu amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. **Jaderson Costa Dacosta**, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação desde a iniciação científica; por acreditar no meu trabalho, e permitir que a pesquisa tornasse parte inseparável da minha vida. Agradeço por proporcionar o meu amadurecimento profissional e, também, pessoal.

Ao Dr. **Alexandre Dolganov**, pela sua dedicação e por ter me acompanhado nestes dois anos de mestrado. Com certeza o seu suporte técnico foi primordial para a realização deste trabalho. Agradeço muito pelo apoio nos momentos de dificuldade e pela amizade.

Ao professor Dr. **João Antonio Pêgas Henriques**, por permitir que parte desta pesquisa fosse realizada no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da UFRGS. Agradeço, também, pela disposição em avaliar este trabalho.

Ao grande amigo **Renato**, por tudo o que me ensinou; agradeço pela dedicação e enorme ajuda neste trabalho, assim como nas discussões científicas. Ao amigo **Iuri**, pelo enorme auxílio nos experimentos de ensaio cometa. À querida amiga **Fernanda**, pela amizade de longa data e pela colaboração inicial neste trabalho. Certamente, sem a cooperação de vocês, a realização deste trabalho teria sido muito mais difícil.

Aos amigos que fazem parte do **Neurolab**, que de certa maneira, acabam por compartilhar na minha vida acadêmica e pessoal. À **Daniela**, pela grande amizade, conselhos e solicitude para comigo e com todos do laboratório. À **Simone Salamoni**, pelos conselhos e por ter me acolhido no laboratório de forma tão “enérgica”. À **Zuzete e Ricardo**, por serem pessoas fundamentais para o funcionamento do Neurolab. À **Gianina**, praticamente uma consultora científica, agradeço pela amizade e conversas não-científicas, também. À **Simone de Paula**, pela parceria e alegria em trabalharmos juntos. À **Yanet**, por ser um exemplo de perseverança e força. À **Mariana**, pelas risadas e por ser esta pessoa tão querida. À **Fernanda Noal**, pelas conversas e reflexões. À **Tatiane**, pelos conselhos e desabafos. Também gostaria de agradecer às estagiárias **Nidiane, Pâmela, Gleice, Cristiane e Elisa**, por ajudas diversas.

Ao querido trio, **Thais, Karen e Priscila**, pela amizade e companhia nestes anos no IPB. Agradeço à **Nelcy**, pela eficiência e por ser esta pessoa positiva. À secretária **Carla**, pela disposição e por ser tão prestativa.

Ao Dr. **Martín Cammarota** e prof. **Iván Izquierdo**, por terem permitido utilizar o Centro de Memória para realizar testes comportamentais; agradeço pela disposição e ajuda.

Em especial, quero expressar a minha gratidão aos amigos **Weber** e **Juliana**, sempre prestativos. Enfim, a todos os colegas e amigos do Centro de Memória, que de uma forma ou outra, sempre estavam dispostos a me ajudar.

Gostaria, também, de agradecer pela fundamental ajuda de **Maria Ângela** e **Irene** quanto à dedicação nos cuidados de parte dos animais utilizados neste trabalho.

Ao **Daniel**, agradeço por todo o suporte técnico na elaboração desta dissertação; muito obrigado pelo companheirismo, conselhos e apoio sempre que tudo parecia não ter solução.

Agradeço aos meus pais, **Roberto** e **Adélia**, pelos ensinamentos, confiança, companheirismo e patrocínio; por sempre me apoiarem e respeitarem as minhas decisões; e por terem me ensinado a lutar e a ser perseverante em meus objetivos. Aos meus avôs, **Ângelo** e **Ignês**, pelos aprendizados, pela alegria e por terem sido parte fundamental na minha criação. À minha tia, **Ivete**, e minhas primas, **Kátia** e **Karine**, pelo carinho, apoio e ajuda sempre que necessário. Todos moram no meu coração e, mesmo longe, nunca deixo de pensar em cada um de vocês. Com certeza, sem esta família maravilhosa, nada disso seria possível.

À **PUCRS**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança**, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela infra-estrutura. Ao **CNPq**, agradeço pela bolsa de Mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I	17
1 REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1 CRISES CONVULSIVAS ASSOCIADAS À HIPÓXIA NEONATAL	18
1.1.1 Imaturidade do Sistema Nervoso Central	22
1.1.2 Bases Celulares e Moleculares dos Processos Hipóxicos e Crises Convulsivas .	26
1.1.3 Modelo Animal de Crises Convulsivas Induzidas por Hipóxia Neonatal	28
1.2 DANO AO DNA NEURONAL	32
1.2.1 Dano Oxidativo ao DNA Neuronal	34
1.2.2 Ensaio Cometa	35
1.3 NEUROPEPTÍDEO NAP	40
1.3.1 Atividade Antioxidativa do Neuropeptídeo NAP	44
2 JUSTIFICATIVA	47
3 OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

CAPÍTULO II	62
5 MATERIAIS E MÉTODOS	63
5.1 ANIMAIS	63
5.2 MODELO ANIMAL DE CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR HIPÓXIA..	64
5.2.1 Monitoramento da StO₂, FC e EEG	65
5.3 ADMINISTRAÇÃO DO NEUROPEPTÍDEO NAP	67
5.4 ESTRATÉGIAS EMPREGADAS NESTE TRABALHO	68
5.4.1 Ensaio Cometa Alcalino	68
5.4.2 Peroxidação Lipídica	70
5.4.3 Determinação de Glutathiona Reduzida e Oxidada	70
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
CAPÍTULO III	74
Regular article to Neurobiology of Disease	75
Abstract	76
Introduction	77
Materials and Methods.....	79
Results.....	85
Discussion	90
References	94
Figure legends	100
Table	103
Figures	104

CAPÍTULO IV.....	115
7 CONCLUSÕES DETALHADAS	116
ANEXO A – Aprovação do projeto pelo CEP-PUCRS	117
ANEXO B – Normas de publicação da <i>Neurobiology of Disease</i>.....	118
ANEXO C – Ata da Defesa de Mestrado	123
APÊNDICE A – Artigo de revisão publicado na revista <i>Scientia Medica</i>.....	124

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Maturação de receptores glutamatérgicos e gabaérgicos no cérebro em desenvolvimento de ratos e de humanos.....	23
FIGURA 2 – Ações excitatórias do GABA e alterações na concentração intracelular de cloro	24
FIGURA 3 – Mudanças de desenvolvimento no limiar da geração de crises.....	25
FIGURA 4 – Registros EEG e eletrocardiograma de ratos submetidos à hipóxia em diferentes idades	29
FIGURA 5 – Representação da ativação de resposta ao dano no DNA	33
FIGURA 6 – Microfotografias de linfócitos humanos no ensaio cometa.....	36
FIGURA 7 – Categorização de nucleoides	37
FIGURA 8 – Mecanismos de ação do VIP	41
FIGURA 9 – Câmara de Hipóxia	65
FIGURA 10 – Sistema Morfeu-bio de monitoramento de StO ₂ , FC e de EEG	66
FIGURA 11 – Interface do software Morfeu-bio.....	67
FIGURA 12 – Metodologia do Ensaio Cometa.	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Etiologia das crises convulsivas neonatais	21
TABELA 2 – Efeito do pH na identificação de danos no DNA.....	38
TABELA 3 – Número amostral.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADNF	Fator neurotrófico atividade dependente
ADNF-9	Fator neurotrófico atividade dependente-9
ADNF-14	Fator neurotrófico atividade dependente-14
ADNP	Proteína neuroprotetora atividade dependente
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionico
CA1	<i>Cornu Ammonis</i> 1 do hipocampo
CA3	<i>Cornu Ammonis</i> 3 do hipocampo
CaM cinase IV	Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo IV
CaN	Calcineurina
CH	Crises convulsivas induzidas por hipóxia
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP-cíclico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
Endo III	Endonuclease III
EEG	Eletroencefalografia
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
Fpg	Formamidopirimidina DNA glicosilase
GABA	Ácido γ -aminobutírico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
ID	Índice de dano
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
MDA	Malondialdeído
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
mIPSCs	Correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas em miniatura
N	Normóxico
NAP	Neuropeptídeo NAP

NIRS	Espectroscopia de infravermelho proximal
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartato
NT-3	Neurotrofina-3
O₂	Oxigênio
P	Idade pós-natal
PARP-1	Poli(ADP-ribose)polimerase
PN-1	Protease nexina-1
PSD-95	Proteína pós-sináptica de densidade-95
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RANTES	Regulada por ativação, secretada e expressa por células T normais
RN	Recém-nascido
RNA	Ácido ribonucleico
sIPSCs	Correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas
Sítios AP	Sítios apurínicos apirimidínicos
SNC	Sistema nervoso central
StO₂	Saturação de oxigênio cerebral
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

RESUMO

Objetivos: verificar se crises convulsivas induzidas por hipóxia (CH) são capaz de gerar estresse oxidativo no hipocampo de ratos neonatos, e, havendo esta constatação, analisar se o neuropeptídeo NAP exerce atividade antioxidante frente ao dano gerado neste modelo.

Métodos: utilizando um modelo animal de CH, investigou-se a formação temporal de dano oxidativo em hipocampo imaturo nos diferentes momentos de análise (0, 1, 3, 6, 24, 72 e 168 h após aplicação do respectivo modelo). Somente ratos Wistar com 10 dias de vida, e que apresentaram atividade epileptiforme no EEG caracterizada por pontas de alta frequência e/ou descargas de polipontas seguidas de atenuação do ritmo de base (padrão tipo surto-supressão) e diminuição da saturação de oxigênio cerebral ($StO_2 < 20\%$) durante a hipóxia (5-7% de O_2 por 12 min), foram incluídos no estudo. Após processamento do tecido hipocampal, ensaio cometa alcalino juntamente com endonucleases (Endo III e Fpg) foi utilizado para detecção de dano ao DNA e de bases oxidadas. Adicionalmente, níveis de glutathiona reduzida (GSH) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) também foram verificados. Após ter-se constatado estresse oxidativo hipocampal induzido por CH, ratos neonatos foram administrados via intraperitoneal em dose única de solução contendo NAP (0,03, 0,3 ou 3 $\mu\text{g/g}$) após terem sido submetidos ao respectivo modelo. Para os animais tratados com NAP, somente os momentos de 3, 6 e 24 h foram analisados.

Resultados: verificou-se dano ao DNA hipocampal imediatamente após CH (0 h) e até 72 h, ao passo que oxidação de purinas e pirimidinas foi detectada apenas entre 3 e 24 h. Verificaram-se níveis aumentados de TBARS entre 1 e 24 h após aplicação do modelo de CH, coincidindo com redução significativa de GSH durante 3 e 72 h. Neuropeptídeo NAP apresentou efeito dose-resposta no restabelecimento da integridade estrutural do DNA hipocampal e membranas lipídicas, em correlação ao incremento do sistema glutathiona.

Conclusões: a compreensão dos mecanismos envolvidos no estresse oxidativo associado às CH é etapa fundamental no desenvolvimento de estratégias terapêuticas com base na suplementação antioxidativa. Desta forma, o neuropeptídeo NAP pode se tornar uma terapia viável na prevenção de dano oxidativo cerebral em situações de CH.

Descritores: cérebro imaturo, crises convulsivas associadas à hipóxia, modelo animal, estresse oxidativo, hipocampo, neuropeptídeo NAP, neuroproteção.

ABSTRACT

Objectives: to investigate to what extent the integrity of hippocampal DNA and redox status are compromised by hypoxia-induced seizures (HS) on immature rat hippocampus, and if so, whether neuropeptide NAP treatment could provide ablative capacity on oxidative stress generated by HS model.

Methods: we used a rodent model of HS to investigate the formation of oxidative biomarkers in developing hippocampus at different time points (0, 1, 3, 6, 24, 72 and 168 h post-HS). For this study, only Wistar rats at age postnatal day 10 exhibiting on the EEG epileptiform activity characterized by high frequency spikes and/or bursts of polyspikes followed by marked voltage-attenuation of the EEG background (burst-suppression pattern), associated with cerebral tissue oxygen saturation (StO₂) reduction in at least 20% during the hypoxia period (12 min of 5-7% O₂) were used. After hippocampal processing, single cell gel electrophoresis (comet assay) was employed in conjunction with DNA-modifying enzymes (Endo III and Fpg) to verify DNA damage and oxidative adducts formation. We also assessed reduced glutathione (GSH) and thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels. Once established the HS-induced hippocampal oxidative damage, rat pups were treated with a single intraperitoneal injection of NAP solution (0.03, 0.3 or 3 µg/g) immediately after HS insult. For NAP treated-rats, oxidative biomarkers were assessed only at 3, 6 and 24 h post-HS.

Results: DNA damage was verified just after the insult (0 h) until 72 h post-HS, while Endo III- and Fpg-sensitive sites were only increased at 3-24 h. TBARS production peaked among 1-24 h after HS insult, and coincide with marked reduction of GSH level at 3-72 h. For NAP treated-HS rats, NAP dose-dependently prevented oxidative damage to DNA and lipid membranes, in correlation with glutathione system enhancement.

Conclusions: these results contribute significant understanding on the timing and factors that influence HS-mediated oxidative stress, an essential step in developing therapeutic strategies based on antioxidant supplementation. Hence, neuropeptide NAP may be a viable strategy in ameliorating HS-induced oxidative damage by regulating glutathione homeostasis.

Keywords: immature brain, hypoxia-induced seizures, rodent model, oxidative stress, hippocampus, NAP peptide, neuroprotection.

CAPÍTULO I

1 REFERENCIAL TEÓRICO

A introdução desta dissertação aborda os pontos mais importantes para a elaboração do propósito deste estudo. Inicialmente, uma abordagem clínica das crises convulsivas associadas à hipóxia neonatal embasa a problemática e justifica a necessidade de novas terapias. O tópico que trata sobre a imaturidade do sistema nervoso central agrega informações que demonstram a vulnerabilidade intrínseca deste sistema ainda em fase de desenvolvimento. Nos fundamentos celulares e moleculares dos processos hipóxicos e crises convulsivas, encontram-se evidências acerca das modificações que estas duas situações promovem na homeostase neuronal. O modelo animal de crises CH é discutido detalhadamente, mostrando a relevância deste recurso na experimentação científica. No segundo tópico, o dano ao DNA neuronal é comentado juntamente com a técnica do ensaio cometa, principal estratégia de investigação deste trabalho. Ao final da introdução, abordam-se as propriedades neuroprotetoras do peptídeo NAP em estudos *in vitro* e *in vivo*, além dos mecanismos de ação envolvidos e sua função antioxidante. Parte deste referencial teórico foi publicado, na forma de artigo de revisão, na revista *Scientia Medica* * (anexo A).

1.1 CRISES CONVULSIVAS ASSOCIADAS À HIPÓXIA NEONATAL

É crescente a fundamentação clínica e experimental que avaliam as bases celulares, moleculares e funcionais do desenvolvimento do cérebro em crescimento, comparados com o cérebro adulto. Sabe-se que o cérebro imaturo é distintamente mais suscetível a uma grande variedade de lesões do que o totalmente desenvolvido. Algumas doenças neurológicas se apresentam com diversos fenótipos ao longo de diferentes estágios da infância e, talvez, o mais intrigante seja a variedade de manifestações clínicas observada no período perinatal ¹.

Uma enorme parcela das crises convulsivas em humanos acontece no primeiro ano de vida, com maior prevalência no período neonatal, que compreendendo as primeiras quatro

* Greggio S, Dacosta JC. Crises convulsivas associadas à hipóxia neonatal e o potencial uso terapêutico do neuropeptídeo NAP. *Scientia Medica*, Porto Alegre, v. 18, n. 1, p. 45-53, jan./mar. 2008

semanas de vida. Estas constituem um dos mais frequentes eventos clínicos observados nos berçários e/ou unidades de tratamento intensivo neonatal, ocorrendo em 0,2-1,4% dos recém-nascidos (RN), com maior predominância naqueles de baixo peso. A incidência de crises neonatais é variável, e esta variabilidade resulta, entre outros fatores, de diferenças metodológicas e no grau de sofisticação diagnóstica ². Enquanto a incidência de crises convulsivas neonatais é de 1-4/1000 nascidos vivos, 14% dos RN internados nas unidades de tratamento intensivo neonatal do Hospital São Lucas da PUCRS apresentam pelo menos um episódio clínico compatível com crise convulsiva ^{3,4}.

Segundo Lombroso (2007), aproximadamente 16% dos neonatos que tiveram crises convulsivas morreram precocemente, 33% acabam tendo sérias sequelas neurológicas – paralisia cerebral, epilepsia, déficits neurofuncionais a longo prazo sobre a memória, comportamento e cognição – e 50% não apresentam nenhuma complicação decorrente destes fenômenos. Basicamente, todas estas complicações são oriundas de uma perturbação da conectividade neuronal e mudanças na composição de receptores e da estrutura dendrítica ³. Pode-se verificar que em ensaios clínicos que avaliam os resultados a longo prazo de neonatos com crises convulsivas, a mortalidade diminuiu nas últimas décadas, enquanto a morbidade tem-se mantido similar ⁵.

Diversos são os fatores que distinguem as crises convulsivas neonatais daquelas de crianças e adultos. De acordo com a classificação etiológica, a grande maioria delas é sintomática, ¼ criptogênica e poucas pertencem à categoria idiopática. Estas podem ser sutis, com discretas manifestações clínicas, e o padrão eletroencefalográfico (EEG) comumente reflete um processo multifocal. A dificuldade diagnóstica é acentuada quando os neonatos podem apresentar movimentos ritmados e estereotipados sem correlação com alterações nos registros EEG. Isto pode caracterizar um evento não-convulsivo ou, eventualmente convulsivo, ocorrendo em RN com grandes lesões encefálicas. Assim, o diagnóstico das crises convulsivas neonatais dependerá da observação clínica experiente, da investigação laboratorial e por imagem e EEG seriado ⁶.

Pode-se afirmar que existem quatro características principais das crises convulsivas neonatais que as tornam peculiares: (a) fenótipos ictais diferem consideravelmente das crises convulsivas de outras idades, requerendo assim uma classificação própria, como a de Rose e Lombroso (1970); (b) crises convulsivas neonatais não são compatíveis com a definição de epilepsia – condição crônica de convulsões recorrentes, espontâneas, fenômenos ictais correlacionados com limiar de crise reduzido numa área cerebral –, já que estas são causadas por doenças agudas sistêmicas ou distúrbios metabólicos transitórios; (c) apenas observação

criterosa e monitoramento poligráfico adequado podem distinguir manifestações ictais das não ictais em neonatos; (d) diversos tipos de crises convulsivas neonatais são multifatoriais, gerando dificuldades na indicação terapêutica específica ⁵.

O prognóstico dos neonatos que apresentaram crises convulsivas tem mudado nos últimos anos. As melhorias no cuidado pré-natal, na assistência obstétrica, nos cuidados intensivos neonatais têm contribuído significativamente para esta mudança. No entanto, crises convulsivas permanecem sendo um importante fator preditivo para futuras complicações neurológicas ².

A relação entre crises neonatais e lesões hipocampais subsequentes ainda não está totalmente esclarecida, tanto em ensaios clínicos como em estudos experimentais ⁷. Enquanto que estudos epidemiológicos prospectivos não encontraram uma ligação etiológica específica entre crises convulsivas na tenra idade, epilepsia crônica e danos cerebrais causados por este processo, estudos retrospectivos demonstraram associação entre convulsões na infância, perda acentuada de neurônios hipocampais e gliose em pacientes com epilepsia do lobo temporal refratária ⁸⁻¹³.

Muitos destes processos epileptogênicos ocorrem somente durante uma janela de desenvolvimento crítica para o aprendizado, sinaptogênese e plasticidade neuronal. Os eventos transitórios – febre, hipóxia ou traumatismo cranioencefálico –, em determinadas fases do desenvolvimento, podem gerar um insulto pró-convulsivante ¹⁴⁻¹⁶. Enquanto as convulsões geradas por hipóxia ocorrem mais frequentemente nos neonatos, crises febris têm maior incidência em crianças entre 6 meses e 5-6 anos de idade, e as crises convulsivas decorrentes de traumatismo cranioencefálico são mais frequentes em crianças maiores ^{17, 18}.

No neonato, um grande espectro de complicações sistêmicas e do sistema nervoso central (SNC) pode contribuir para o desencadeamento de crises convulsivas (tabela 1). A encefalopatia hipóxico-isquêmica é um dos principais distúrbios associados às crises convulsivas neonatais, ocorrendo em aproximadamente 1-2/1000 nascidos vivos ^{18, 19}. Acima de 70% das crianças que sofreram crises comprovadas por registro EEG e induzidas por hipóxia decorrente de complicações no parto apresentam complicações que podem variar de leves disfunções comportamentais até sequelas graves ^{20, 21}.

Tabela 1 - Etiologia das crises convulsivas neonatais**Metabolismo**

Hipoglicemia, hipocalcemia, hipomagnesemia, hiponatremia ou hipernatremia
 Síndrome da abstinência associada com abuso de drogas materno
 Iatrogenia associada à administração fetal inadvertida de anestésicos locais
 Erros inatos do metabolismo

Cerebrovascular

Acidente vascular cerebral isquêmico arterial ou venoso
 Hemorragia intracerebral, intraventricular, subdural ou subaracnóide

Infecções do SNC

Meningite bacteriana
 Meningoencefalite viral
 Infecções intraútero TORCH

Desenvolvimento

Múltiplas formas de disgenesia cerebral

Síndromes genéticas raras

Convulsões neonatais benignas familiares
 Encefalopatia mioclônica precoce

Encefalopatia hipóxico-isquêmica

Fonte: Silverstein e Jensen (2007, p. 114).

As principais causas que resultam na hipóxia perinatal são complicações na gestação e no trabalho de parto, com sofrimento fetal, prematuridade e suas complicações ⁷. Infelizmente, não há nenhuma intervenção para RN com encefalopatia hipóxica que possa prevenir os prejuízos cerebrais e sequelas neurológicas, mesmo quando não há lesão evidente de estruturas cerebrais ²². Além disso, a grande variabilidade de tentativas terapêuticas reflete a falta de padronização diagnóstica e protocolos de tratamento, principalmente nos casos de refratariedade imediata à terapia com fenobarbital ³.

Processos hipóxicos graves podem resultar em crises frequentes na primeira semana de vida, mesmo sob diversas intervenções farmacológicas. Geralmente, tais crises são recorrentes e prolongadas, requerendo politerapia associada à intensa sedação com barbitúricos e benzodiazepínicos. Um estudo randomizado concluiu que a administração combinada de fenobarbital com fenitoína controla em torno de 60% as crises convulsivas neonatais. No entanto, quando administradas separadamente, estes fármacos possuem efeito anticonvulsivante semelhante, mas eficaz em menos da metade dos neonatos ²³. Portanto, as crises neonatais podem ser refratárias às drogas anticonvulsivantes disponíveis, determinando maior risco para sequelas neurológicas.

Atualmente, o fenobarbital permanece sendo a terapia de primeira escolha para o tratamento das crises neonatais. No entanto, existem poucas evidências na literatura médica que sustentam o emprego da maioria dos fármacos anticonvulsivantes no período neonatal ²⁴. Estudos experimentais demonstram, também, os potenciais efeitos adversos, no cérebro em

desenvolvimento, dos anticonvulsivantes atualmente usados e com pobre eficácia sobre o controle das crises¹⁹. A preocupação concentra-se no risco-benefício do tratamento das crises convulsivas neonatais, e o aconselhável é que este seja o mais breve possível. Para que se possa definir a duração do tratamento, deve-se levar em consideração a etiologia das crises, o tipo de crise, e os resultados EEG e de neuroimagem. Assim, a tendência atual é tratar por um curto período os pacientes neurologicamente intactos, e, por tempo maior, aqueles com alterações neurológicas ou no desenvolvimento neuropsicomotor⁴.

1.1.1 Imaturidade do sistema nervoso central

Embora exista um atual, mas sutil, progresso de tratamentos efetivos para crises convulsivas neonatais – sejam elas atribuídas a hipóxia perinatal ou a qualquer outro insulto –, é crescente o entendimento da sua fisiopatologia. Em especial, estudos contribuíram para a identificação de fatores que influenciam no mecanismo epileptogênico, responsividade aos anticonvulsivantes e ao impacto das crises neonatais e de hipóxia sobre a integridade do SNC¹⁹.

Sabe-se que o cérebro imaturo responde diferentemente às crises convulsivas e está muito mais favorável a desenvolvê-las do que o adulto. Diversos estudos tentaram elucidar os mecanismos de ação pelos quais estas crises promovem o aparecimento de desfechos prejudiciais. Em modelos animais, constatou-se que morte celular parece não ser pré-requisito para as conseqüências de convulsões no período neonatal. A reorganização de conexões axonais (*sprouting*) também ocorre no cérebro imaturo, embora em localização e padrão diferenciados da que ocorre em animais adultos. Também, acerca da neurogênese em cérebro de animais imaturos, verificou-se um padrão distinto daquele apresentado em animais maiores após crises convulsivas²⁵.

O entendimento da maior suscetibilidade de RNs desenvolverem eventos convulsivos tem sido reforçado a partir da constatação que a expressão de determinadas subunidades de receptores glutamatérgicos ionotrópicos é idade dependente – receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) –, acentuando-se entre o 7º e 14º dias pós-natal. No entanto, a expressão de receptores de kainato tem pico mais tardio (figura 1)⁵. A subunidade NR2B de receptores NMDA é predominante no cérebro imaturo, e esta conformação resulta em um tempo prolongado sobre o decaimento de corrente

quando comparada à subunidade NR2A, altamente expressa em neurônios maduros. Também em relação a outras conformações de heterodímeros de receptores NMDA, a expressão de subunidades NR2C, NR2D e NR3A está aumentada nas primeiras duas semanas pós-natais em roedores, o que promove sensibilidade reduzida ao magnésio e consequente aumento da excitabilidade ¹⁹.

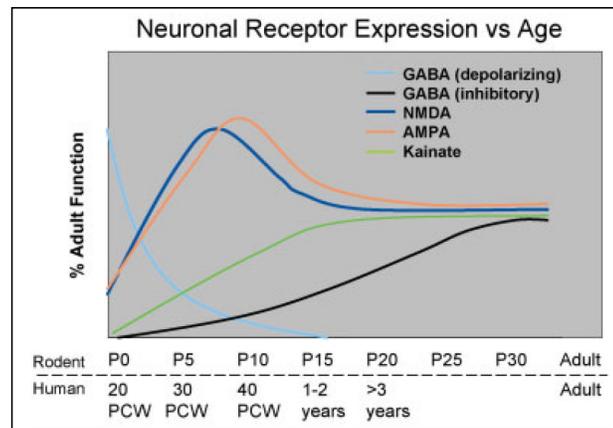


Figura 1 – Maturação de receptores glutamatérgicos e gabaérgicos no cérebro em desenvolvimento de ratos e de humanos. Padrões de desenvolvimento de ratos e humanos são apresentados nas porções superior e inferior eixo X, respectivamente. Receptores gabaérgicos são despolarizantes logo no início da primeira semana pós-natal em ratos, enquanto que em humanos este fato permanece além do período neonatal. A função inibitória de receptores gabaérgicos aumenta gradativamente ao longo do desenvolvimento. Antes da total maturação inibitória mediada por GABA, receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA atingem máxima função entre a primeira e a segunda semana pós-natal em ratos e no período neonatal em humanos. Receptores de glutamato do tipo kainato estão inicialmente pouco expressos e gradualmente atingem níveis adultos a partir da quarta semana pós-natal. Desta forma, no período pós-natal há predomínio de excitação sináptica sobre mecanismos inibitórios. Fonte: Silverstein e Jensen (2007, p. 115).

Notavelmente, a maioria dos receptores AMPA e kainato no cérebro desenvolvido apresenta permeabilidade relativamente baixa a íons cálcio, mas uma grande proporção destes canais é permeável em neurônios imaturos. Receptores AMPA com ausência de subunidades GluR2(B) exibem permeabilidade significativamente maior ao cálcio que aqueles com esta subunidade. Além disso, a razão da expressão de GluR2(B) frente a outras subunidades de receptores AMPA é menor no neocórtex e hipocampo imaturo se comparados com adultos ²⁶.

A excitabilidade fisiológica do RN é influenciada pela resposta despolarizante de receptores tipo ácido γ -aminobutírico (GABA) quando estimulados, ao passo que ocorre resposta hiperpolarizante no cérebro de adultos. Mesmo desempenhando papel inibitório em redes neuronais desenvolvidas, GABA tem ação inicial excitatória devido à maior concentração de íons cloro em neurônios imaturos se comparada com neurônios de um cérebro adulto. Esta transformação é mediada por uma modificação na expressão do

cotransportador de cloro KCC2, que promove efluxo destes íons a fim de estabelecer concentração intracelular de cloro compatível com o padrão adulto. Em contrapartida, a expressão do cotransportador NKCC1 está aumentada, o que facilita o desenvolvimento de crises convulsivas no cérebro em desenvolvimento²⁷.

A despolarização de neurônios imaturos com GABA é suficiente para gerar potenciais de ação e remover o bloqueio voltagem dependente de íons magnésio. Isto ocasiona um grande influxo de cálcio, provocando mudança a longo prazo na eficácia sináptica (figura 2). Esta maturação é dinâmica e a expressão de KCC2 é atividade dependente e suprimida por crises convulsivas e outras lesões neurológicas. Após crises convulsivas recorrentes *in vitro*, GABA exerce função excitatória, indicando que há uma mudança para um estado imaturo e interrupção nas vias de desenvolvimento persistente. Este fenômeno também é verificado em tecido neuronal de pacientes com epilepsia, sugerindo que epileptogênese possa recapitular a ontogênese neuronal²⁸.

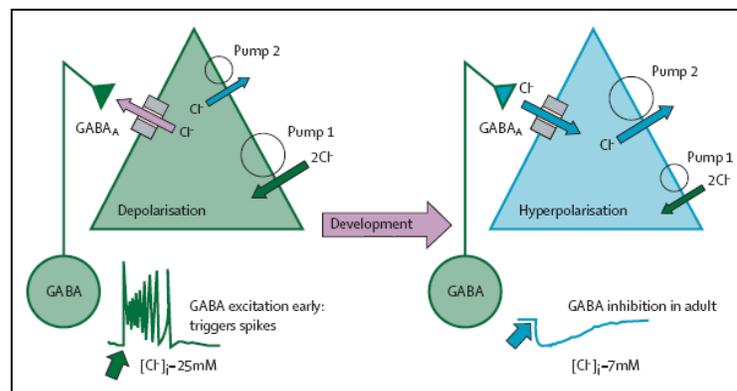


Figura 2 – Ações excitatórias do GABA e alterações na concentração intracelular de cloro. O triângulo verde representa um neurônio imaturo, e o azul, um totalmente desenvolvido. O primeiro diagrama apresenta expressão aumentada do cotransportador NKCC1 (*Pump 1*), que importa e eleva a concentração de íons cloro em neurônios imaturos, enquanto que o efluxo mediado pelo cotransportador KCC2 (*Pump 2*) destes íons não é eficiente. Isto resulta numa concentração intracelular de cloro maior num estágio precoce e efluxo de cloro quando houver ativação de receptores gabaérgicos, promovendo despolarização. A partir da segunda semana pós-natal, o sistema gabaérgico apresentará função hiperpolarizante devido à maior expressão de KCC2 e diminuição de NKCC1, que decresce a concentração intracelular de cloro, promovendo influxo de cloro quando houver ativação de receptores GABA_A. Fonte: Ben-Ari e Holmes (2006, p. 1057).

Além de existir maior densidade sináptica e de espinhos dendríticos do nascimento até os primeiros meses de vida, observou-se um controle ineficaz das concentrações extracelulares de potássio e glutamato pelos astrócitos. Diferentemente, no cérebro de adultos, a regulação de microambientes neuronais iônicos é possível através da atividade glial totalmente desenvolvida, promovendo, assim, controle adequado da excitabilidade neuronal²⁹.

Estruturas subcorticais passam a funcionar como amplificadores da atividade epileptogênica no SNC imaturo, como é o caso da *substantia nigra pars reticulata*. Sabe-se que no adulto esta estrutura cerebral possui pelo menos duas projeções independentes e mediadas por receptores GABA_A envolvidas na sua regulação sobre crises convulsivas. Enquanto a região anterior-medial da *substantia nigra pars reticulata* está associada com efeitos anticonvulsivos, a região posterior-dorsal está relacionada com ação pró-convulsivante. No entanto, a suscetibilidade a crises convulsivas em filhotes de ratos pode ser justificada, em parte, por um atraso na maturação da região anterior-medial, mesmo com a rede antagonista funcionando³⁰.

Estudos realizados em fatias hipocâmpais de roedores indicam que o mais baixo limiar para geração de crises convulsivas ocorre em torno da segunda semana pós-natal. De fato, é exatamente nesta fase de desenvolvimento que há maior incidência de crises convulsivas causadas por hipóxia cerebral⁵. Nesta etapa de desenvolvimento do SNC, dois fatores convergem: uma mudança enorme na ação excitatória do GABA – ainda não completamente eficiente na hiperpolarização inibitória –, e a formação de sinapses glutamatérgicas, que pode facilitar a propagação de crises convulsivas. A forte correlação entre o desaparecimento deste padrão de oscilação primitivo e a mudança do sistema gabaérgico, juntamente com limiar diminuído para crise, reforça a importância maturacional deste sistema (figura 3)²⁸.

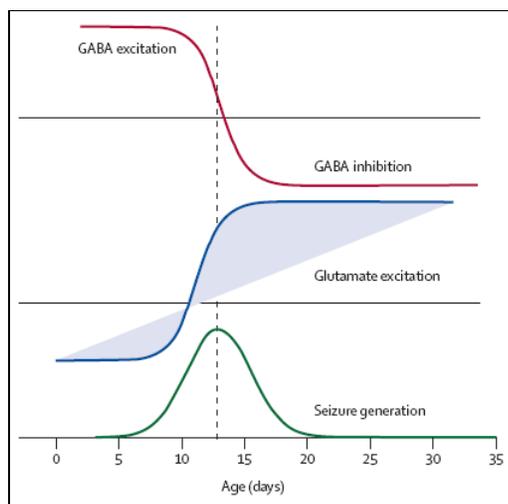


Figura 3 – Mudanças de desenvolvimento no limiar da geração de crises. Em fatias hipocâmpais, crises epileptiformes são prontamente geradas em torno da segunda semana pós-natal. Isso corresponde ao pico de mudança de ação gabaérgica – quando GABA é menos excitatório mas ainda não totalmente inibitório –, e a densidade de sinapses glutamatérgicas é próxima daquela de adultos. Portanto, crises serão geradas facilmente e propagadas como resultado de uma rede glutamatérgica relativamente densa. Fonte: Ben-Ari e Holmes (2006, p. 1058).

1.1.2 Bases celulares e moleculares dos processos hipóxicos e crises convulsivas

Em relação às consequências metabólicas de eventos ictais, estados convulsivos provocam a interrupção da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) cerebral, assim como na síntese e transporte de proteínas e lipídeos, com consequente necrose neuronal, alterações na proliferação e diferenciação neuronal, além de prejuízos na mielinização e sinaptogênese. Todos estes processos estão associados à depleção energética, já que o transporte alterado de glicose disponibiliza substratos energéticos inadequados⁵.

O dano oxidativo induzido por crise convulsiva tem sido demonstrado através da determinação de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, um aduto de guanina oxidativamente modificado. A administração sistêmica de ácido kaínico em ratos adultos produz um aumento significativo deste marcador, sugerindo um envolvimento de dano oxidativo ao DNA mitocondrial prévio à morte neuronal neste modelo. Além disso, foi possível verificar uma diminuição transitória da tensão de O₂ hipocampal em 6 horas após indução de crise convulsiva por ácido kaínico. Acredita-se que a fase hipóxica acompanha o *status epilepticus* e a tensão de O₂ retorna à normalidade assim que a atividade epileptiforme cessa. O aumento precoce de espécies reativas de oxigênio (ERO) gerado por crises convulsivas foi identificado em 8 horas após injeção de ácido kaínico, tendo máxima produção após 16-24 horas, tempo este inversamente proporcional à fase hipóxica observada em Patel (2008). Assim, a produção de ERO e sua atuação em alvos suscetíveis à oxidação é baixo durante a fase hipóxica, ao passo que a formação destes compostos pode ocorrer como resultado da reoxigenação tecidual³¹⁻³³.

A hipóxia cerebral também resulta em depleção de compostos altamente energéticos por mecanismos metabólicos dependentes de energia em neurônios e células gliais. Embora as consequências da hipóxia perinatal possam ser observadas clinicamente no período pós-natal, os processos patológicos agudos precedentes ao início do dano cerebral ainda não estão totalmente esclarecidos. Tais fenômenos não são exclusivos da fase aguda do processo hipóxico, mas também abrange o processo de reoxigenação pós-hipóxia³⁴.

Está comprovado que hipóxia cerebral é capaz de induzir a geração de radicais livres, como óxido nítrico, a partir da ativação de receptores NMDA. Com aumento da Ca²⁺ intracelular, diversas vias enzimáticas para geração de radicais livres são ativadas, tais como: fosfolipase A2, metabolismo do ácido araquidônico pela ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, conversão da xantina desidrogenase à xantina oxidase através de proteases, e ativação da

óxido nítrico sintase. O aumento na produção destes compostos promove peroxidação lipídica de membranas, e diminuição da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, podendo induzir necrose³⁵.

A fragmentação de DNA tem sido considerada uma etapa essencial para a morte celular durante a apoptose. A hipóxia resulta em aumento da fragmentação do DNA nuclear neuronal, sendo que o nível de fragmentação é diretamente proporcional ao grau de hipóxia cerebral. O mecanismo pelo qual ocorre fragmentação no DNA frente ao processo hipóxia tem sido elucidado nos últimos anos. Inicialmente, há ativação de receptores nucleares (IP3 e Ca^{2+} -ATPase de alta afinidade) que promovem aumento do influxo nuclear de Ca^{2+} . Este processo ativa a proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo IV (CaM cinase IV) e subsequente fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP-cíclico (CREB). A fosforilação da CREB acaba por estimular a transcrição de proteínas apoptóticas, como Bax e Bad. O aumento da razão Bax/Bcl-2 durante a hipóxia inicia a cascata de ativação da caspase-9, que é mediada pelo fator-1 ativador e, subsequentemente, ativa a caspase-3 efetora. Através da ativação da caspase-3, ocorre a quebra do inibidor da DNase ativada por caspase, liberando DNase ativada por caspases livres que se movem em direção ao núcleo celular. Estas subunidades formam um homodímero e tornam-se endonucleases ativas que degradam o DNA cromossomal. Em paralelo, o aumento do Ca^{2+} citosólico leva a ativação de enzimas dependentes de Ca^{2+} , incluindo óxido nítrico sintase, que resulta na produção de óxido nítrico. A fragmentação de DNA em neurônios corticais de porcos recém-nascidos durante a hipóxia também pode ser mediada por óxido nítrico, através de vias dependentes e independentes de transcrição. Portanto, o processo de fragmentação pode ser resultante da ação de endonucleases dependentes de Ca^{2+} , assim como da geração de radicais livres³⁶.

Levando em consideração todos estes mecanismos celulares envolvidos na hipóxia, aceita-se que exista um papel central do óxido nítrico na lesão cerebral mediada por hipóxia. O que justifica esta hipótese é que quando administrado um inibidor enzimático específico, como N-nitro-L-arginina (inibidor da óxido nítrico sintase), ocorre prevenção de diversos mecanismos próprios da hipóxia cerebral, como geração de radicais livres, nitração das subunidades de receptores NMDA, ativação da CaM cinase IV, aumento da fosforilação da CREB no resíduo serina 133, expressão aumentada da proteína apoptótica Bax e fragmentação do DNA nuclear³⁵.

Segundo Curristin e colaboradores (2002), hipóxia moderada e subletal, em ratos P3 altera, irreversivelmente, algumas etapas importantes de maturação do SNC, afetando o potencial cognitivo e de desenvolvimento. Além do estresse e respostas metabólicas geradas pela hipóxia, ocorre o fenômeno denominado *dissincronia*, ou seja, uma perda do equilíbrio

na expressão de genes requeridos para efetivar coordenação adequada de estruturas sinápticas. Neste estudo, demonstrou-se que genes envolvidos na formação sináptica e transmissão neuronal estão entre os mais alterados, havendo superexpressão de genes pré-sinápticos e supressão de genes pós-sinápticos ou genes relacionados à maturação sináptica (pré ou pós-sináptica). Adicionalmente, genes envolvidos na mielinização e organização do citoesqueleto celular estão significativamente alterados, e vias responsivas à hipóxia estimulam angiogênese, alteração da permeabilidade vascular e do controle da diferenciação neuronal ³⁷.

1.1.3 Modelo Animal de Crises Convulsivas Induzidas por Hipóxia Neonatal

Frente às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das crises convulsivas neonatais, a complexidade de estudos em humanos torna a pesquisa, neste enfoque, passível de variabilidade. Com a dificuldade de separação entre os efeitos de tipo de crise, duração, frequência, e etiologia sobre o desfecho, em estudos clínicos, a utilização de animais é pertinente quando estas variáveis são controladas ²⁵. Sendo assim, modelos animais permitem investigações controladas e prospectivas, assim como a utilização de intervenções e desdobramentos dos mecanismos envolvidos. Estes modelos podem ser adequados quando conseguem mimetizar a dependência de idade para com o fenômeno em questão, e, também, apresentar complicações agudas e crônicas que são observadas clinicamente ⁷.

Inicialmente, Chiba (1985) demonstrou que ratos com idade pós-natal 10 (P10), após breve privação de O₂, apresentaram suscetibilidade aumentada para geração de crises por pentilenotetrazol e eram mais facilmente submetidos ao *kindling* quando adultos ³⁸. Posteriormente, resultados similares foram verificados por Matsumoto (1990) ³⁹. Embora uma precisa correlação do perfil de desenvolvimento entre humanos e roedores seja ainda um foco de discussão, evidências de crescimento cerebral e processos de mielinização sugerem que as primeiras duas semanas de desenvolvimento pós-natal de ratos são compatíveis com o período de transição da lactância para a infância em humanos ⁴⁰. Foi exatamente nesta fase que Jensen e colaboradores (1991) estabeleceram um modelo no qual um curto período de hipóxia era capaz de gerar crises convulsivas em ratos P10-12 ⁴¹. No entanto, ratos com menor tempo de vida (P5-7) ou mais velhos (P15-60) não apresentam resposta convulsivante quando submetidos a um episódio de hipóxia global (figura 4) ^{42, 43}. A resposta característica destes animais são crises tônico-clônicas acompanhadas de atividade paroxística no EEG, com foco

epileptogênico no hipocampo e neocórtex⁴⁴. Através deste modelo, foi possível confirmar os achados de Chiba (1985) e Matsumoto (1990) quanto à diminuição do limiar de crise, ausência de perda neuronal, *sprouting* ou gliose, associados com CH.

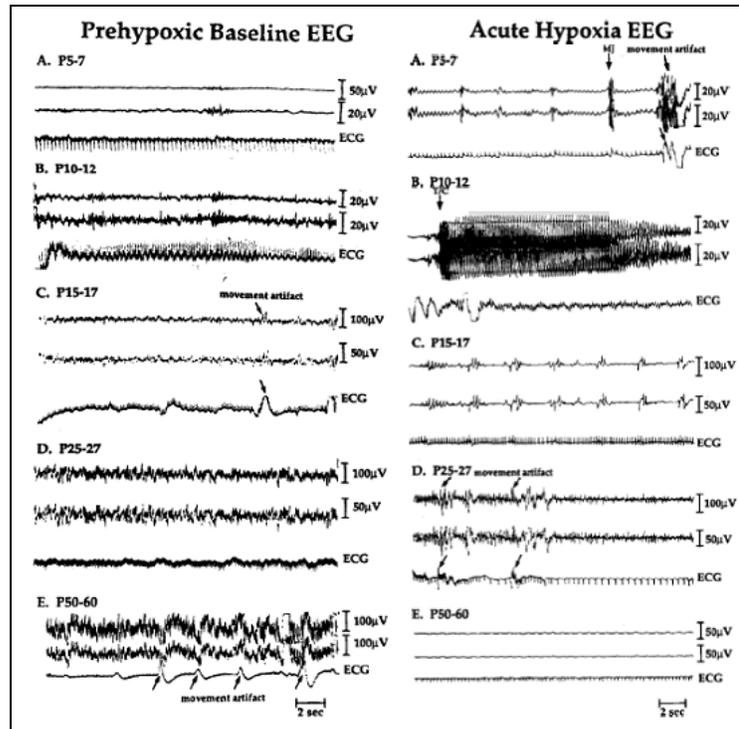


Figura 4 – Registros EEG e eletrocardiograma de ratos submetidos à hipóxia em diferentes idades. Registros EEG (acima) e de eletrocardiograma (abaixo) basal (coluna esquerda) e durante hipóxia (coluna direita). Ratos P10-12 apresentaram atividade ictal bem frequente, enquanto que animais com menos ou mais idade não tiveram eventos epileptiformes de severidade semelhante. Fonte: adaptação de Jensen (1991, p. 631-2).

Acerca de distintas inferências metodológicas, ratos P10-11 expostos à hipóxia demonstraram latência para geração de crises diminuída, na fase adulta, quando estimulados com fluorotil, ácido kaínico e pentilenotetrazol^{22, 43, 45}. Sobre a morte neuronal neste modelo animal, constatou-se que apenas a região do mesencéfalo apresentou diminuição significativa do número de células neuronais, enquanto que hipocampo e córtex temporal permaneceram intactos⁴⁵. A princípio, sabe-se que crises prolongadas e *status epilepticus* em roedores de pouco tempo de vida causam mínima lesão cerebral, ao contrário do que é observado comumente nas extensas lesões hipocâmpais e límbicas no cérebro de ratos adultos. Estas distintas constatações não só estão relacionadas à morte neuronal induzida por crise convulsiva, mas também atribuídas à conectividade neuronal alterada e expressão de

receptores específicos ⁴⁶. Por fim, verificou-se também que a expressão gênica de *c-fos* é induzida em neurônios do hipocampo e córtex até 4 horas após CH em ratos P10 ⁴⁷.

No trabalho de Chen e colaboradores (2007), foi observada uma redução crônica dos níveis de fosforilação da CREB no resíduo serina 133, da proteína pós-sináptica de densidade 95 (PSD-95), e do complexo PSD-95 acoplado às subunidades dos receptores NMDA (NR1, NR2A e NR2B), mesmo na ausência de perda neuronal na área hipocampal de CA1 de animais previamente expostos à hipóxia com 10 dias de vida. Além disso, estes animais apresentaram alteração crônica da memória de longa duração no labirinto aquático de Morris, em concordância com os resultados de Yang e colaboradores (2004) e Mikati e colaboradores (2005), mas não com Jensen e colaboradores (1992) ^{43, 48, 49}. No entanto, a ativação dos receptores dopaminérgicos D1/D5 – através da administração contínua do agonista A68930 em P17-24 –, resultou em melhora significativa no desfecho cognitivo, assim como aumento da expressão do complexo PSD-95/NMDA e fosforilação do resíduo serina 133 ⁵⁰.

A partir de estudos eletrofisiológicos em fatias hipocampais de ratos – tanto após hipóxia em P10, como de adultos previamente expostos –, verificou-se aumento da excitabilidade hipocampal e da suscetibilidade à crise. Em ambos casos, a amplitude e duração da potenciação de longa duração na área hipocampal CA1 estavam acentuados em comparação aos animais controle. Registros extracelulares nas áreas CA1 e CA3 apresentaram duração pós-disparo significativamente aumentada em resposta ao *kindling* de ratos hipóxicos. Verificou-se, também, maior indução de descargas ictais em CA1 de fatias hipocampais provenientes de animais hipóxicos, quando estas foram perfundidas com meio livre de magnésio. Estes dados sugerem que, mesmo na ausência de lesão morfológica ou morte neuronal evidente, houve alteração funcional da excitabilidade hipocampal de maneira aguda e crônica, devido a um insulto convulsivo breve e induzido por hipóxia cerebral durante um período crítico do desenvolvimento do SNC ⁵¹.

Neste respectivo modelo, CH são relativamente refratárias à administração de antagonistas de receptores NMDA (lorazepam ou MK-801), mas não de receptores AMPA (topiramato e NBQX) ^{22, 52}. Partindo destas constatações, concluiu-se que as crises convulsivas são dependentes da ativação de receptores AMPA, verificando também que há expressão diminuída de subunidade GluR2 (limitador do influxo de Ca^{2+} pelo canal iônico) no hipocampo e neocórtex, em até 72-96 horas após hipóxia, em ratos P10 ⁵³. Ao contrário do que ocorre na morte neuronal decorrente da excessiva ativação de receptores NMDA em animais adultos, o influxo de Ca^{2+} através de receptores AMPA, pobres em subunidades

GluR2 em ratos imaturos, produzem resultados histológicos benignos, mas não menos patológicos.

Recentemente, constatou-se que a estimulação de receptores AMPA pelo processo epileptogênico da hipóxia resulta na ativação imediata da fosfatase calcineurina (CaN) na região hipocampal CA1. Além disso, demonstrou-se que a defosforilação das subunidades $\beta 2/3$ de receptores GABA_A e consequente diminuição da funcionalidade são dependentes da ativação de CaN, resultante de níveis elevados de Ca²⁺ intracelular. Em contrapartida, quando os animais foram pré-tratados com a droga imunossupressora FK-506 (inibidor de CaN), houve prevenção da ocorrência de CH. Também, através de registros eletrofisiológicos de *patch-clamp* de fatias cerebrais preparadas imediatamente após indução de CH em ratos P10, observou-se diminuição da amplitude e frequência de correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas (sIPSCs; *spontaneous inhibitory postsynaptic currents*) e em miniatura (mIPSCs; *miniature inhibitory postsynaptic currents*) de neurônios hipocampais de CA1. Sendo assim, os dados sugerem que receptores AMPA permeáveis a Ca²⁺ e, também, a fosfatase CaN tem regulação sobre a supressão inibitória aguda da transmissão sináptica, contribuindo assim para a hiperexcitabilidade hipocampal decorrente das CH⁴⁶.

Conforme Sanchez e colaboradores (2007), observou-se que mesmo após 3-5 dias da indução de CH em ratos P10, pode-se ainda verificar diminuição de frequência e amplitude de sIPSCs e diminuição de amplitude de mIPSCs de neurônios piramidais de CA1. Curiosamente, uma semana após insulto inicial, apenas a frequência de sIPSCs no grupo hipóxico permaneceu diminuída. Enquanto as modificações agudas podem ser justificadas pela atividade da CaN e rápida desregulação de componentes pré e pós-sinápticos da transmissão inibitória, estes dados sugerem que a diminuição persistente da frequência de sIPSCs possa ser resultado da diminuição do disparo espontâneo de interneurônios inibitórios pré-sinápticos⁵⁴.

Todas estas informações são de extrema importância, pois através desse conhecimentos pode-se identificar alvos terapêuticos celulares ou moleculares que irão viabilizar estratégias de reversão das consequências a longo prazo, e não apenas controle anticonvulsivante. Estudos com modelos animais e ensaios clínicos devem manter sintonia a fim de avaliar a segurança na correlação de dados de roedores em relação à extrapolação para humanos. Para tal, a colaboração interdisciplinar entre neurocientistas e neurologistas torna-se essencial para garantir sucesso nestes estudos¹⁹.

Enquanto que os achados e deduções dos modelos animais dão suporte à ideia que epileptogênese e déficits cognitivos resultam de crises neonatais, estas constatações

contrastam com investigações clínicas, sugerindo que crises neonatais são marcadores sintomáticos de neuropatologias ou transtornos metabólicos pré-existentes ou em desenvolvimento. Mesmo com diversos trabalhos de alta qualidade em modelos animais de crises convulsivas, ainda não há evidências convincentes de que crises neonatais *per se* são o causa original da epileptogênese. Acredita-se também que um fator de predisposição está envolvido nas crises neonatais e suas consequências, visto que um mesmo insulto é capaz de gerar distintas reações entre os neonatos. Desta forma, um ampla variedade etiológica das crises neonatais é um critério de confusão entre pesquisas clínicas e experimentais. Segundo Lombroso (2007), o mais importante a ser destacado é que sempre a mais grave etiologia está correlacionada com o pior desfecho das crises convulsivas neonatais, e não a duração ou frequência do fenômeno ictal ⁵.

1.2 DANO AO DNA NEURONAL

Neurônios são células extremamente ativas e metabolizam acima de 20% do oxigênio consumido por um organismo. Apesar do intenso metabolismo de oxigênio neuronal, a capacidade neutralizadora de EROs que estas células produzem é restrita. O cérebro é um tecido particularmente suscetível a lesões oxidativas em razão da sua reduzida proporção de defesas antioxidantes, em relação ao nível de metabolismo de oxigênio, do elevado conteúdo lipídico e pelo fato dos neurônios em estado quiescente não possuírem mecanismos de reparação de DNA ativos em fase de divisão mitótica. Altos níveis de EROs podem acarretar em acúmulo de danos para várias macromoléculas celulares. Uma destas estruturas gravemente afetada por agentes danosos intracelulares ou extracelulares é o DNA. Além disso, neurônios são altamente diferenciados, células pós-mitóticas que não podem ser repostas após doenças degenerativas e traumatismos que afetam a integridade do seu sistema. Assim, se estas células não podem ser amplamente substituídas fisiologicamente e deveriam sobreviver até o momento que o organismo permitir, é necessária a atuação de mecanismos de defesa que garantam a sua devida manutenção ⁵⁵.

Além das EROs, o DNA nuclear pode ser lesionado por radiação ionizante, luz ultravioleta, diversos metabólitos celulares e agentes químicos. As lesões provocadas por estes fatores podem ser quebras simples e duplas, colapso da forquilha de replicação, danos oxidativos, distorções da hélice, intercalações, pontes intra e intercadeias e lesões volumosas.

Quebras simples no DNA são as primeiras a serem detectadas por proteínas “sensores” – como o complexo MRN (Mre11, Rad50 e Nbs1) –, que reconhecem lesões ou alterações na cromatina. Em resposta, ocorre a ativação de cinases “transdutoras”, como ATM e ATR. Estas são capazes de fosforilar um grande número de proteínas “efetoras” que sinalizam outros processos celulares, conforme o tipo de lesão identificado inicialmente. Isto inclui a ativação de uma vasta gama de respostas ao estresse e mecanismos de reparo do DNA. Enquanto que quebras de fita dupla são reparadas tanto por junção terminal não homóloga ou recombinação homóloga, bases ou nucleotídeos podem ser reparados pela via de reparo de erro de emparelhamento, reparo por excisão de nucleotídeos e reparo por excisão de bases.

Em células em proliferação, a resposta ao dano no DNA apropriada inibe a progressão do ciclo celular e, em paralelo, ativa a transcrição de genes específicos. Quando ocorre a replicação de células com danos não reparados efetivamente, pode acarretar em transformações malignas. Quando a quantidade de danos no DNA exceder a capacidade de reparo destes, tais células ativam vias de apoptose. Respostas adequadas aos danos no DNA são fundamentais não apenas para o desenvolvimento neuronal normal, mas devem ocorrer durante toda a existência de um organismo (figura 5) ⁵⁵.

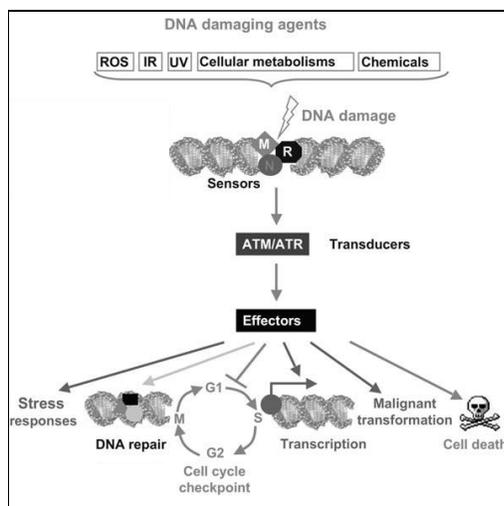


Figura 5 – Representação da ativação de resposta ao dano no DNA. Fonte: Barzilai (2007, p. 213).

A importância do processo de reparação do DNA no sistema nervoso é demonstrada pelos desfechos neurológicos observados em pacientes com doenças congênitas vinculadas com este mecanismo. Defeitos específicos em genes associados aos complexos de reparo implicam patogênese de anormalidades neurológicas, tais como xeroderma pigmentoso, ataxia-telangiectasia e nas síndromes de Cockayne, Werner e Bloom ⁵⁶.

A fragmentação do DNA é um marcador bioquímico de lesão celular, e esta marcação pode demonstrar a vulnerabilidade seletiva de populações neuronais. Ao passo que danos ao DNA podem ser potentes sinalizadores de morte celular, estes também podem ser, alternativamente, uma consequência da ativação deste mesmo processo. O DNA fragmentado pode conter quebras simples ou duplas, com extremidades cegas ou coesivas nas regiões 3' ou 5'. O tipo de fragmentação é dependente do insulto, no qual quebras simples da cadeia de DNA representam danos potencialmente reparáveis induzidos por estresse oxidativo, por exemplo. Já quebras duplas na cadeia de DNA podem ser induzidas pelo efeito irreversível de endonucleases ativadas⁵⁷.

1.2.1 Dano Oxidativo ao DNA Neuronal

O estresse oxidativo é um processo no qual a proporção de agentes pró e antioxidantes está em desequilíbrio, ocasionando dano a macromoléculas vitais para homeostase celular. Desse modo, este tipo de insulto ocorre quando a produção de ERO excede a capacidade de defesa dos sistemas antioxidantes intracelulares. Para este propósito, a concentração de oxigênio (O₂) celular é mantida em uma estreita faixa de normóxia, a fim de prevenir os riscos de dano oxidativo provenientes do seu excesso (hiperóxia) e da falha metabólica quando ocorre insuficiência do mesmo (hipóxia). Portanto, a manutenção da homeostase dos níveis de O₂ é fundamentalmente importante para o funcionamento neuronal adequado⁵⁸.

Os danos oxidativos, em sua maior parte, induzidos por ERO abrangem coletivamente os radicais de oxigênio, tais como superóxido, hidroxil, peroxil, alcoxil e os derivados não radicalares potencialmente oxidantes, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂)⁵⁹. Assim, EROs são capazes de danificar diferentes biomoléculas, tais como lipídeos, proteínas, glicídeos, e ácidos nucleicos (RNA e DNA), desencadeando estresse oxidativo e, conseqüentemente, a morte celular. Especificamente no DNA, tais agentes produzem uma série de lesões que danificam bases e desoxirriboses, causando quebras simples de cadeia, criando sítios apurínicos e/ou apirimidínicos (sítios AP) e promovendo ligações cruzadas entre DNA e proteínas. Dentre os mais de 30 diferentes adutos que as EROs podem formar, a 8-oxoguanina é o produto de dano oxidativo de base melhor caracterizado, sendo fortemente mutagênico *in vitro* e *in vivo*, causando transversões guanina/timina quando não reparado⁶⁰.

Primeiramente, a via de reparo de maior atuação em danos oxidativos neuronais atua por excisão de bases. As lesões oxidativas tendem a acumular-se nos neurônios com o passar do tempo, especialmente no DNA mitocondrial. Esta constatação pode estar relacionada com o envelhecimento e na patogênese de diversas doenças neurológicas, tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, nos processos de isquemia-reperfusão e hipóxia-reoxigenação, e traumatismo cranioencefálico. Estudos recentes demonstram que adutos de DNA e danos oxidativos estão aumentados no cérebro de pacientes parkinsonianos e no tecido da medula espinhal de pacientes com esclerose lateral amiotrófica. Estes achados indicam a importância de determinar o impacto do estresse oxidativo sobre a integridade neuronal em diversas neuropatologias⁵⁶.

1.2.2 Ensaio Cometa

O ensaio cometa (*single cell gel electrophoresis*) é um teste que permite a identificação de lesões do DNA em células eucarióticas. Através deste método, é possível a detecção de danos primários no DNA causados por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Dessa forma, é possível verificar diferentes tipos de lesão, tais como quebras simples ou duplas na cadeia de DNA, eventos de reparo por excisão incompletos, sítios alcalilábeis e *crosslinks* (ligações cruzadas) entre DNA-DNA/DNA-proteína/DNA-droga em células individuais⁶¹⁻⁶³.

A sua aplicabilidade é válida nos testes químicos para genotoxicidade, monitoramento de contaminação ambiental, biomonitoramento humano, epidemiologia molecular e pesquisa fundamental na reparação de dano ao DNA. Devido a sua simplicidade, sensibilidade, versatilidade, rapidez e economia, essa metodologia tem sido cada vez mais utilizada nas pesquisas científicas^{64, 65}.

Primeiramente descrito por Östling e Johanson em 1984, o teste baseia-se no comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização dentro da célula⁶⁶. Desta forma, um pequeno número de células, podendo ser proveniente de cultura, linfócitos periféricos ou de órgãos, é embebido em uma fina camada de agarose sobre uma lâmina de microscopia. As membranas são rompidas com detergente e proteínas nucleares extraídas com altas concentrações de sais, restando apenas um núcleo residual contendo DNA, denominado

nucleoide. Após eletroforese e coloração, células com dano no DNA apresentam migração, lembrando assim o formato de um cometa (figura 6) ⁶⁷⁻⁶⁹.

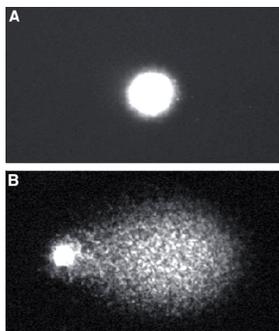


Figura 6 – Microfotografias de linfócitos humanos no ensaio cometa. (A) Célula controle. (B) Célula apresentando migração de DNA aumentada após tratamento com agente mutagênico. Fonte: Speit e (2006, p. 276).

Ao contrário do que acontece na eletroforese convencional, em que a distância de migração é inversamente proporcional ao tamanho dos fragmentos, no ensaio cometa o DNA não migra nesta mesma condição. A forma atualmente aceita para justificar o comportamento do DNA no respectivo teste é o modelo das alças. Basicamente, o nucleoide possui uma estrutura organizacional em que o DNA apresenta-se na forma de alças supertorcidas ou super-helicoidizadas. No entanto, quando o DNA é acometido por algum tipo de dano, ocorre um relaxamento destas alças em torno do nucleoide, permitindo, então, a formação de um halo migratório ^{61, 70}.

Células com DNA danificado formam um cometa quando submetidas ao teste, constituído de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda. Esta última compreende um halo resultante do relaxamento de alças super-helicoidizadas de DNA que são atraídas para o campo eletroforético positivo. Assim, a extensão da migração é proporcional ao grau de dano na molécula de DNA. Esta evidência proporciona uma medida indireta do número de quebras simples e duplas de cadeia no DNA ao nível celular individual, permitindo ser categorizado ⁷¹.

Portanto, pode-se deduzir que a cauda formada durante a etapa de eletroforese é consequência de lesões na molécula de DNA, permitindo a migração de alças na sua forma mais livre e pequenos fragmentos terminais ⁷⁰. Sabe-se que o teste cometa é sensível a danos acima de 50 quebras por célula diploide de mamífero e perde sensibilidade quando houver mais de 10.000 quebras por célula ⁶⁸. Adicionalmente, o teste cometa não necessita de crescimento celular e o tempo de detecção de dano ao DNA é curto ou mediano (minutos e

horas). No entanto, as lesões observadas são passíveis de reparação, não podendo ser inferidas como mutagênicas.

Para a quantificação e caracterização de cometas neste teste, é possível utilizar programas específicos ou análise visual. Enquanto que os parâmetros obtidos por *softwares* baseiam-se na fluorescência gerada pela coloração por brometo de etídio, por exemplo, a medida visual utiliza coloração com prata. As células são classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça (núcleo) em 4 classes de danos: classe 0, sem cauda (sem dano); classe 1, com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2, com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3, com uma cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; e classe 4, cauda longa e mais espalhada (em forma de leque) do que a classe 3 (figura 7). Se 100 núcleos são avaliados, e a cada um deles é designado um valor de 0 a 4 conforme sua respectiva classe, o índice de dano (ID) pode variar de 0 a 400 unidades arbitrárias. Este parâmetro está relacionado com a severidade das lesões. Já a frequência de dano é um indicativo do número de células com DNA lesado na população de núcleos analisados. Independentemente da técnica utilizada, há enorme correlação entre o método de avaliação visual e o método computadorizado (gráfico 1) ^{64, 72}.

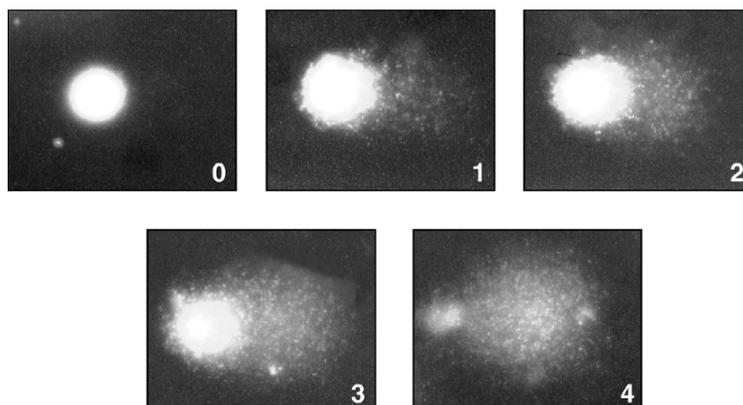


Figura 7 – Categorização de nucleoides. Imagens de nucleoides em forma de cometa, provenientes de linfócitos, corados com DAPI. Aqui estão representados os cinco tipos de classe. Fonte: Collins (2004, p. 255).

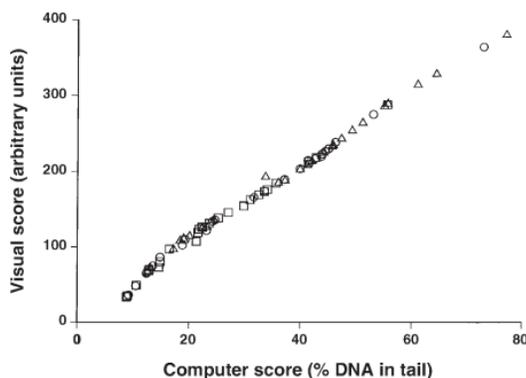


Gráfico 1 – Coerência metodológica na análise do ensaio cometa. Correlação positiva entre análise computadorizada (porcentagem de DNA na cauda) e categorização visual (unidades arbitrárias) em uma mesma amostra de leucócitos humanos. Fonte: Collins (2004, p. 255).

Basicamente, a versão alcalina do teste, que foi introduzida por Singh e colaboradores (1988), detecta todos os tipos de quebras induzidas diretamente no DNA fita simples e sítios álcali-lábeis. Estes sítios são locais apurínicos ou apirimidínicos formados a partir de bases perdidas que, em condição alcalina, são transformados em quebras simples na cadeia de DNA. É válido destacar que este método torna as migrações mais pronunciadas e amplifica o ID que pode ser detectado, mas não aumenta a sensibilidade do método ^{64, 67}. Já a versão neutra do ensaio cometa, segundo Olive e colaboradores (1991), facilita a detecção de quebras duplas sem a interferência de quebras simples (tabela 2) ⁷³. É importante destacar que quebras do tipo dupla ocorrem com menos frequência que simples, sendo estas importantes precursores de aberrações cromossômicas ⁶⁸.

Tabela 2 – Efeito do pH na identificação de danos no DNA

pH 7-8	pH 12	pH > 13
Quebras duplas	Quebras simples	Quebras simples
<i>Crosslinks</i>	Quebras duplas	Quebras duplas
	Reparo por excisão	Reparo por excisão
	<i>Crosslinks</i>	<i>Crosslinks</i>
		Danos alcali-lábeis

Fonte: Villela IV LA, Silveira J, Prá D, Rolla HC, Silveira JD. *Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental*. Ed. Alcance. Porto Alegre; 2003.

No entanto, a avaliação de quebras simples na cadeia de DNA fornece informações limitadas, já que estas são rapidamente reparadas e não são consideradas como lesões mutagênicas ou letais significativas. Muitos agentes lesivos ao DNA não induzem quebras diretamente, mas apenas criam locais vulneráveis, e provavelmente convertidos a quebras quando sob solução de eletroforese de alto pH ⁶¹.

Então, para tornar a pesquisa mais sensível e específica, introduziu-se uma nova etapa de digestão com enzimas de reparo sítio-específicas. Para cada tipo específico, os sítios sensíveis à enzima são identificados e convertidos em quebra, aumentando a cauda migratória do cometa. São exemplos: endonuclease III (Endo III) para detecção de pirimidinas oxidadas; formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg) para identificação de 8-oxoguanina, assim como outras purinas danificadas; T4 endonuclease V para com dímeros de ciclobutano pirimidina gerados por UV; AlkA que reage com 3-metiladeninas; e uvrABC que reconhece lesões de maior tamanho. Quando os nucleoides são incubados com essas enzimas, os sítios específicos reconhecidos por esses agentes são incisados e, a partir disso, geram uma quebra de cadeia de DNA que pode então ser detectada pelo ensaio cometa. Dessa forma, a diferença entre o ID de uma amostra tratada com uma enzima de reparação de DNA para um dano específico e a mesma amostra não tratada (incubada somente com o tampão de reação) fornece a quantificação da lesão em análise ^{64, 67, 74}.

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que, após serem processadas, podem resultar ou não neste fenômeno. Diferentemente das mutações, as lesões detectadas por este teste podem ser reparadas. Assim, este teste também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, visto que as lesões detectadas pelo teste cometa são passíveis de correção. Embora impossibilite inferir a fidelidade do processo de reparo, o teste pode trazer informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada ^{61, 63, 70}.

Apesar de a metodologia ter sido desenvolvida para estudo em laboratório de células humanas, é crescente a utilização do teste cometa para avaliação de dano em diferentes tecidos dos mais variados organismos. As suspensões celulares que possibilitam a sua avaliação podem ser provenientes de leveduras, protozoários, plantas superiores, planárias, peixes, anfíbios e células de mamíferos, como as do SNC ⁶⁸.

Devido à versatilidade da técnica, o ensaio cometa tem sido aplicado em estudos de neurotoxicidade durante as últimas décadas. Denli e colaboradores (2000) estudaram o potencial genotóxico do ácido valproico, através da aplicação do ensaio cometa em linfócitos periféricos provenientes de pacientes epiléticos tratados com este fármaco ⁷⁵. Pavone e Cardile (2003) analisaram a possível genotoxicidade de diversas drogas anticonvulsivantes em culturas de astrócitos corticais de ratos, a fim de verificar modificações funcionais e efeitos biológicos dose-dependente ⁷⁶. Frenzilli e colaboradores (2007) demonstraram os efeitos agudo e crônico da administração de ecstasy sobre a integridade do DNA de células hipocámpais e estriatais de camundongos ⁷⁷. Andreazza e colaboradores (2007) concluíram

que metilfenidato aumenta o ID de linfócitos periféricos em ratos jovens e adultos, sendo mais pronunciado com administração crônica, e que o dano neuronal estava mais evidente no estriado do que no hipocampo ⁷⁸. Recentemente, no campo da medicina pediátrica, verificou-se associação entre danos ao DNA de leucócitos mononucleares periféricos em recém-nascidos a termo com icterícia tratados com fototerapia convencional e intensiva ⁷⁹.

1.3 NEUROPEPTÍDEO NAP

Muitos são os fatores que contribuem para a falta de progresso terapêutico das crises convulsivas neonatais. Estudos rigorosos têm confirmado achados clínicos que drogas anticonvulsivantes comumente usadas têm eficácia limitada em neonatos. Até o presente momento, não há desenvolvimento de nenhum composto elaborado especialmente para o controle de crises neonatais. Outros desafios inerentes à melhora terapêutica e nos desfechos destes pacientes incluem diversidade etiológica, comorbidades e a complexidade diagnóstica das crises ¹⁹.

Divisão neuronal, sobrevivência e diferenciação celular são atividades dependentes de fatores de crescimento proteicos durante o desenvolvimento. Além disso, a indução de proteínas neurotróficas é uma parte fundamental da resposta do SNC a uma grande variedade de agentes que afetam a integridade neuronal. Geralmente, neurônios, quando estimulados por estes processos danosos, mandam sinais extracelulares a astrócitos e microglias que os intermedeiam, induzindo a liberação de neurotrofinas específicas ⁸⁰.

O número crescente e diverso destas moléculas tornou-se notável desde a identificação do fator de crescimento neural (NGF), entre outros posteriormente, estabelecendo-se um consenso que proteínas neurotróficas e neuropeptídeos têm importantes funções regulatórias durante o desenvolvimento e após lesões nervosas ⁸¹. Embora os fatores tróficos mais importantes tenham sido reconhecidos primeiramente na regulação e interação entre neurônio e células alvo, está claro que células gliais expressam a maioria destes fatores de crescimento e citocinas ⁸². O peptídeo vasoativo intestinal (VIP), primeiramente identificado no intestino como uma molécula indutora de vasodilatação, foi descoberto como sendo o peptídeo cerebral mais abundante com capacidade neuroprotetora *in vivo*. Para este composto garantir a defesa neuronal, é necessário que astrócitos portadores de receptores específicos para VIP sejam induzidos a sintetizar e secretar proteínas neuroprotetoras. Assim, VIP requer que células

gliais secretem fatores, tais como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), neurotrofina-3 (NT-3), protease nexina-1 (PN-1), as quimiocinas “regulada por ativação, secretada e expressa por células T normais” (RANTES) e proteína inflamatória de macrófagos (MIP), fator neurotrófico atividade dependente (ADNF; *activity-dependent neurotrophic factor*) e proteína neuroprotetora atividade dependente (ADNP; *activity-dependent neuroprotective protein*) (figura 8) ^{83, 84}.

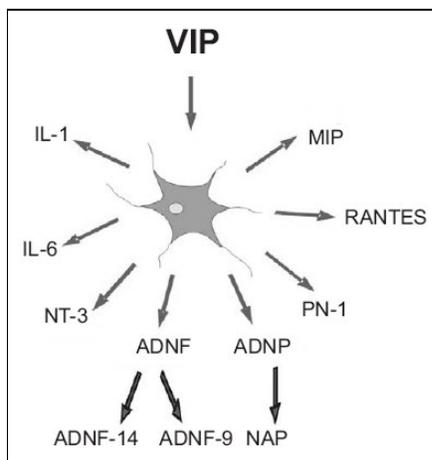


Figura 8 – Mecanismos de ação do VIP. VIP promove a liberação de fatores gliais que oferecem neuroproteção, tais como IL-1, IL-6, NT-3, PN-1, as quimiocinas RANTES e MIP, e os fatores ADNF e ADNP. Os fatores ADNF-9, ADNF-14 e NAP são os fragmentos ativos das proteínas originais ADNF e ADNP, respectivamente. Fonte: Dejada, Sokolowska e Nowak (2005, p. 311).

No trabalho de Bassan e colaboradores (1999), foi possível a identificação do menor elemento ativo do ADNP, denominado NAP. Este peptídeo de apenas 8 aminoácidos (NAPVSIPQ) é capaz de proteger culturas de células neuronais contra a toxicidade associada com peptídeo beta amilóide ^{81, 85}, NMDA ⁸¹, bloqueio elétrico (tetrodotoxina) ⁸¹, glicoproteína gp120 ⁸¹, fator de necrose tumoral alfa ⁸⁶, álcool ⁸⁷, dopamina ⁸⁸, estresse oxidativo por H₂O₂ ⁸⁹, privação de nutrientes ⁹⁰ e sobrecarga de zinco ⁹¹. Na maioria destes casos, a neuroproteção se torna significativa em concentração de NAP na ordem de femtomolar e picomolar. Já em estudos *in vivo*, NAP tem ação protetora contra colinotoxicidade ⁹², deficiência de apolipoproteína E ^{81, 93}, traumatismo craniano ^{86, 94}, oclusão da artéria cerebral média ⁹⁵, síndrome alcoólica fetal ⁹⁶, hipóxia-isquemia ⁹⁷, esclerose múltipla (encefalomielite autoimune), exposição a AF64A ⁹⁸ e disfunções cognitivas e de ansiedade associadas à meia-idade ⁹⁹⁻¹⁰¹.

Constatado o amplo espectro de proteção do peptídeo NAP, o mecanismo de ação é de grande interesse e foco de intensa investigação. Demonstrou-se que o NAP liga-se

especificamente à tubulina, principalmente com a subunidade β III-tubulina presente em neurônios. No entanto, tal ligação também é possível no citoesqueleto de astrócitos, que não possuem este tipo de subunidade tubulinar. Esta propriedade, condizendo com função de chaperona, facilita a reunião de microtúbulos e aumenta a sobrevivência e integridade celular⁹¹.

A manutenção da funcionalidade neuronal exercida pelo NAP, através da formação e estabilidade microtubular de mitocôndria e retículo endoplasmático, também pode ser justificada pela influência sobre a mobilização de cálcio. Tais resultados sustentam a hipótese que este peptídeo lipofílico não requer receptores neuronais de superfície e a ação dependente de quiralidade⁸³. As ações bioquímicas podem estar vinculadas à neuroproteção conferida pelo peptídeo NAP, tal como acúmulo extracelular de monofosfato de guanosina cíclico e óxido nítrico¹⁰². No estudo de Visochek e colaboradores (2005), demonstrou-se uma via alternativa para ativação da poli(ADP-ribose)polimerase-1 (PARP-1) por mecanismos de sinalização induzidos por NAP, na ausência de dano ao DNA. A ativação de PARP-1 induzida por NAP pode promover efeito neuroprotetor como resultado da poli-ADP ribosilação da histona 1 e relaxamento da cromatina. Dessa maneira, esta ação permite um acesso facilitado ao DNA pelos fatores de transição e enzimas de reparo fundamentais para diferenciação e sobrevivência celular¹⁰³.

Segundo Quintana e colaboradores (2006), macrófagos também são capazes de expressar ADNP em resposta à estimulação do VIP. Desta forma, NAP exerce ação regulatória sobre citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α , IL-16 e IL-12. Estes achados indicam que ADNP e NAP podem exercer importante controle imunológico, assim como neuroproteção, que podem ser processos mutuamente relacionados^{86,104}.

Considera-se NAP um peptídeo altamente lipofílico e biodisponível, e sua estrutura secundária é do tipo helicoidal randômica, tanto em soluções aquosas como orgânicas¹⁰¹. Assim, a sua solubilidade em membranas lipídicas permite que este ultrapasse a barreira hematoencefálica (BHE), podendo atingir prontamente estruturas cerebrais através de administração intranasal⁹⁸, subcutânea⁸⁶, intravenosa⁹⁵ e intraperitonal⁹⁶, em estudos animais. No estudo de Leker e colaboradores (2002), injeções intravenosas de solução contendo NAP marcado radioativamente ($[^3\text{H}]\text{NAP}$) em ratos espontaneamente hipertensos após 1 hora de oclusão permanente da artéria cerebral média, resultaram na identificação de radioatividade no cerebelo e córtex 15 minutos após administração e permanência em até 1 hora no tecido isquêmico. Já em ratos não tratados, a determinação radioativa no córtex, hipocampo e mesencéfalo indicou distribuição homogênea 30 minutos após aplicação

intravenosa, sendo que 17% do material identificado no córtex era composto por [³H]NAP intacto ⁹⁵. Em Spong e colaboradores (2001), a biodisponibilidade foi verificada após administração intraperitoneal de [³H]NAP no 8º dia de gestação em camundongos. Os experimentos demonstraram que 68% e 39% da radioatividade identificada nos fetos eram condizentes com o peptídeo intacto após 30 e 60 minutos da sua administração, respectivamente. Além disso, [³H]NAP foi detectado no cérebro das prenhas após 1 hora da aplicação intraperitoneal, na quantidade de 0,2-2% do material inicialmente manipulado ⁹⁶. A habilidade do NAP em chegar ao cérebro de roedores é adicionalmente facilitada em animais neonatos devido à relativa permeabilidade da barreira hematoencefálica de animais em desenvolvimento ^{98, 105}.

Em termos de potencial imunogênico do respectivo peptídeo, testes em coelhos foram realizados e não houve detecção de anticorpos contra NAP no soro destes animais. Após uma bateria de testes toxicológicos em ratos e cães, incluindo toxicidade de doses repetidas, testes cardiopulmonares e ensaios de função comportamental, não foram observados efeitos adversos com concentrações de NAP até 500 vezes maior da considerada biologicamente ativa ¹⁰¹. É válido destacar, também, que o peptídeo NAP não altera o nível proliferativo celular, não oferecendo risco de tumorigenicidade ¹⁰⁶.

Atualmente, não há estudos que tenham verificado o potencial efeito neuroprotetor do NAP em modelos animais de crise convulsiva, especialmente associada à hipóxia neonatal. Existem apenas dois trabalhos aplicando este peptídeo em animais submetidos ao processo hipóxico-isquêmico. Rotstein e colaboradores (2006) avaliaram o potencial neuroprotetor do peptídeo NAP na lesão hipóxico-isquêmica neonatal, através da exposição à hipóxia global pós-natal de camundongos deficientes de apolipoproteína E, sendo esta uma linhagem com maior suscetibilidade a lesões cerebrais em hipóxia. Após hipóxia (35 minutos com 8% O₂ em camundongos P1) e subsequente administração diária de solução contendo NAP (injeção subcutânea em P1-14; 25 µL/mg), pôde-se constatar efeitos positivos nos desfechos cognitivos e nas habilidades motoras avaliadas ⁹³. Recentemente, Kumral e colaboradores (2006) verificaram que uma única administração intraperitoneal de solução contendo NAP (0,3 µg/g) foi capaz de diminuir significativamente a formação de óxido nítrico, preservação da densidade neuronal e redução de neurônios em processo de apoptose nas áreas hipocâmpais e no giro denteado de ratos neonatais com lesão cerebral hipóxico-isquêmica ⁹⁷.

NAP está sob proteção conferida por patente e licenciada exclusivamente para estudos clínicos desenvolvidos pela empresa canadense Allon Therapeutics Inc. Este grupo de biotecnologia visa ao desenvolvimento de drogas para o tratamento de uma grande variedade

de patologias neurodegenerativas. As formulações intranasal (AL-108) e intravenosa (AL-208) do peptídeo NAP estão sendo submetidas a ensaios clínicos. Conforme informações disponíveis no endereço eletrônico da empresa, um ensaio clínico de fase Ia já foi completado utilizando AL-108 em pacientes com doença de Alzheimer e esquizofrenia. Acerca do AL-208, ensaio clínico humano de fase Ib está sendo desenvolvido a fim de avaliar segurança, tolerabilidade e farmacocinética em indivíduos sadios e diabéticos. Além deste, outro ensaio clínico de fase IIa está em andamento para verificar a eficácia de uma única dosagem de AL-208 em pacientes com déficit cognitivo leve após cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea. A companhia também utiliza variações destas formulações (AL-209, AL-309 e AL-408) em estudos pré-clínicos com modelos experimentais de doença de Alzheimer, síndrome alcoólica fetal e esclerose amiotrófica lateral ¹⁰⁷.

1.3.1 Atividade Antioxidativa do Neuropeptídeo NAP

Conforme exposto anteriormente, o cérebro é particularmente vulnerável a lesões oxidativas como resultado de alguns fatores, tais como o alto índice de atividade metabólica oxidativa, intensa produção de metabólitos de oxigênio reativo, alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, capacidade antioxidativa relativamente baixa, atividade reduzida dos mecanismos de reparo e reposição restrita de células neuronais ¹⁰⁸. Assim sendo, a desintoxificação de ERO é importante para a integridade cerebral, pois as células neuronais são particularmente suscetíveis ao dano oxidativo ¹⁰⁹.

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação deste substrato. A fim de prevenir que ocorra peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e dano ao DNA, há disponibilidade de algumas estratégias biológicas de defesa antioxidativa composta por enzimas – como por exemplo, superóxido dismutase dependente de manganês, superóxido dismutase dependente de cobre-zinco, catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase –, assim como substratos não enzimáticos, nos quais figuram algumas vitaminas (vitaminas A, C e E), e moléculas de baixo peso molecular, como a glutatona reduzida. Os antioxidantes não enzimáticos podem agir como sequestradores de radicais e quelante de metais de transição ^{110, 111}.

Neste contexto, recentes trabalhos propuseram atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro* do neuropeptídeo NAP. Offen e colaboradores (2000) demonstraram que o respectivo peptídeo, numa ampla variação de concentração (10^{-18} – 10^{-8} M), protegeu células de feocromocitoma de rato (PC12) da toxicidade por dopamina (0,3 mM), aumentando a sobrevivência celular. Indicando ação antioxidante, NAP (10^{-16} – 10^{-8} M) garantiu proteção às células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) com depleção de glutatona por butionina sulfoximina, um inibidor seletivo da síntese de glutatona que aumenta significativamente a toxicidade por dopamina ⁸⁸. Semelhantemente, Steingart e colaboradores (2000) também demonstraram que incubação do peptídeo NAP (10^{-16} – 10^{-14} M), em cultura de células PC12, 3 horas antes e durante exposição de 100 μ M de H₂O₂ inibiu morte celular significativamente ⁸⁹.

A pré-incubação com ADNP recombinante em vetor VP22 (70-140 nM de ADNP-VP22) apresentou capacidade protetora significativa em cultura de células PC12 contra toxicidade provocada pelo peptídeo beta amiloide. Deste mesmo modo, concentrações crescentes de ADNP-VP22 aumentaram a sobrevivência celular frente ao tratamento com 300 μ M de H₂O₂. Nestas duas maneiras de agressão, beta amiloide e H₂O₂ causam morte celular por mecanismos apoptóticos dependentes de p53. Ao passo que tratamento com H₂O₂ foi capaz de aumentar os níveis de p53, a pré-incubação com ADNP-VP22 reduziu a expressão desta proteína até o nível compatível com os controles. Assim, sugere-se que ADNP exerça proteção contra apoptose, sendo que o seu sítio ativo NAP provavelmente seja responsável, em parte, por esta atividade ¹¹².

Busciglio e colaboradores (2007) investigaram o efeito neuroprotetor dos peptídeos NAP e ADNF-9 em duas situações experimentais que apresentam acúmulo intracelular de radicais livres e aumento de peroxidação lipídica: cultura de neurônios corticais humanos tratados com H₂O₂ e cultura de neurônios provenientes de amostras cerebrais de fetos abortados com Síndrome de Down. Em ambos os casos, incubação com ADNF-9 e NAP (10^{-13} M e 10^{-15} M, respectivamente) conferiu neuroproteção contra dano oxidativo, garantindo sobrevivência celular significativa e redução das mudanças morfológicas degenerativas ⁸³.

Em um modelo animal de síndrome alcoólica fetal, acredita-se que morte e anormalidade de crescimento induzidos pelo tratamento de álcool durante o desenvolvimento estão associados com dano oxidativo severo. Spong e colaboradores (2001) demonstraram que o pré-tratamento com NAP (20-40 μ g; 30 minutos antes ou 1 hora depois da administração de álcool) resultou em diminuição significativa de morte fetal. Acerca da

anormalidade de crescimento fetal, somente o pré-tratamento de NAP + ADNF-9 reverteu a restrição de crescimento causada pelo álcool. Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram medidos pela técnica de eletroforese capilar nas amostras fetais 8 horas após cotratamento com NAP + ADNF-9. Enquanto que administração de álcool resultou em declínio de GSH/GSSG em 50% dos valores basais, NAP + ADNF-9 preveniu esta queda, mantendo uma razão semelhante com a dos animais controle ⁹⁶.

2 JUSTIFICATIVA

Crises convulsivas neonatais associadas à hipóxia demonstram ser prejudiciais para o desenvolvimento normal do SNC, e prováveis complicações podem surgir a longo prazo, e comprometendo a qualidade de vida do indivíduo. Em face da variabilidade diagnóstica e de condutas terapêuticas, estes pacientes pediátricos demandam uma nova abordagem de tratamento mais eficaz e que não comprometa o desenvolvimento normal do SNC.

O neuropeptídeo NAP é uma molécula altamente potente e, pelas evidências científicas revisadas na literatura atual, pode-se tornar uma alternativa terapêutica promissora no tratamento das crises convulsivas neonatais associadas à hipóxia. Com as vantagens de ser uma droga de fácil administração, apresentar grande ação protetora contra uma variedade de neuropatologias e atingir facilmente o SNC devido a sua permeabilidade, NAP apresenta características convenientes para pacientes pediátricos. Além disso, como demonstrado em diversos modelos animais e ensaios clínicos, as propriedades farmacológicas do NAP formam a base do seu potencial terapêutico único.

Embora o seu mecanismo de ação não esteja completamente elucidado, NAP pode ter sua ação neuroprotetora abrangente justificável pela sua capacidade de estabilizar a estrutura neuronal, agindo diretamente no citoesqueleto microtubular, e pela sua ação antioxidante, seja pela redução do acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio ou na modulação do sistema antioxidativo. Apesar do entusiasmo do uso versátil do referente peptídeo para o tratamento de várias neuropatologias, estudos experimentais e clínicos são fundamentais para garantir segurança e viabilidade de sua administração.

Ao passo que hipóxia cerebral afeta o citoesqueleto microtubular e promove produção excessiva de radicais livres e consequente fragmentação do DNA neuronal, o peptídeo NAP tem como alvo de ação a tubulina e atividade antioxidativa. Inicialmente, após estabelecer o referente modelo animal de hipóxia neonatal, investigou-se a ocorrência de lesões ao DNA em células hipocâmpais em um estudo tempo dependente, através do ensaio cometa. Adicionalmente, a discriminação da natureza oxidativa dessas lesões foi realizada por meio do aprimoramento desta técnica, utilizando enzimas de reparação de purinas e pirimidinas oxidadas. Visando a compreender melhor o impacto das crises convulsivas associadas à hipóxia neonatal no estresse oxidativo celular, analisaram-se, em complementar, a peroxidação lipídica e níveis de glutathiona oxidada e reduzida. Com estes dados disponíveis, a

administração do neuropeptídeo NAP foi utilizada com o objetivo de verificar sua possível ação protetora nos parâmetros acima citados.

As propriedades aqui descritas do peptídeo NAP formam o *rationale* deste trabalho para verificar o efeito da administração do neuropeptídeo NAP sobre parâmetros de estresse oxidativo hipocampal de ratos neonatos submetidos ao modelo de CH. Este estudo foi realizado no Laboratório de Neurociências e Sinalização Celular, no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, e em colaboração com o Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da UFRGS.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se crises convulsivas induzidas por hipóxia são capazes de gerar estresse oxidativo no hipocampo de ratos neonatos, e, havendo esta constatação, analisar se o neuropeptídeo NAP exerce atividade antioxidativa frente ao dano gerado neste modelo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o impacto das CH sobre o DNA hipocampal de ratos neonatos em diferentes tempos de reoxigenação (0, 1, 3, 6, 24, 72 e 168 horas), através do ensaio cometa alcalino;
- 2) Quantificar o dano oxidativo ao DNA hipocampal em diferentes momentos decorrentes à aplicação do modelo experimental (0, 1, 3, 6, 24, 72 e 168 horas), empregando as enzimas Fpg e Endo III na metodologia do ensaio cometa;
- 3) Avaliar peroxidação lipídica hipocampal promovida por CH em ratos neonatos em diferentes tempos de reoxigenação (0, 1, 3, 6, 24, 72 e 168 horas), através do nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- 4) Quantificar os níveis de GSH reduzida no hipocampo de ratos neonatos submetidos ao modelo de CH em diferentes tempos de reoxigenação (0, 1, 3, 6, 24, 72 e 168 horas);
- 5) Correlacionar o possível efeito protetor do neuropeptídeo NAP, administrado em diferentes dosagens (0,03, 0,3 e 3 $\mu\text{g/g}$), com o dano ao DNA hipocampal em 3, 6, 24 horas após aplicação do modelo experimental;
- 6) Relacionar o possível efeito protetor do neuropeptídeo NAP, administrado em diferentes dosagens (0,03, 0,3 e 3 $\mu\text{g/g}$), com o dano oxidativo ao DNA hipocampal em 3, 6, 24 horas após aplicação do modelo experimental;
- 7) Quantificar o possível efeito protetor do neuropeptídeo NAP, administrado em diferentes dosagens (0,03, 0,3 e 3 $\mu\text{g/g}$), sobre a peroxidação lipídica hipocampal em 3, 6, 24 horas após aplicação do modelo experimental;

- 8) Quantificar o possível efeito protetor do neuropeptídeo NAP, administrado em diferentes dosagens (0,03, 0,3 e 3 $\mu\text{g/g}$), sobre o conteúdo de GSH no hipocampo em 3, 6, 24 horas após aplicação do modelo experimental.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jensen FE. Developmental factors regulating susceptibility to perinatal brain injury and seizures. *Curr Opin Pediatr*2006 Dec;18(6):628-33.
2. Garcias Da Silva LF, Nunes ML, Da Costa JC. Risk factors for developing epilepsy after neonatal seizures. *Pediatr Neurol*2004 Apr;30(4):271-7.
3. Bartha AI, Shen J, Katz KH, Mischel RE, Yap KR, Ivacko JA, et al. Neonatal seizures: multicenter variability in current treatment practices. *Pediatr Neurol*2007 Aug;37(2):85-90.
4. Lombroso CT, Nunes, M.L., Dacosta, J.C. In: Crises convulsivas no recém-nascido. Dacosta J, Palmini A, Yacubian, EM, Cavalheiro, EM (Org.). 1ª ed. São Paulo: Editora Lemos, 1998; vol. 1, p. 173-201.
5. Lombroso CT. Neonatal seizures: gaps between the laboratory and the clinic. *Epilepsia*2007;48 Suppl 2:83-106.
6. Dacosta J, Nunes, ML, Fiori, RM. Convulsões no período neonatal. *Jornal de Pediatria*2001;77(1):115-22.
7. Jensen FE, Baram TZ. Developmental seizures induced by common early-life insults: short- and long-term effects on seizure susceptibility. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*2000;6(4):253-7.
8. Annegers JF, Hauser WA, Shirts SB, Kurland LT. Factors prognostic of unprovoked seizures after febrile convulsions. *N Engl J Med*1987 Feb 26;316(9):493-8.
9. Berg AT, Shinnar S. Do seizures beget seizures? An assessment of the clinical evidence in humans. *J Clin Neurophysiol*1997 Mar;14(2):102-10.
10. Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, et al. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology*1993 Jun;43(6):1083-7.

11. Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JA. Etiology and Pathogenesis of Temporal Lobe Epilepsy. *Arch Neurol*1964 Mar;10:233-48.
12. Harvey AS, Grattan-Smith JD, Desmond PM, Chow CW, Berkovic SF. Febrile seizures and hippocampal sclerosis: frequent and related findings in intractable temporal lobe epilepsy of childhood. *Pediatr Neurol*1995 Apr;12(3):201-6.
13. Nelson KB, Ellenberg JH. Predictors of epilepsy in children who have experienced febrile seizures. *N Engl J Med*1976 Nov 4;295(19):1029-33.
14. Dinner D. Posttraumatic epilepsy. Wyllie E, editor. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.
15. Shinnar S. Prolonged febrile seizures and mesial temporal sclerosis. *Ann Neurol*1998 Apr;43(4):411-2.
16. Westmark KD, Barkovich AJ, Sola A, Ferriero D, Partridge JC. Patterns and implications of MR contrast enhancement in perinatal asphyxia: a preliminary report. *AJNR Am J Neuroradiol*1995 Apr;16(4):685-92.
17. Jennett WB, Lewin W. Traumatic epilepsy after closed head injuries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*1960 Nov;23:295-301.
18. Volpe JJ. Neurology of the newborn. 4th ed. ed. Philadelphia: Saunders; 2001.
19. Silverstein FS, Jensen FE. Neonatal seizures. *Ann Neurol*2007 Aug;62(2):112-20.
20. Legido A, Clancy RR, Berman PH. Neurologic outcome after electroencephalographically proven neonatal seizures. *Pediatrics*1991 Sep;88(3):583-96.
21. Bergamasco B, Benna P, Ferrero P, Gavinelli R. Neonatal hypoxia and epileptic risk: a clinical prospective study. *Epilepsia*1984 Apr;25(2):131-6.
22. Koh S, Tibayan FD, Simpson JN, Jensen FE. NBQX or topiramate treatment after perinatal hypoxia-induced seizures prevents later increases in seizure-induced neuronal injury. *Epilepsia*2004 Jun;45(6):569-75.

23. Painter MJ, Scher MS, Stein AD, Armatti S, Wang Z, Gardiner JC, et al. Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures. *N Engl J Med*1999 Aug 12;341(7):485-9.
24. Booth D, Evans DJ. Anticonvulsants for neonates with seizures. *Cochrane Database Syst Rev*2004(4):CD004218.
25. Stafstrom CE. Does one neonatal seizure alter synaptic plasticity and cause lifelong cognitive impairment? *Epilepsy Curr*2007 Nov-Dec;7(6):163-5.
26. Sanchez RM, Jensen FE. Maturation aspects of epilepsy mechanisms and consequences for the immature brain. *Epilepsia*2001 May;42(5):577-85.
27. Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, et al. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med*2005 Nov;11(11):1205-13.
28. Ben-Ari Y, Holmes GL. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol*2006 Dec;5(12):1055-63.
29. Dzhala VI, Staley KJ. Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. *J Neurosci*2003 Mar 1;23(5):1840-6.
30. Moshe SL, Garant DS, Sperber EF, Veliskova J, Kubova H, Brown LL. Ontogeny and topography of seizure regulation by the substantia nigra. *Brain Dev*1995;17 Suppl:61-72.
31. Patel M, Liang LP, Hou H, Williams BB, Kmiec M, Swartz HM, et al. Seizure-induced formation of isofurans: novel products of lipid peroxidation whose formation is positively modulated by oxygen tension. *J Neurochem*2008 Jan;104(1):264-70.
32. Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med*2004 Dec 15;37(12):1951-62.
33. Liang LP, Ho YS, Patel M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience*2000;101(3):563-70.

34. Parker J, Ashraf QM, Akhter W, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of post-hypoxic reoxygenation on DNA fragmentation in cortical neuronal nuclei of newborn piglets. *Neurosci Lett* 2007 Feb 2;412(3):273-7.
35. Mishra OP, Zubrow AB, Ashraf QM, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of nitric oxide synthase inhibition during post-hypoxic reoxygenation on Bax and Bcl-2 protein expression and DNA fragmentation in neuronal nuclei of newborn piglets. *Brain Res* 2006 Jul 26;1101(1):20-8.
36. Chiang MC, Ashraf QM, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Mechanism of DNA Fragmentation During Hypoxia in the Cerebral Cortex of Newborn Piglets. *Neurochem Res* 2008 Feb 6.
37. Curristin SM, Cao A, Stewart WB, Zhang H, Madri JA, Morrow JS, et al. Disrupted synaptic development in the hypoxic newborn brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 26;99(24):15729-34.
38. Chiba S. Long-term effect of postnatal hypoxia on the seizure susceptibility in rats. *Life Sci* 1985 Oct 28;37(17):1597-604.
39. Matsumoto M. The effects of perinatal hypoxia on pentylenetetrazol-induced seizures in developing rats. *Life Sci* 1990;46(24):1787-92.
40. Gottlieb A, Keydar I, Epstein HT. Rodent brain growth stages: an analytical review. *Biol Neonate* 1977;32(3-4):166-76.
41. Jensen FE, Applegate CD, Holtzman D, Belin TR, Burchfiel JL. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann Neurol* 1991 Jun;29(6):629-37.
42. Jensen FE, Applegate C, Burchfiel J, Lombroso CT. Differential effects of perinatal hypoxia and anoxia on long term seizure susceptibility in the rat. *Life Sci* 1991;49(5):399-407.
43. Jensen FE, Holmes GL, Lombroso CT, Blume HK, Firkusny IR. Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. *Epilepsia* 1992 Nov-Dec;33(6):971-80.
44. Jensen FE, Wang C. Hypoxia-induced hyperexcitability in vivo and in vitro in the immature hippocampus. *Epilepsy Res* 1996 Dec;26(1):131-40.

45. Chen WF, Chang H, Huang LT, Lai MC, Yang CH, Wan TH, et al. Alterations in long-term seizure susceptibility and the complex of PSD-95 with NMDA receptor from animals previously exposed to perinatal hypoxia. *Epilepsia* 2006 Feb;47(2):288-96.
46. Sanchez RM, Dai W, Levada RE, Lippman JJ, Jensen FE. AMPA/kainate receptor-mediated downregulation of GABAergic synaptic transmission by calcineurin after seizures in the developing rat brain. *J Neurosci* 2005 Mar 30;25(13):3442-51.
47. Jensen FE, Firkusny IR, Mower GD. Differences in c-fos immunoreactivity due to age and mode of seizure induction. *Brain Res Mol Brain Res* 1993 Mar;17(3-4):185-93.
48. Mikati MA, Zeinieh MP, Kurdi RM, Harb SA, El Hokayem JA, Daderian RH, et al. Long-term effects of acute and of chronic hypoxia on behavior and on hippocampal histology in the developing brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2005 Jun 9;157(1):98-102.
49. Yang SN, Huang CB, Yang CH, Lai MC, Chen WF, Wang CL, et al. Impaired SynGAP expression and long-term spatial learning and memory in hippocampal CA1 area from rats previously exposed to perinatal hypoxia-induced insults: beneficial effects of A68930. *Neurosci Lett* 2004 Nov 16;371(1):73-8.
50. Chen WF, Chang H, Wong CS, Huang LT, Yang CH, Yang SN. Impaired expression of postsynaptic density proteins in the hippocampal CA1 region of rats following perinatal hypoxia. *Exp Neurol* 2007 Mar;204(1):400-10.
51. Jensen FE, Wang C, Stafstrom CE, Liu Z, Geary C, Stevens MC. Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia *In vivo*. *J Neurophysiol* 1998 Jan;79(1):73-81.
52. Jensen FE. An animal model of hypoxia-induced perinatal seizures. *Ital J Neurol Sci* 1995 Feb-Mar;16(1-2):59-68.
53. Sanchez RM, Koh S, Rio C, Wang C, Lamperti ED, Sharma D, et al. Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. *J Neurosci* 2001 Oct 15;21(20):8154-63.

54. Sanchez RM, Justice JA, Zhang K. Persistently decreased basal synaptic inhibition of hippocampal CA1 pyramidal neurons after neonatal hypoxia-induced seizures. *Dev Neurosci*2007;29(1-2):159-67.
55. Barzilai A. The contribution of the DNA damage response to neuronal viability. *Antioxid Redox Signal*2007 Feb;9(2):211-8.
56. Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR. DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutat Res*2007 Jan 3;614(1-2):24-36.
57. Henshall DC, Sinclair J, Simon RP. Relationship between seizure-induced transcription of the DNA damage-inducible gene GADD45, DNA fragmentation, and neuronal death in focally evoked limbic epilepsy. *J Neurochem*1999 Oct;73(4):1573-83.
58. Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*2004 Aug-Sep;3(8-9):1109-15.
59. Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 1999.
60. Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat Res*1998 May 25;400(1-2):99-115.
61. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*1997 Apr 29;375(2):183-93.
62. Singh NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res*2000 Nov 20;455(1-2):111-27.
63. Villela IV LA, Silveira J, Prá D, Rolla HC, Silveira JD. *Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental*. Ed. Alcance ed. Silva J EB, Henriques JPA, editor. Porto Alegre:2003.
64. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*2004 Mar;26(3):249-61.

65. Frenzilli G. The comet assay as a method of assessment of neurotoxicity: usefulness for drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*2006;1074(1):478.
66. Ostling O JK. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*1984 123(1):291-8.
67. Speit G, Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*2006;314:275-86.
68. Olive PL, Banath JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*2006;1(1):23-9.
69. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res*1996 Jun 12;363(2):89-96.
70. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*2000;35(3):206-21.
71. Giovannelli L, Decorosi F, Dolara P, Pulvirenti L. Vulnerability to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay. *Brain Res*2003 Apr 18;969(1-2):244-7.
72. Garcia O, Mandina T, Lamadrid AI, Diaz A, Remigio A, Gonzalez Y, et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res*2004 Nov 22;556(1-2):25-34.
73. Olive PL, Wlodek D, Banath JP. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res*1991 Sep 1;51(17):4671-6.
74. Smith CC, O'Donovan MR, Martin EA. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis*2006 May;21(3):185-90.
75. Denli M AH, Dundaroz R, Özisik T, Erdem E, Baltaci V. Genotoxicity evaluation in female patients on valproic acid monotherapy using alkaline single cell gel electrophoresis. *Eastern Journal of Medicine*2000;5(2):61-5.

76. Pavone A, Cardile V. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia*2003;44 Suppl 10:34-9.
77. Frenzilli G, Ferrucci M, Giorgi FS, Blandini F, Nigro M, Ruggieri S, et al. DNA fragmentation and oxidative stress in the hippocampal formation: a bridge between 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) intake and long-lasting behavioral alterations. *Behav Pharmacol*2007 Sep;18(5-6):471-81.
78. Andreazza AC, Frey BN, Valvassori SS, Zanotto C, Gomes KM, Comim CM, et al. DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*2007 Aug 15;31(6):1282-8.
79. Aycicek A, Kocyigit A, Erel O, Senturk H. Phototherapy causes DNA damage in peripheral mononuclear leukocytes in term infants. *J Pediatr (Rio J)*2008 Mar-Apr;84(2):141-6.
80. Zemlyak I, Manley N, Sapolsky R, Gozes L. NAP protects hippocampal neurons against multiple toxins. *Peptides*2007 Oct;28(10):2004-8.
81. Bassan M, Zamostiano R, Davidson A, Pinhasov A, Giladi E, Perl O, et al. Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *J Neurochem*1999 Mar;72(3):1283-93.
82. Brenneman DE, Gozes I. A femtomolar-acting neuroprotective peptide. *J Clin Invest*1996 May 15;97(10):2299-307.
83. Busciglio J, Pelsman A, Helguera P, Ashur-Fabian O, Pinhasov A, Brenneman DE, et al. NAP and ADFN-9 protect normal and Down's syndrome cortical neurons from oxidative damage and apoptosis. *Curr Pharm Des*2007;13(11):1091-8.
84. Dejda A, Sokolowska P, Nowak JZ. Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol Rep*2005 May-Jun;57(3):307-20.
85. Zemlyak I, Furman S, Brenneman DE, Gozes I. A novel peptide prevents death in enriched neuronal cultures. *Regul Pept*2000 Dec 22;96(1-2):39-43.
86. Beni-Adani L, Gozes I, Cohen Y, Assaf Y, Steingart RA, Brenneman DE, et al. A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates

- injury response in closed head injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther*2001 Jan;296(1):57-63.
87. Wilkemeyer MF, Chen SY, Menkari CE, Brenneman DE, Sulik KK, Charness ME. Differential effects of ethanol antagonism and neuroprotection in peptide fragment NAPVSIPQ prevention of ethanol-induced developmental toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*2003 Jul 8;100(14):8543-8.
88. Offen D, Sherki Y, Melamed E, Fridkin M, Brenneman DE, Gozes I. Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. *Brain Res*2000 Jan 31;854(1-2):257-62.
89. Steingart RA, Solomon B, Brenneman DE, Fridkin M, Gozes I. VIP and peptides related to activity-dependent neurotrophic factor protect PC12 cells against oxidative stress. *J Mol Neurosci*2000 Dec;15(3):137-45.
90. Lagreze WA, Pielen A, Steingart R, Schlunck G, Hofmann HD, Gozes I, et al. The peptides ADNF-9 and NAP increase survival and neurite outgrowth of rat retinal ganglion cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*2005 Mar;46(3):933-8.
91. Divinski I, Holtser-Cochav M, Vulih-Schultzman I, Steingart RA, Gozes I. Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin. *J Neurochem*2006 Aug;98(3):973-84.
92. Gozes I, Brenneman DE. A new concept in the pharmacology of neuroprotection. *J Mol Neurosci*2000 Feb-Apr;14(1-2):61-8.
93. Rotstein M, Bassan H, Kariv N, Speiser Z, Harel S, Gozes I. NAP enhances neurodevelopment of newborn apolipoprotein E-deficient mice subjected to hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther*2006 Oct;319(1):332-9.
94. Zaltzman R, Alexandrovich A, Beni SM, Trembovler V, Shohami E, Gozes I. Brain injury-dependent expression of activity-dependent neuroprotective protein. *J Mol Neurosci*2004;24(2):181-7.
95. Leker RR, Teichner A, Grigoriadis N, Ovadia H, Brenneman DE, Fridkin M, et al. NAP, a femtomolar-acting peptide, protects the brain against ischemic injury by reducing apoptotic death. *Stroke*2002 Apr;33(4):1085-92.

96. Spong CY, Abebe DT, Gozes I, Brenneman DE, Hill JM. Prevention of fetal demise and growth restriction in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 2001 May;297(2):774-9.
97. Kumral A, Yesilirmak DC, Sonmez U, Baskin H, Tugyan K, Yilmaz O, et al. Neuroprotective effect of the peptides ADNF-9 and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res* 2006 Oct 18;1115(1):169-78.
98. Gozes I, Giladi E, Pinhasov A, Bardea A, Brenneman DE. Activity-dependent neurotrophic factor: intranasal administration of femtomolar-acting peptides improve performance in a water maze. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 Jun;293(3):1091-8.
99. Alcalay RN, Giladi E, Pick CG, Gozes I. Intranasal administration of NAP, a neuroprotective peptide, decreases anxiety-like behavior in aging mice in the elevated plus maze. *Neurosci Lett* 2004 May 6;361(1-3):128-31.
100. Gozes I, Alcalay R, Giladi E, Pinhasov A, Furman S, Brenneman DE. NAP accelerates the performance of normal rats in the water maze. *J Mol Neurosci* 2002 Aug-Oct;19(1-2):167-70.
101. Gozes I, Morimoto BH, Tiong J, Fox A, Sutherland K, Dangoor D, et al. NAP: research and development of a peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP). *CNS Drug Rev* 2005 Winter;11(4):353-68.
102. Ashur-Fabian O, Giladi E, Furman S, Steingart RA, Wollman Y, Fridkin M, et al. Vasoactive intestinal peptide and related molecules induce nitrite accumulation in the extracellular milieu of rat cerebral cortical cultures. *Neurosci Lett* 2001 Jul 20;307(3):167-70.
103. Visochek L, Steingart RA, Vulih-Shultzman I, Klein R, Priel E, Gozes I, et al. PolyADP-ribosylation is involved in neurotrophic activity. *J Neurosci* 2005 Aug 10;25(32):7420-8.
104. Quintana FJ, Zaltzman R, Fernandez-Montesinos R, Herrera JL, Gozes I, Cohen IR, et al. NAP, a peptide derived from the activity-dependent neuroprotective protein, modulates macrophage function. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Jul;1070:500-6.

105. Hill JM, Gozes I, Hill JL, Fridkin M, Brenneman DE. Vasoactive intestinal peptide antagonist retards the development of neonatal behaviors in the rat. *Peptides*1991 Jan-Feb;12(1):187-92.
106. Gozes I, Divinsky I, Pilzer I, Fridkin M, Brenneman DE, Spier AD. From vasoactive intestinal peptide (VIP) through activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) to NAP: a view of neuroprotection and cell division. *J Mol Neurosci*2003;20(3):315-22.
107. Inc. AT. 2007; Available from: www.allontherapeutics.com/index.htm.
108. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull*1993 Jul;49(3):577-87.
109. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*1993 Sep 1;90(17):7915-22.
110. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*2006 Jun;97(6):1634-58.
111. Khan JY, Black SM. Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. *Pediatr Res*2003 Jul;54(1):77-82.
112. Steingart RA, Gozes I. Recombinant activity-dependent neuroprotective protein protects cells against oxidative stress. *Mol Cell Endocrinol*2006 Jun 27;252(1-2):148-53.

CAPÍTULO II

5 MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de responder às questões levantadas nesta dissertação de mestrado, realizou-se um estudo analítico, intervencional, experimental *in vivo*, controlado e randomizado. Dessa forma, analisaram-se dano ao DNA, peroxidação lipídica e níveis de glutatona reduzida e oxidada no hipocampo de ratos neonatos submetidos ao modelo de CH e administrados com o neuropeptídeo NAP.

5.1 ANIMAIS

Ratas Wistar prenhas foram obtidas no próprio Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul ou adquiridas do biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em condições controladas de luz – com ciclo 12:12 horas de claro-escuro – e temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), recebendo água e ração *ad libitum*. Além disso, todos os procedimentos estavam de acordo com normas de experimentação animal do Comitê de Ética e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob aprovação de registro CEP 07/03852 (apêndice A).

As ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes, tendo sempre que possível um máximo de 6 e mínimo de 2 filhotes macho. A distribuição dos animais ocorreu de forma randomizada e disposta em quatro grandes grupos experimentais: normóxico (N), N + NAP (0,03, 0,3 e 3 $\mu\text{g/g}$), CH e CH + NAP (0,03, 0,3 e 3 $\mu\text{g/g}$); tabela 1. O dia do nascimento dos ratos foi considerado P0, e o modelo experimental realizado em P10, o que corresponderia ao estágio de desenvolvimento de uma criança a termo. O cegamento da identificação dos grupos ocorreu após coleta das amostras biológicas, sendo que a codificação das lâminas e amostras se mantiveram em sigilo até o término da coleta de dados ¹.

Tabela 3 – Número amostral

Grupo	Momento de Análise						
	0 h	1 h	3 h	6 h	24 h	72 h	168 h
Normóxico	4	4	4	4	4	4	4
N + NAP 3	–	–	4	4	4	–	–
N + NAP 0,3	–	–	4	4	4	–	–
N + NAP 0,03	–	–	4	4	4	–	–
CH	4	4	4	4	4	4	4
CH + NAP 3	–	–	4	4	4	–	–
CH + NAP 0,3	–	–	4	4	4	–	–
CH + NAP 0,03	–	–	4	4	4	–	–

N: grupo “normóxico”; CH: grupo “crises convulsivas induzidas por hipóxia”.

5.2 MODELO ANIMAL DE CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR HIPÓXIA

Ratos P10 foram separados de suas mães e dispostos numa câmara de acrílico (1.500 mL) hermeticamente fechada e parcialmente submersa em água a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (figura 9). Obteve-se hipóxia global com entrada rápida de nitrogênio na câmara até atingida a concentração de oxigênio (O_2) ideal, monitorada através de um medidor de oxigênio (Modelo DG-400, Instrutherm, Brasil) acoplado à câmara. Dados de saturação de oxigênio cerebral (StO_2), frequência cardíaca (FC) e registro EEG foram coletados continuamente durante a aplicação deste modelo experimental. Durante 12 minutos do procedimento, a concentração de O_2 no interior da câmara manteve-se de 5-7%. A atividade convulsivante produzida neste modelo consiste de períodos de crises mioclônicas seguidos por atividade tônico-clônica de cabeça e patas posteriores²⁻⁴. No entanto, a imobilização do animal através de um contensor (Modelo CONTCA, Beiramar, Brasil), realizada a fim de diminuir os artefatos no registro EEG, não permitiu a observação destas manifestações comportamentais.



Figura 9 – Câmara de Hipóxia. Rato P10 disposto em câmara de hipóxia parcialmente submersa em água, com medidor de oxigênio interno. Nesta imagem representativa, o animal não está retido no contêntor e nem os sensores de monitoração de StO₂, FC e de EEG estão acoplados.

Sendo assim, somente os animais que apresentaram atividade epileptiforme no EEG caracterizada por pontas de alta frequência e/ou descargas de polipontas seguidas de atenuação do ritmo de base (padrão tipo surto-supressão), além de StO₂ menor que 20% do valor basal durante o modelo foram incluídos no estudo. Tais registros foram divididos em quatro períodos de gravação: (fase 1) 5 minutos de 21% O₂ para estabilização do sinal, (fase 2) período de transição entre 21-7% O₂, (fase 3) 12 minutos de hipóxia a 7-5% O₂, e (fase 4) 5 minutos de recuperação aos parâmetros fisiológicos basais do animal a 21% O₂. Assim que houve restabelecimento da StO₂ e FC basais, após abertura da câmara e normalização da concentração de O₂ no interior da mesma, o animal recebeu a respectiva administração e retornou para a sua ninhada correspondente.

5.2.1 Monitoramento da StO₂, FC e EEG

A StO₂, FC e registro EEG foram continuamente monitorados utilizando o aparelho Morfeu-bio (Dolsch Ltda., RS, Brasil); figura 10. A tecnologia da espectroscopia de infravermelho proximal (NIRS, do inglês *near-infrared spectroscopy*) baseia-se na relativa transparência de tecidos biológicos frente à luz de infravermelho proximal, que reflete a presença de cromóforos (hemoglobina [Hb], citocromo aa3 e mioglobina) ⁵. Enquanto que a FC foi determinada utilizando a metodologia de oximetria de pulso, a determinação da StO₂ ocorreu através da atenuação de dois comprimentos de onda e distâncias entre o emissor e o detector. Pelo sensor, é possível estabelecer uma razão (porcentagem) da oxi-Hb frente à Hb total. Este parâmetro condiz com a StO₂ devido à transmitância da luz infravermelha mais

eficiente da Hb oxigenada (saturada) que a deoxigenada ⁶. O sistema de espectroscopia de infravermelho proximal tem uma onda pulsatória com banda espectral de 650-950 nm, e um diodo emissor de luz do tipo vermelho e infravermelho.

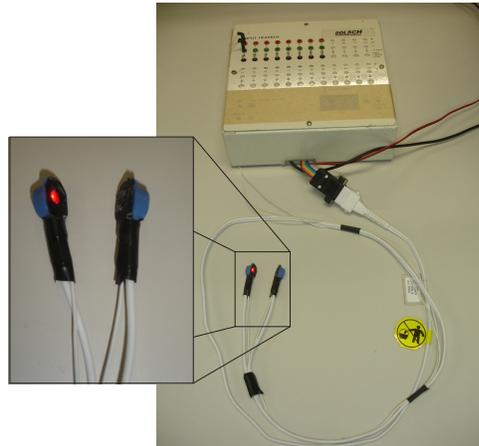


Figura 10 – Sistema Morfeu-bio de monitoramento de StO₂, FC e de EEG. Em detalhe, o sensor composto por um LED emissor de luz vermelha e infra-vermelha e um detector de alta sensibilidade. Juntamente a este sensor, eletrodos de captura de sinal de EEG.

Um sensor composto por um par de fotodiodos foi acoplado no escalpe dos animais, numa distância de 0,25 cm, antes de indução de crise convulsiva por hipóxia. A luz de infravermelho foi transmitida por um LED, sendo coletada por um fotodetector de alta sensibilidade fixo, a fim de garantir uniformidade da distância entre os fotodiodos. Obteve-se a quantificação da StO₂ a partir da diferença de sinal capturada pelo sensor, sendo expressa como índice de oxigenação (porcentagem de Hb oxigenada = Hb oxigenada / Hb total [Hb oxigenada + Hb deoxigenada]) ⁷.

Para registro de EEG, foram utilizados eletrodos subdermais dispostos biparietalmente no escalpo do animal com pasta condutora. Estes eletrodos foram conectados ao amplificador de sinal diferencial Morfeu-bio (Dolsch Ltda., RS, Brasil) com ampla banda de frequência e ganho programável. Houve determinação de rejeição do modo comum de 100 dB, e impedância de entrada maior que 100 Mom. Em seguida, os sinais passaram por módulos condicionadores, os quais filtram com uma banda de passagem de 0,1 a 64 Hz. Foi, então, direcionado para uma placa conversora analógico-digital, sendo esta conectada a um computador, via porta serial RS232. Após este processamento, a amplificação final foi de 10.000 vezes. Os registros foram realizados utilizando-se uma taxa de amostragem de 512 amostras por segundo. Foi utilizado o *software* Morfeu-bio (Dolsch Ltda., RS, Brasil) para

receber os impulsos cerebrais transmitidos pelo conversor analógico-digital e exibi-los para a análise simultânea (figura 11).

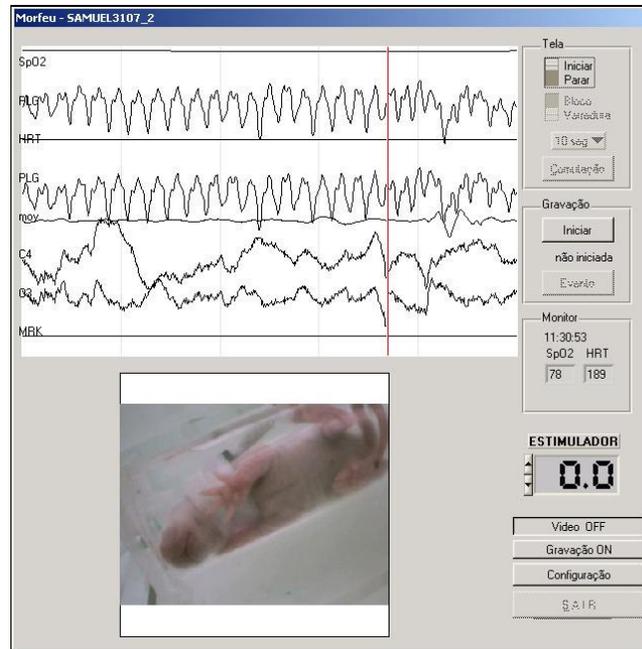


Figura 11 – Interface do software Morfeu-bio. Interface apresentando dados de StO_2 e FC, assim como tracejado de pulso e de EEG. Nesta imagem é possível observar o animal imobilizado por um contensor.

Qualquer medição que tenha sido associada à desconexão do sensor na pele do animal foi desconsiderada. A coleta de um sinal antes e depois do procedimento de hipóxia (5 minutos cada) foi conveniente para caracterizar o evento hipóxico. Sendo estas medições realizadas para estimar mudanças na oxigenação numa escala de tempo de segundos, um segundo de aquisição correspondeu à coleta de dados em 30 pontos consecutivos. Deste modo, houve melhora na relação sinal e ruído deste monitoramento.

5.3 ADMINISTRAÇÃO DO NEUROPEPTÍDEO NAP

O neuropeptídeo NAP (NAPVSIPQ) foi adquirido da Sigma Genosys (Woodlands, TX). Este peptídeo foi dissolvido em PBS com 10% de DMSO, sendo armazenado em alíquotas de 1mM a $-20^{\circ}C$. Por apresentar estabilidade em solução, pode ser alíquotado e congelado para usos posteriores sem perda de função. A solução final de NAP foi preparada a

partir de uma solução estoque diluída 100x em PBS estéril, seguida de diluições posteriores. Os animais dos respectivos grupos receberam administração intraperitoneal deste peptídeo em diferentes dosagens (0,03, 0,3 ou 3 $\mu\text{g/g}$ do peso corporal; 0,1 mL) assim que foram retirados da câmara de hipóxia. Os ratos do grupo N foram submetidos ao mesmo protocolo experimental, exceto a permanência em hipóxia, e administrados com salina. Já o grupo N + NAP foi composto por animais não hipóxicos, mas administrados com solução contendo este peptídeo. Todos os animais foram devolvidos para suas respectivas mães após terem sido administrados, procurando deixá-los com temperatura de 32-34°C⁸.

5.4 ESTRATÉGIAS EMPREGADAS NESTE TRABALHO

O enfoque principal deste trabalho foi analisar o impacto tempo dependente das CH sobre a integridade do DNA hipocampal, através do ensaio cometa. Estabelecido isto, houve a possibilidade de verificar o efeito da administração do neuropeptídeo NAP nesta constatação. Adicionalmente, duas outras abordagens experimentais foram efetuadas para aprimorar o panorama de estresse oxidativo neste modelo animal e também sob ação do respectivo peptídeo. Tais testes complementares compreenderam a peroxidação lipídica e os níveis de glutathiona reduzida e oxidada.

5.4.1 Ensaio cometa alcalino

Após indução de CH e administração correspondente de NAP, os animais foram anestesiados e sacrificados em diferentes tempos de análise. Os encéfalos foram isolados e rapidamente colocados em solução salina gelada. Hipocampos de ambos hemisférios foram separados da estrutura cerebral e um deles foi homogeneizado em 300 μL de solução de Hanks balanceada, a fim de obter uma suspensão celular para o ensaio cometa alcalino. O hipocampo remanescente foi armazenado em temperatura de -80°C para análises bioquímicas posteriores. Aproximadamente, 20 μL da suspensão celular foi embebida em 90 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,75 %. Este volume (células/agarose) foi espalhado em uma lâmina pré-coberta com agarose e coberto com lamínula. Após resfriamento das lâminas

em geladeira, as lâminulas foram retiradas, deixando apenas um microgel de agarose contendo células hipocampus dispersas.

Logo após, as lâminulas foram colocadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 10) por 48 horas a 4°C. Em seguida, foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com tampão (40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA, pH 8) e adicionou-se, sobre as lâminulas, 60 µL de solução contendo a enzima respectiva (Fpg ou Endo III) ou tampão. As lâminulas contendo solução tampão ou Fpg permaneceram sob incubação por 30 minutos em câmara úmida a 37°C, enquanto para Endo III, a incubação durou 45 minutos.

Posterior a esta etapa, as lâminulas foram retiradas e as lâminulas colocadas na cuba para tratamento alcalino (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13). A eletroforese foi conduzida a 4 °C por 20 minutos, a 25 V e 300 mA. Finalizada a eletroforese, houve neutralização das lâminulas com 0,4 M Tris (pH 7,5). Quando secas (temperatura ambiente ou 1 hora a 37°C), estas foram fixadas e coradas com coloração de prata para posterior análise (figura 12)⁹⁻¹¹.

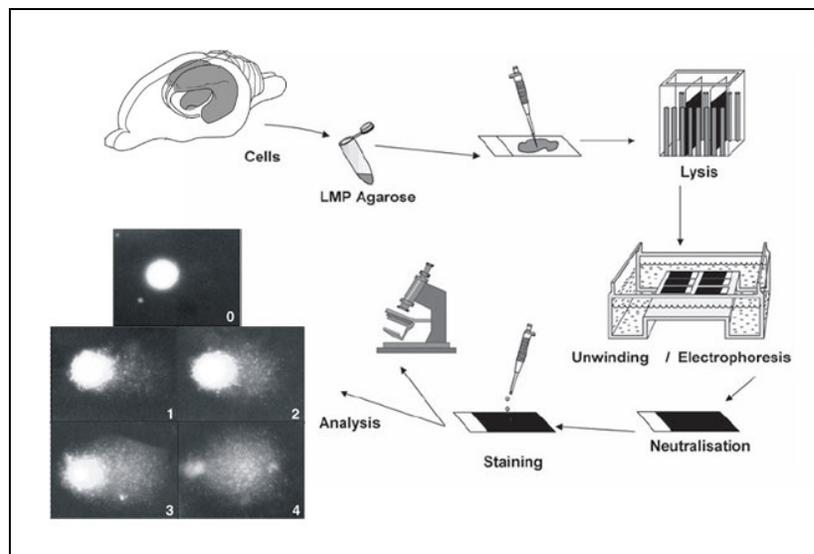


Figura 12 – Metodologia do Ensaio Cometa. Fonte: adaptado de Speit e Hartmann (2006, p. 89).

Os cometas são classificados em cinco classes de dano, denominadas de classe 0 a classe 4. A classe 0 corresponde aos cometas considerados intactos, sem danos causados por determinado processo; classe 1, cometas com danos mínimos; classe 2, cometas com danos médios; classe 3, cometas com danos intensos; classe 4, cometas com danos máximos. O ID

representa a soma da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador correspondente, através da fórmula $ID = 1 \times (\text{n}^\circ \text{ de classe } 1) + 2 \times (\text{n}^\circ \text{ de classe } 2) + 3 \times (\text{n}^\circ \text{ de classe } 3) + 4 \times (\text{n}^\circ \text{ de classe } 4)$ e expresso em unidade arbitrária (0–400) ¹².

5.4.2 Peroxidação Lipídica

O grau de peroxidação lipídica foi determinado pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com malondialdeído (MDA), um produto de formação da peroxidação lipídica durante reação ácida aquecida. Este ensaio foi efetuado conforme Salgo e Pryor (1996), com algumas modificações ¹³. Em suma, as amostras foram misturadas com Tris-HCl (15 mM; 1 hora) antes e após lise. A este lisado foi adicionado 1 mL de TCA (0,4 mg/mL) e 0,25 M HCl, sendo posteriormente incubado com 6,7 mg/mL TBA por 15 minutos em temperatura de 100°C. Esta solução foi centrifugada a $750 \times g$ por 10 minutos. Como o TBA reage com outros produtos de peroxidação lipídica além do MDA, os resultados foram expressos em equivalentes de MDA (nmol/mg de proteína), o qual foi determinado por espectrofotometria na região visível em 532 nm. O composto 1,1,3,3-tetrametoxipropan hidrolisado foi usado como padrão. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo protéico ^{12, 14}.

5.4.3 Determinação de Glutathiona Reduzida e Oxidada

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram verificados por determinação fotométrica do 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), que é produzido a partir do ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DNTB) em uma reação cinética com uso da enzima glutathiona redutase, de acordo com Akerboom e Sies (1981) com pequenas modificações ¹⁵. Para cada amostra foi adicionado 0,1 M de fosfato de sódio e 5 mM de EDTA (pH 8), seguido de sonicação para obter um homogeneizado celular. Aproximadamente, um volume de 2 mol/L de HClO₄ e 4 mM de EDTA foi acrescido ao extrato celular, e as proteínas precipitadas foram sedimentadas por centrifugação a $8000 \times g$ por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi neutralizado com 2 mol/L de KOH e 0,3 mol/L MOPS, e o resíduo insolúvel foi removido por centrifugação sob as mesmas condições. Para determinação espectrofotométrica, 910 µL do sobrenadante do

extrato celular ou da solução padrão de glutathiona, no mesmo tampão fosfato-EDTA, foram misturados com 50 μL de 4 mg/mL NADPH em 0,5% (w/v) NaHCO_3 , 20 μL de 6 U/mL glutathiona redutase em tampão fosfato-EDTA, e 20 μL de 1,5 mg/mL DTNB em 0,5% NaHCO_3 . O aumento da absorbância foi medido em 412 nm. O conteúdo de glutathiona foi normalizado pelo conteúdo protéico¹⁴. Para determinação de GSSG, 4-vinilpiridina foi adicionada ao extrato em concentração final de 0,1% (v/v), e então incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Nesta concentração, 4-vinilpiridina é capaz de reagir com GSH sem interferir na determinação de GSSG. Dessa forma, a concentração de GSH foi medida tendo como base os resultados de concentração de GSSG e glutathiona total¹². Os resultados foram normalizados pelo conteúdo protéico¹⁴.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise foi realizada através do *software* PrismGraph 5.0 (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Os dados foram expressos em média e desvio padrão para variáveis de distribuição normal. Dados de StO_2 e FC foram analisados por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguido do teste *post hoc* de Dunnett. Para análise do perfil temporal de dano ao DNA, formação de bases oxidadas, peroxidação lipídica, depleção de GSH e o efeito do NAP sobre o dano ao DNA hipocampal, foi utilizado ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. Para o efeito do NAP sobre a formação de bases oxidadas, conteúdo de MDA e níveis de GSH hipocampal, foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Dunnett. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de $\alpha = 0,05$ e $p < 0,05$.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*2003 Jan;18(1):45-51.
2. Jensen FE. An animal model of hypoxia-induced perinatal seizures. *Ital J Neurol Sci*1995 Feb-Mar;16(1-2):59-68.
3. Jensen FE, Applegate CD, Holtzman D, Belin TR, Burchfiel JL. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann Neurol*1991 Jun;29(6):629-37.
4. Koh S, Tibayan FD, Simpson JN, Jensen FE. NBQX or topiramate treatment after perinatal hypoxia-induced seizures prevents later increases in seizure-induced neuronal injury. *Epilepsia*2004 Jun;45(6):569-75.
5. von Siebenthal K, Bernert G, Casaer P. Near-infrared spectroscopy in newborn infants. *Brain Dev*1992 May;14(3):135-43.
6. Petrova A, Mehta R. Near-infrared spectroscopy in the detection of regional tissue oxygenation during hypoxic events in preterm infants undergoing critical care. *Pediatr Crit Care Med*2006 Sep;7(5):449-54.
7. Chien JC, Jeng MJ, Chang HL, Lee YS, Lee PC, Soong WJ, et al. Cerebral oxygenation during hypoxia and resuscitation by using near-infrared spectroscopy in newborn piglets. *J Chin Med Assoc*2007 Feb;70(2):47-55.
8. Kumral A, Yesilirmak DC, Sonmez U, Baskin H, Tugyan K, Yilmaz O, et al. Neuroprotective effect of the peptides ADNF-9 and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res*2006 Oct 18;1115(1):169-78.
9. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*2000;35(3):206-21.
10. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*1988 Mar;175(1):184-91.

11. Picada JN, Flores DG, Zettler CG, Marroni NP, Roesler R, Henriques JA. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res Mol Brain Res*2003 May 26;114(1):80-5.
12. Rosa RM, do Nascimento Picada J, Saffi J, Henriques JA. Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutat Res*2007 Apr 2;628(2):87-98.
13. Salgo MG, Pryor WA. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys*1996 Sep 15;333(2):482-8.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*1951 Nov;193(1):265-75.
15. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*1981;77:373-82.

CAPÍTULO III

Regular article to *Neurobiology of Disease* ♦

Neuropeptide NAP prevents hippocampal oxidative damage of neonatal rats subjected to hypoxia-induced seizure model

Samuel Greggio^a, Renato M. Rosa^b, Alexandre Dolganov^a, Iuri M. de Oliveira^c, Fernanda D. Menegat^c, João A. P. Henriques^{b, c}, Jaderson C. Dacosta^{a, *}

^a *Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

^b *Laboratório de Genética Toxicológica e Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil.*

^c *Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

* Correspondence author: Jaderson Costa Dacosta, MD, PhD.

Instituto do Cérebro (INSCER), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6690, Jardim Botânico, Prédio 60, 2º andar, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: +5551 33202173

Fax: +5551 33203312

E-mail: jcc@pucls.br

Abstract

Neonatal seizures have challenging diagnosis and limited efficacy treatment, with hypoxic-ischemic encephalopathy the main triggering etiology. The role of oxidative stress on hypoxia-induced seizures (HS) has not been explored yet. We used a rodent model of HS in order to investigate the temporal formation of oxidative biomarkers in developing hippocampus. Our experiments have shown elevated DNA damage by comet assay just after the insult until 72 h post-HS, but Endo III- and Fpg-sensitive sites were only detected at 3-24 h. Thiobarbituric acid reactive species peaked among 1-24 h after HS insult, followed by reduced glutathione level decreased at 3-72 h. Given the extensive neuroprotection and antioxidant capacity of peptide NAP, we hypothesized if NAP administration could reestablish the integrity of hippocampal DNA and redox status compromised by HS model. Then, NAP dose-dependently prevented HS-induced oxidative damage to DNA and lipid membranes, in correlation with glutathione system modulation at 3, 6 and 24 h post-HS. Hence, NAP administration may be a viable strategy in ameliorating HS-induced oxidative damage.

Keywords: developing hippocampus, oxidative stress, oxidative DNA damage, hypoxia-induced seizures, rodent model, neuropeptide NAP, neuroprotection.

Introduction

Clinically, the immature brain is more susceptible to seizures in the first year of life (Volpe, 2001), mainly in the neonatal period, with an incidence of 1–4 per 1000 live births (Bartha et al., 2007), and hypoxic-ischemic encephalopathy remains the leading cause of refractory neonatal seizures (Volpe, 2001). Since postnatal hypoxia alters key developmental programs of the newborn brain (Curristin et al., 2002), early-life seizures can also cause functional alterations in neuronal networks, rendering the brain prone to later epilepsy and cognitive deficits (Ben-Ari and Holmes, 2006). Unfortunately, there is consensus that currently anticonvulsants are potentially neurotoxic to immature brain and often ineffective to treat neonatal seizures (Sankar and Painter, 2005). Still, when the clinical manifestations are suppressed, electroencephalographic (EEG) recordings show ongoing cortical seizures activity (Connell et al., 1989).

One promising aspect of the knowledge about the role of oxidative stress in neonatal seizures associated with hypoxia is the development of therapeutic strategies based on antioxidant supplementation to protect the vulnerable immature brain. Recently, a novel octapeptide termed NAP, derived from the VIP-responsive glial protein activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) (Bassan et al., 1999), has demonstrated extensive neuroprotection against multiple toxins *in vitro* and in several animal models (Gozes et al., 2005). In this respect, NAP has been identified to protect neurons against oxidative stress (Busciglio et al., 2007; Steingart and Gozes, 2006; Steingart et al., 2000), preventing the decrease of glutathione content (Offen et al., 2000) and also against severe oxidative stress associated with fetal alcohol syndrome (Spong et al., 2001). Given the breadth of the protective activities of NAP and brain permeable capacity, its use seems convenient for pediatric patients. However, at this moment, the neuroprotective effect of NAP has not been explored in neonatal hypoxia-induced seizures (HS).

Despite studies have implicated reactive oxygen and nitrogen species (RONS) to role the hypoxic injury and the progression of post-hypoxic reoxygenation (Mishra et al., 2000; Mishra et al., 2006), as well as seizure-induced oxidative damage to susceptible subcellular targets (Liang et al., 2000; Patel et al., 2008; Patel et al., 2001), little is known about its participation on HS in the immature brain. To address this issue, we used a rodent model in which 10-day-old rat pups are exposed to transient global hypoxia and exhibit spontaneous electrographic and behavioral seizures. The HS rats present decreased seizure thresholds throughout adulthood, thus mimicking clinical aspects of neonatal hypoxic encephalopathy

(Jensen, 1995). For these purposes, single cell gel electrophoresis (comet assay) was employed in conjunction with DNA-modifying enzymes to investigate the temporal profile of the formation of early, oxidative DNA damage in hippocampal tissue of neonatal rats subjected to HS model. Besides, to evaluate the possible mechanism underlying damaging effects, we also assessed reduced glutathione (GSH) content and thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels, two known oxidative stress biomarkers. Then, here we asked to what extent the integrity of hippocampal DNA and redox status are compromised by HS on neonatal rat, and if so, whether NAP treatment could provide ablative capacity on oxidative stress generated from this brain insult.

Materials and Methods

Chemicals

Reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), NADPH, glutathione reductase, thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP), 5,5'-dithionitrobenzoic acid (DTNB), 4-vinyl-pyridine and dimethyl sulfoxide (DMSO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Tris, Triton X-100, trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Normal and low-melting point agaroses were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III) were obtained from New England BioLabs (Beverly, MA, USA). All other reagents were of analytical grade.

Animals

Pregnant female Wistar rats were purchased from the colony of the Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil). Females were housed individually and the presence of pups was checked daily. The day of the birth was considered day 0, and on postnatal day (PND) 1, the litters were culled to 8 rat pups per dam. The animals were maintained in the same temperature and humidity-controlled holding facility (22-24°C) under a 12/12 light/dark cycle (light onset at 7:00 AM), with freely access to food and water. Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Experiments procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care.

Hypoxia-induced seizure model

Rats on PND 10 were subjected to HS as described by Jensen with minor modifications (Jensen, 1995). Although it is not possible to accurately equate ages in rats and humans, a 10-day-old rat would be roughly equivalent between a full-term newborn to an infant (Haut et al., 2004). Rats were removed from the litter and placed in a custom-made airtight acrylic chamber in a water bath to maintain temperature at 34°C. One chamber (control) was left uncovered and continuously exposed to room air (21% O₂), whereas the other (hypoxia) was covered. Following this, the latter has its O₂ concentration reduced to 5-7% and maintained at this level by constant, regulated infusion of N₂ gas into the chamber.

Intra-chamber O₂ concentration was measured with a commercially available oxygen meter placed inside it (Model DG-400, Instrutherm, SP, Brazil). This model results in acute hypoxic seizures in all the pups with minimal if any mortality. As the rat pups were immobilized for avoiding movement artifacts on EEG recording, it was not possible to verify convulsive behavior as tonic clonic head and trunk movements. Presently, the total duration of hypoxia was 12 min. For this study, only rats exhibiting on the EEG epileptiform activity characterized by high frequency spikes and/or bursts of polyspikes followed by marked voltage-attenuation of the EEG background (burst-suppression pattern), associated with cerebral tissue oxygen saturation (StO₂) reduction in at least 20% during the hypoxia period were used in this study. All rats were returned to their dams just after HS induction.

Measurement of physiological variables

Heart rate (HRT), StO₂ and EEG activity were continuously monitored using the Morfeu-bio apparatus (Dolsch Ltda, RS, Brazil). The recordings for each rat were divided into 4 stages: phase 1 corresponds to a 5-min period of signal stabilization with 21% O₂; phase 2 comprehends the transition period from 21% to 7% O₂; phase 3 represents the 12-min time required for HS induction with 5-7% O₂; phase 4 is for StO₂ and HRT reestablishment at basal levels within 5 min of recovery. Since near-infrared spectroscopy (NIRS) technology uses the relative transparency of biological tissue to near-infrared light, reflecting the presence of chromophores, as hemoglobin, the StO₂ was determined by measuring the attenuation of light at two wavelengths and distances between the emitter and detector (von Siebenthal et al., 1992). The Morfeu-bio sensor has one detector to measure the ratio (percentage) of oxyhemoglobin to total hemoglobin, and this reflects StO₂ because oxygenated hemoglobin transmits light of infrared wavelength much more efficiently than deoxygenated hemoglobin. The NIRS system was a pulse wave, broadband (650-950 nm) unit composed of two laser diode (LD) sources, 5 mW power. A pair of photodiode was attached 0.25 cm apart, and placed extradermally over the frontoparietal region of the rat brain before HS induction. Near-infrared light was emitted by diodes, and a fraction of the transmitted light was collected by the high sensitive photo detector fixed in a probe holder to ensure an interoptode distance. Quantification of StO₂ was calculated from the differential signal obtained from sensor, expressed as a tissue oxygenation index (percentage of oxygenated hemoglobin = oxygenated hemoglobin / total hemoglobin [oxygenated hemoglobin + deoxygenated hemoglobin]) (Chien et al., 2007). For acquiring simultaneous HRT measurement, it was used optical pulse wave reference. EEG data were acquired with transmitters coupled on the NIRS sensors

configured to record 2-channel scalp EEG. Any measurements that were associated with dislodgement of the skin sensor were not considered. Baseline EEG and physiologic measurements were made for 5 min before and after hypoxia, as well as in the hypoxic period, in order to characterize the animal model of HS. Since these recordings are aimed to measure cerebral hemodynamics and oxygenation changes occurring on the time scale of seconds, we have averaged 30 consecutive data points (corresponding to 1.0 s of acquisition) to improve the signal-to-noise ratio of our measurements.

NAP administration and hippocampal processing

The neuropeptide NAP (NAPVSIPO) was purchased from Sigma Genosys (Woodlands, TX) with purity (> 95%) and identity assessed by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry analysis. NAP was dissolved in 10% DMSO in PBS (0.13 M NaCl, 0.003 M KCl, 0.01 M Na₂HPO₄, and 0.002 M KH₂PO₄) and stored as 1-mM aliquots. NAP was stable in solution and could be aliquoted and frozen for later use without loss of activity. Final peptide solution was freshly prepared by stock peptide solution diluted in distilled sterile PBS (Kumral et al., 2006). For rat pups treated with neuropeptide NAP, an intraperitoneal injection of NAP solution at a dose of 0.03, 0.3 or 3 µg/g of body weight (0.1 mL) was administered just after HS insult. In this study, four experimental groups of rat pups on PND 10 were used: vehicle-treated HS animals (HS), NAP-treated HS animals (NAP 0.03, NAP 0.3 and NAP 3, respectively at dosages), vehicle-treated normoxic animals and NAP-treated normoxic animals. Rats were either killed by decapitation immediately after HS induction (0 h) or allowed to recover in ambient air for 1, 3, 6, 24, 72 and 168 h prior to killing. The number of animals in each experimental group and analysis point was 4. Brains were quickly removed, kept in ice-cold saline and hippocampal structures were immediately dissected onto Petri dishes placed on ice. One hippocampus was gently homogenated in ice-cold 0.3 mL Hanks' solution for alkaline comet assay, and the contralateral one was stored at - 80°C until used for posterior biochemical analysis.

Determination of DNA damage and oxidized bases

The alkaline comet assay was performed as described by Singh with minor modifications (Singh et al., 1988). Aliquots of the hippocampus homogenate (20 µL) were mixed with 0.75% warm low-melting point agarose and immediately spread onto an ordinary microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. This mixture was then evenly distributed across the microscope slide following the application of a

coverslip and allowed to set at 4°C for 5 min prior to removal of the coverslips. Slides were then incubated in icecold lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10.0), protected from light and stored at 4°C for at least 4 days in order to remove cell proteins, leaving DNA as ‘nucleoids’. In the modified version of comet assay, the slides were removed from the lysing solution and washed three times in enzyme buffer (2400 mM HEPES, 1 M KCl, 5 mM EDTA, 2 mg/mL bovine serum albumin, pH 8.0), drained and incubated at 37°C in this buffer with 60 µL of Fpg for 30 min – for oxidized purines detection; 1 µg/mL solution; 100 mU per gel – and Endo III for 45 min – for oxidized pyrimidines detection; 1 µg/mL solution; 100 mU per gel. The slides were then transferred to a tank containing electrophoresis solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, freshly prepared, pH > 13.0), and stored for 20 min at 4°C prior to being transferred to a horizontal electrophoresis tank in a chilled incubator and covered in fresh electrophoresis solution (pH > 13.0). Electrophoresis was performed for 20 min at 25 V and 300 mA (0.90 V/cm). All the steps above were conducted under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), washed in bi-distilled water and stained using a silver nitrate staining protocol as described elsewhere (Nadin et al., 2001). After drying at room temperature, gels were analysed using an optical microscope. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed for each time post-HS. When selecting cells, the edges and cells around air bubbles were avoided. Cells were visually scored according to tail length into five classes: (i) class 0: undamaged, without a tail; (ii) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (iii) class 2: with a tail length 1–2x the diameter of the head; (iv) class 3: with a tail longer than 2x the diameter of the head and (v) class 4: comets with no heads. A value of damage index (DI) was assigned to each comet according to its class. For the visual score analysis, the slides were coded and after scored blindly. International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method (Burlinson et al., 2007). The DI is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail, and it is considered a sensitive DNA measurement. DI ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4) as arbitrary units (AU). The vehicle was used as negative control, and 150 µM H₂O₂ for 5 min at 4 °C was used as positive control.

Determination of lipid peroxidation

The extent of lipid peroxidation was determined by the reaction of TBA with malondialdehyde (MDA), a product formed by lipid peroxidation, during an acid-heating reaction. The assays were performed according to Salgo and Pryor with minor modifications (Salgo and Pryor, 1996). Briefly, the samples were mixed with and after lysis with Tris-HCl (15 mM for 1 h). Two milliliters 0.4 mg/mL TCA, 0.25 M HCl were added to the lysate, which was then incubated with 6.7 mg/mL TBA for 15 min at 100°C. The mixture was centrifuged at $750 \times g$ for 10 min. As TBA reacts with other products of lipid peroxidation in addition to MDA, results are expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein), which were determined by absorbance at 532 nm. TMP was used as the standard. The results were normalized by protein content (Lowry et al., 1951).

Determination of GSH levels

Intracellular GSH were determined by photometric determination of 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), which was produced from DTNB in a kinetic assay, according to Akerboom and Sies with minor modifications (Akerboom and Sies, 1981). Samples were mixed in 0.1 M sodium phosphate-5mM EDTA pH 8.0, and sonicated to obtain the cell homogenate. An equal volume of 2M HClO₄-4mM EDTA was added to the cell extract, and the precipitated proteins were sedimented by centrifugation at $8000 \times g$ for 10 min at 4°C. The supernatant was neutralized with 2 M KOH and 0.3 M MOPS, and the insoluble residue was removed by centrifugation under the same conditions. For the spectrophotometric determination, 910 µL of the cell extract supernatant or of the standard glutathione solution, in the same phosphate-EDTA buffer, were mixed with 50 µL of 4 mg/mL NADPH in 0.5% (w/v) NaHCO₃, 20 µL of 6 U/mL glutathione reductase in phosphate-EDTA buffer, and 20 µL of 1.5 mg/mL DTNB in 0.5% NaHCO₃. The increase in absorbance was measured at 412 nm. Total glutathione content was normalized by protein content (Lowry et al., 1951). For GSSG determination, 4-vinylpyridine was added to a final concentration of 0.1% (v/v), and then incubated for 1 h at room temperature. At this concentration, 4-vinylpyridine is able to react with all GSH without interfering with the GSSG determination. GSH was determined based on the total glutathione and GSSG concentration results.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using PrismGraph 5.0 software (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Data were expressed as mean \pm standard deviation (S.D.). For physiological variables changes, it was performed repeated analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison post hoc test. The statistical analysis of temporal formation of hippocampal DNA damage, oxidized bases, TBARS levels, reduced GSH depletion and the effect of NAP treatment on DNA damage were performed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. The effect of NAP treatment on oxidative DNA damage, TBARS levels and reduced GSH depletion were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post hoc test. A statistical significance level of $\alpha = 0.05$ and $p < 0.05$ was applied to all tests.

Results

Monitoring of physiological parameters

EEG activity, HRT and StO₂ were simultaneously measured for the animals at four different stages during HS model protocol (n = 64 rat pups). Table 1 depicts the results in the physiological changes during the rodent model procedure. Both HRT and StO₂ measured at phase 3 were significantly lower than the corresponding values prior ($p < 0.001$, phase 1; $p < 0.001$, phase 2) and after ($p < 0.001$, phase 4) to HS induction. The basal StO₂ values were in agreement with other reports assessing this biological parameter through NIRS methodology in adult rats and human infant brain (Chen et al., 2003; Franceschini et al., 2007). For all rat pups subjected to hypoxia, burst-suppression pattern were detected in EEG recordings (Fig. 1). In the figure 2, it could be visualized a representative physiological profile during the overall HS model protocol, showing epileptiform discharges (high frequency spikes) on the EEG associated with HRT and StO₂ parameters reduction during the period of global hypoxia.

Temporal profile of DNA damage and oxidative adducts formation in the immature rat hippocampus subjected to HS model

Cell viability for all samples was found to be more than 90% in every experiment. The internal controls of the comet assay showed low damage in the negative control (DI = 0-10) and high damage in the positive control (DI = 180-300), thus validating the test conditions. As expected, exposure of hippocampal cells isolated from normal animals to H₂O₂ resulted in a significant increase in DNA damage (data not shown). In the figure 3, it is possible to observe the temporal profile of hippocampal DNA damage occurrence, detected by alkaline comet assay, in normoxic and HS rats. A two-way ANOVA comparing the groups of animals and different reperfusion times revealed a significant interaction [$F_{(1,42)} = 44.71$, $p < 0.0001$]. Bonferroni post hoc test had demonstrated increased in hippocampal DNA damage just after HS insult (0 h; $p < 0.001$), as well as all other post-HS time points ($p < 0.001$) except at 168 hours. With this pattern of findings, it is possible to suggest that the reperfusion period is a genotoxic condition more intense than the HS event.

In order to determine the oxidative nature of DNA damage on hippocampal cells from HS rats, we carried out modified comet assay. While in the alkaline test detects primary reparable DNA single- and double-strand breaks and alkali-labile sites, the modified version is more specific than the standard method. For that purpose, there is incubation step with

lesion-specific endonucleases, which recognizes resultant abasic sites and convert them into single-strand breaks. Here we have used Fpg, which is specific for oxidized purines – including 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, as well as other ring-opened purines – and Endo III, which targets oxidized pyrimidines, including thymine glycol and uracyl glycol (Dizdaroglu, 2005). In this manner, DI increase after enzymes incubation and this increment represents the extension of oxidative DNA damage. The levels of Endo III- and Fpg-sensitive sites were calculated from the score obtained with enzymes minus the score without enzyme (buffered). In the figure 4 is shown the profile of the difference between the oxidative DNA damage from related enzymes and respective buffer of normoxic and HS rats. Oxidative DNA damage identified by Endo III from hippocampus of HS rats was significantly higher than normoxic animals, indicating the occurrence of oxidized pyrimidines [$F_{(1,42)} = 12.48, p < 0.0001$] (Fig. 4A). Further post hoc analysis demonstrated that while there was a significant increase of Endo III sensitive sites in 3 h ($p < 0.001$), 6 h ($p < 0.001$) and 24 h ($p < 0.001$) after HS induction, this was not observed before and after this period. In the same fashion, oxidative DNA damage identified by Fpg could be observed [$F_{(1,42)} = 9.49, p < 0.0001$] (Fig. 4B) and post hoc analysis showed augment of oxidized purines in 3 h ($p < 0.01$), 6 h ($p < 0.001$) and 24 h ($p < 0.001$) post-HS. However, the temporal profile for both DNA-modifying enzymes in 72 h on, oxidized DNA bases were not observed anymore. Interestingly, correlating results from figure 1, it is possible to notice that in this time point DNA damage is still present, suggesting that these lesions do not belongs to oxidative insult. Consistent with the prediction that DNA is repaired in the brain, frequencies of ordinary and oxidatively generated DNA adducts were insignificant in the latest course of recovery after HS. Moreover, the same evidence can be found immediately (0 h) and 1 h post-HS, indicating that the necessary time to induce seizures through hypoxia only comprises the participation of non oxidative DNA damage in this early period.

Temporal profile of lipid peroxidation in the immature rat hippocampus subjected to HS model

To determine whether lipid peroxidation is triggered by HS insult, we examined the time-dependent degree of TBARS production in the hippocampus of neonatal rats subjected to the respective model. MDA can oxidize and modify different cellular components, including DNA, and accumulation of mutagenic lipid peroxidation-derived DNA lesions have been reported (Bartsch and Nair, 2005; Otteneder et al., 2006). A two-way ANOVA revealed

a significant interaction [$F_{(1,42)} = 21.77, p < 0.0001$] (Fig. 5). Within 3 h post-HS, hippocampal TBARS production is increased ($p < 0.001$), sharply elevated at 6 h ($p < 0.001$), and decline after 24 h ($p < 0.001$). Although it could be visualized slight TBARS production at 1 h after HS ($p < 0.05$), it has no difference in HS rat hippocampus against normoxic animals at 0 h, 72 h and 168 h after the HS induction.

Temporal profile of reduced GSH levels in the immature rat hippocampus subjected to HS model

In an attempt to further elucidate the possible mechanism of oxidative damage involved in HS insult, we also assessed hippocampal reduced GSH levels. GSH is a ubiquitous tripeptide and an important non-enzymatic constituent of cellular defense mechanism against oxidative stress. The reduced form is the most important free radical scavenging compound in the mammalian nervous system that prevents membrane lipid peroxidation via conversion into GSSG. The latter is rapidly recovered into GSH by specific NAD(P)H-dependent glutathione reductase. Since the conversion of GSH to its oxidized form generates an electron for use in stabilizing free radicals, it is generally believed that increases in free radical production occur in conjunction with decreases in GSH levels (Halliwell, 2006). It could be visualized evident change in the GSH level in this time-course study [$F_{(1,42)} = 11.73, p < 0.0001$] (Fig. 6). Interestingly, immediately after HS induction to 1 h, there is no significant difference between normoxic and HS rats in regard to GSH depletion. However, after 3 h post-HS there is GSH content reduction ($p < 0.001$), that decreases through 6 h ($p < 0.001$), until 24 h ($p < 0.001$). The significant GSH depletion observed at 72 h ($p < 0.05$) may represent the replenishment of glutathione content at homeostatic level.

NAP dose-dependently prevents HS-induced hippocampal DNA damage and oxidative adducts in the immature rat hippocampus

To determine neuropeptide NAP capacity of avoiding hippocampal DNA damage formation, it was used three different dose administrations on HS rats just after the insult. The assessment at 0 h was not included in this experimental design because there would not be any effect since the peptide could not reach central nervous system immediately after intraperitoneal access (Gozes et al., 2005; Spong et al., 2001). Hence, we could demonstrate dose-response effect of systemic NAP treatment on DNA damage in immature rat hippocampus after HS insult (Fig. 7). A two-way ANOVA comparing the experimental groups and different reperfusion times revealed a significant interaction [$F_{(3,72)} = 38.09,$

$p < 0.0001$]. Bonferroni post hoc test demonstrated that all doses of NAP had similar effect on preventing DNA damage formation at 6 h ($p < 0.001$), 24 h ($p < 0.001$) and 72 h ($p < 0.001$) after HS induction, except in the dose of 0.03 $\mu\text{g/g}$ at 6 h. Besides, no difference was verified at 1 and 3 h post-HS, even with the highest NAP concentration. The three NAP doses on normoxic rats did not induce statistical differences of DI values at any time point in comparison with vehicle-treated rats (data not shown). This is in a good agreement with previous report showing that neuropeptide NAP has no damaging effect upon DNA structure (Visochek et al., 2005).

On the basis of the beneficial outcome of NAP administration on hippocampal DNA damage, further experiments on oxidative adducts formation were performed in an attempt to understand the molecular mechanisms associated with its protective capacity. Then, we tested the dose-dependent effect of NAP by administering the same doses (0.03, 0.3 or 3 $\mu\text{g/g}$) just after HS modeling. Once again, we performed the comet assay with DNA-modifying enzymes, Endo III and Fpg, in three moments post-HS (3, 6 and 24 h) determined as critical time points of oxidative adducts formation in our previous experiments. An one-way ANOVA comparing DI among NAP-treated HS groups and vehicle-treated HS animals presents statistically significant differences in Endo III at 3 h ($p < 0.0001$; Fig. 8A), 6 h ($p = 0.0005$; Fig. 8B) and 24 h ($p < 0.0001$; Fig. 8C). In the same manner, Fpg assessment also demonstrated statistically significant differences at 3 h ($p < 0.0001$; Fig. 9A), 6 h ($p < 0.0001$; Fig. 9B) and 24 h ($p < 0.0001$; Fig. 9C). Further post hoc analysis revealed a dose-response effect of NAP treatment upon Endo III- and Fpg-sensitive sites formation at 3, 6 and 24 h post-HS. For all circumstances, NAP dose of 0.03 $\mu\text{g/g}$ was not capable to prevent purines and pyrimidines oxidation. Although NAP could prevent DNA damage specifically from oxidative origin at 3 h after HS insult (Figs. 8A and 9A), whichever NAP dose was not sufficient to reduce ordinary DNA breakage in this same time point (Fig. 7). These different NAP effect outcomes at 3 h post-HS is likely due to the specificity of alkaline comet assay in detecting common DNA breakage without gathering together DI values from oxidative adducts. For so, the latter is only detected by endonuclease-mediated conversion into single-strand breaks.

NAP dose-dependently prevents HS-induced lipid peroxidation in the immature rat hippocampus

Given the specific time for induction of hippocampal lipid peroxidation by HS insult in neonatal rats, we analyzed if NAP could have antioxidant effect also in lipid targets. An

one-way ANOVA demonstrated statistically difference at 3 h ($p = 0.0001$; Fig. 10A), 6 h ($p = 0.0006$; Fig. 10B) and 24 h ($p = 0.0005$; Fig. 10C). Additional post hoc test have shown that doses of 0.3 and 3 $\mu\text{g/g}$ are able to protect developing hippocampus from HS-mediated TBARS production at each of the time points analyzed. Similarly with oxidized adducts information, it was not possible to verify any difference of MDA equivalents between vehicle- and NAP-treated HS animals in NAP dose of 0.03 $\mu\text{g/g}$.

NAP dose-dependently prevents HS-induced losses of GSH homeostasis in the immature rat hippocampus

Reduced GSH levels were assessed in order to investigate a potential mechanism underlying the NAP treatment effects in HS rats, focusing in a possible intracellular GSH modulation. It can be seen that as the dose of NAP administration increases, GSH content becomes higher at 3 h ($p < 0.0001$; Fig. 11A), 6h ($p < 0.0001$; Fig. 11B) and 24 h ($p < 0.0001$; Fig. 11C) after HS insult. Once again, Dunnett's multiple comparison post hoc test demonstrated that the NAP dose of 0.03 $\mu\text{g/g}$ was not effective to augment the hippocampal GSH levels in the studied time frame. Interestingly, the effect of a single intraperitoneal injection of peptide NAP on HS rat pups seems to reproduce the dose-dependent effect on diminishing hippocampal DNA breakage, oxidative base damages and lipid peroxidation, correlating by the results of increased GSH levels in the same time course.

Discussion

In this study, we demonstrated that HS in neonatal rats result in a decrease of hippocampal reduced GSH content in a time dependent fashion, having parallel increasing of oxidative stress biomarkers. In this sense, establishing the temporal course of oxidative stress provides information on a possible therapeutic window for developing brain protection against HS insult. So, we demonstrated that NAP administration has a protective dose-dependent effect against hippocampal DNA damage, oxidative adducts formation, lipid peroxidation and GSH depletion. The present work shows, for the first time, the *in vivo* ablative capacity of NAP on oxidative lesions in hippocampus cells from neonatal rats subjected to HS.

Initially, studies in experimental seizure models with systemic kainic acid (KA) and pilocarpine, using adult animals, have documented DNA fragmentation identified by *in situ* nick translation histochemistry at distinct time points after seizures induction (Fujikawa et al., 2000; Lan et al., 2000; Weiss et al., 1996). However, conflicting TUNEL labelling outcomes were verified in P7 rats after KA- and pilocarpine-induced status epilepticus (SE) (Mikati et al., 2003; Santos et al., 2000). In adult rat brain, also hypoxia can promote mitochondrial and nuclear DNA damage (Englander et al., 1999). Fragmentation of neuronal DNA is observed in different brain regions of hypoxic newborn piglets (David and Grongnet, 2000), and the degree of DNA fragmentation correlates with the severity of cerebral hypoxia (Akhter et al., 2001). According to post-hypoxic reoxygenation insult, it could be visualized DNA fragmentation in newborn piglets only 6 h after hypoxia (Mishra et al., 2006). In a recent study, it was proposed a biphasic pattern of DNA fragmentation during reoxygenation by an initial oxidative DNA injury followed by an enzymatic cleavage of DNA by endonucleases activation (Parker et al., 2007). In our study, immediately after HS, it was possible to detect repairable DNA damage until 72 h post-HS. Interestingly, studies using *in situ* end-labeling revealed no apoptotic hippocampal cells at any point within 1 week after HS on PND 10 (Koh et al., 2004; Sanchez and Jensen, 2001).

Oxidative DNA damage induced by systemic KA in rats has been demonstrated by using the ratio of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) and 2-deoxyguanosine (Lan et al., 2000; Liang et al., 2000). In maturing rats, KA-induced seizures did not result in increased mitochondrial aconitase inactivation, an index of steady-state mitochondrial O_2^- formation, and 8-OHdG levels, but increased in older. The inability of KA seizures to increase hippocampal 8-OHdG levels in rat pups suggests an age dependency of seizure-induced

oxidative stress (Patel and Li, 2003). Respiratory hypoxia also leads the formation of the same kind of oxidative DNA lesion in adult rat brain (Lee et al., 2002). In our study, we demonstrated that HS in immature rats could promote increase of Endo III- and Fpg-sensitive sites, indicating oxidized pyrimidines and purines respectively.

Seizure-induced lipid peroxidation has been observed in adult rat brain by measuring products such as TBARS products (Bruce and Baudry, 1995) and F₂-isoprostanes (Patel et al., 2001). Changes in hippocampal lipid composition early and late after SE has been reported in adult rats (Dal-Pizzol et al., 2000; Kim et al., 2000). Recently, KA-induced seizures in developed brain provide an increase in isofurans formation that coincides with mitochondrial oxidative stress (Patel et al., 2008). While in the immature brain there was no lipid peroxidation by KA-induced SE (Bruce and Baudry, 1995; Shin et al., 2008), sustained hypoxia could induce augment of TBARS levels in the brain of neonatal rats (Lee et al., 2008). In the present work, we show that HS promote increase of hippocampal TBARS products after HS insult parallelly with the same time frame observed in oxidative DNA damage formation.

Presently, we found a correlation of oxidative DNA damage and lipid peroxidation in a time-response manner of HS-induced reduced GSH depletion in immature rat hippocampus. This is in agreement with works reporting impairment of the glutathione system by hypoxia and seizure apart in adult brain. For a wide variety of hypoxic conditions, it could alter glutathione redox system in newborn rat brain (Kretzschmar et al., 1990; Reuter and Klinger, 1992; Wallin et al., 2000). Some studies have shown GSH depletion in rat hippocampus following pilocarpine- and KA-induced SE (Dal-Pizzol et al., 2000; Freitas et al., 2005; Kim et al., 2000; Liang and Patel, 2006; Ong et al., 2000). A decrease in hippocampal GSH levels was also demonstrated in genetically epileptic mice (Shin et al., 2008; Takaki et al., 2007) and also appears to be present in chronic human epilepsy (Mueller et al., 2001).

These evidences leave an open question, wondering which circumstance, global hypoxia following reoxygenation or neonatal seizures, is more damaging to immature brain. Developing neurons are less vulnerable, in terms of neuronal damage and cell loss, than adult neurons to a wide variety of pathological insults (Holmes et al., 2002). Although the threshold for seizure generation is lower in immature than developed brains, the degree of SE-induced morphological damage and oxidative stress is highly age-dependent (Ben-Ari and Holmes, 2006; Bruce and Baudry, 1995; Haut et al., 2004; Patel and Li, 2003; Shin et al., 2008). Moreover, it has been demonstrated that KA seizures do not increase the formation of reactive species or mitochondrial dysfunction in neonatal brain (Sullivan et al., 2003). According to

hypoxia, it is possible to verify opposing role in hypoxic-ischemic insult, since adult mouse brain accumulates less H₂O₂ than developing brain (Lafemina et al., 2006). Besides, high free radicals generation and protein oxidation products have been detected in the plasma of preterm hypoxic newborns at birth and on the seventh day of life (Buonocore et al., 2000). Ours experiments have demonstrated oxidative damage in DNA and membrane lipids, following insufficient glutathione-mediated antioxidant system, in developing hippocampus from HS rat. However, we may suggest that oxidative stress in immature hippocampus verified here was most likely contributed by global hypoxia and reoxygenation than neonatal seizures.

If GSH decrease is involved in the pro-oxidant effect of neonatal HS on immature rat hippocampus, stimulation of antioxidative mechanisms may reduce or even abolish this consequence. Besides peptide NAP could penetrate in membranes and facilitate microtubule assembly by tubulin binding in neuronal cells (Divinski et al., 2006), studies indicate potential activity against oxidative stress. Initially, it was demonstrated that NAP protects H₂O₂-treated cells at femtomolar concentrations (Steingart et al., 2000). Similarly, NAP had protected against dopamine and 6-OHDA toxicity in the same concentrations. Moreover, NAP showed significant protection against depletion of cellular GSH by buthionine sulfoximine addition (Offen et al., 2000). In a mouse model of fetal alcohol syndrome, fetal death and growth abnormalities were ablated by NAP treatment, as well as prevented the alcohol-induced changes in GSH/GSSG levels (Spong et al., 2001). Recombinant ADNP, that includes the active site NAP, was shown to protect against H₂O₂ and β amyloid toxicity, reducing p53 protein levels that are associated with oxidative stress (Steingart and Gozes, 2006). Recently, it has been reported neuroprotection of NAP at very low concentrations in H₂O₂-treated human cortical neurons and Down's syndrome cortical neurons (Busciglio et al., 2007). These studies indicate an involvement of glutathione system as part of the NAP-associated neuroprotection mechanism in several models of oxidative stress. These properties of NAP have been the *rationale* to test the neuroprotective effects of NAP in the HS model.

Since it has been often reported a narrow therapeutic window for effective clinical treatment of HS (Jensen, 1995; Koh and Jensen, 2001; Sanchez and Jensen, 2001), we then administered an injection of NAP solution immediately after HS insult. The NAP delivery via intraperitoneal was considered appropriate based on brain bioavailability evidence (Spong et al., 2001). Here we demonstrate dose-dependent effect of NAP upon reestablishment of HS-induced GSH depletion in neonatal rat hippocampus. Following this finding, we also demonstrated that NAP provided the same dose-response beneficial impact on hippocampal

DNA damage breaks, oxidative adducts and lipid peroxidation. Recently, it was reported NAP neuroprotection in β amyloid-treated neurons by polyADP-ribosylation of histone H1 and chromatin relaxation. Poly(ADPribose) polymerase-1 activation by NAP could renders DNA accessible to repair and transcription factors, thereby enabling a fast gene expression and facilitate DNA repair (Visochek et al., 2005). Perhaps, this additional mechanism of action may have influenced hippocampal DNA integrity recovery concomitantly with enhanced glutathione system. Until now, no work has reported the effects of NAP treatment on seizure-related models. Regarding to hypoxia, NAP treatment ameliorated cognitive and motor abilities of newborn apolipoprotein e-deficient mice subjected to hypoxia (Rotstein et al., 2006), and could prevent neuronal cell death, apoptosis, and cerebral nitrite levels in a newborn rat model of hypoxic-ischemic brain injury (Kumral et al., 2006).

To our knowledge, this is the first study demonstrating protective effects of peptide NAP on hippocampal oxidative stress in a rodent model of HS. While not highly efficacious phenobarbital and the benzodiazepines continue to be used to treat neonatal seizures (Sankar and Painter, 2005), the lack of exacerbation of seizures, specially associated to hypoxic insult, renders immature brain to a critical condition. We have demonstrated here that HS turns immature hippocampus vulnerable to oxidative stress. The results and observations presented here raise the possibility that NAP may improve the therapeutical approach of neonatal seizures, maintaining the integrity of brain structure at molecular level by stimulating glutathione biosynthesis, while the EEG discharges may not be completely suppressed. For becoming a straightforward strategy for neonatal HS, additional studies must be undertaken to verify if NAP has the ability to control seizure activity and prevent long-term behavioral deficit, without interfering in the appropriate neurodevelopment.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) and GENOTOX-Genotoxicity Laboratory-Royal Institute. S. Greggio held a CNPq Master grant.

References

- Akerboom, T. P., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373-82.
- Akhter, W., et al., 2001. Effect of graded hypoxia on cerebral cortical genomic DNA fragmentation in newborn piglets. *Biol Neonate.* 79, 187-93.
- Bartha, A. I., et al., 2007. Neonatal seizures: multicenter variability in current treatment practices. *Pediatr Neurol.* 37, 85-90.
- Bartsch, H., Nair, J., 2005. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. *Mutat Res.* 591, 34-44.
- Bassan, M., et al., 1999. Complete sequence of a novel protein containing a femtomolar-activity-dependent neuroprotective peptide. *J Neurochem.* 72, 1283-93.
- Ben-Ari, Y., Holmes, G. L., 2006. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol.* 5, 1055-63.
- Bruce, A. J., Baudry, M., 1995. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. *Free Radic Biol Med.* 18, 993-1002.
- Buonocore, G., et al., 2000. Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Pediatr Res.* 47, 221-4.
- Burlinson, B., et al., 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res.* 627, 31-5.
- Busciglio, J., et al., 2007. NAP and ADNF-9 protect normal and Down's syndrome cortical neurons from oxidative damage and apoptosis. *Curr Pharm Des.* 13, 1091-8.
- Chen, Y., et al., 2003. Correlation between near-infrared spectroscopy and magnetic resonance imaging of rat brain oxygenation modulation. *Phys Med Biol.* 48, 417-27.
- Chien, J. C., et al., 2007. Cerebral oxygenation during hypoxia and resuscitation by using near-infrared spectroscopy in newborn piglets. *J Chin Med Assoc.* 70, 47-55.
- Connell, J., et al., 1989. Clinical and EEG response to anticonvulsants in neonatal seizures. *Arch Dis Child.* 64, 459-64.

Curristin, S. M., et al., 2002. Disrupted synaptic development in the hypoxic newborn brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 15729-34.

Dal-Pizzol, F., et al., 2000. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 291, 179-82.

David, J. C., Grongnet, J. F., 2000. Effect of hypoxia on DNA fragmentation in different brain regions of the newborn piglet. *Mol Reprod Dev.* 57, 153-8.

Divinski, I., et al., 2006. Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin. *J Neurochem.* 98, 973-84.

Dizdaroglu, M., 2005. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res.* 591, 45-59.

Englander, E. W., et al., 1999. Hypoxia-induced mitochondrial and nuclear DNA damage in the rat brain. *J Neurosci Res.* 58, 262-9.

Franceschini, M. A., et al., 2007. Assessment of infant brain development with frequency-domain near-infrared spectroscopy. *Pediatr Res.* 61, 546-51.

Freitas, R. M., et al., 2005. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. *Febs J.* 272, 1307-12.

Fujikawa, D. G., et al., 2000. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia.* 41 Suppl 6, S9-13.

Gozes, I., et al., 2005. NAP: research and development of a peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP). *CNS Drug Rev.* 11, 353-68.

Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 97, 1634-58.

Haut, S. R., et al., 2004. Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. *Lancet Neurol.* 3, 608-17.

Holmes, G. L., et al., 2002. New concepts in neonatal seizures. *Neuroreport.* 13, A3-8.

Jensen, F. E., 1995. An animal model of hypoxia-induced perinatal seizures. *Ital J Neurol Sci.* 16, 59-68.

Kim, H. C., et al., 2000. Phenidone prevents kainate-induced neurotoxicity via antioxidant mechanisms. *Brain Res.* 874, 15-23.

Koh, S., Jensen, F. E., 2001. Topiramate blocks perinatal hypoxia-induced seizures in rat pups. *Ann Neurol.* 50, 366-72.

Koh, S., et al., 2004. NBQX or topiramate treatment after perinatal hypoxia-induced seizures prevents later increases in seizure-induced neuronal injury. *Epilepsia.* 45, 569-75.

Kretschmar, M., et al., 1990. Glutathione levels in liver and brain of newborn rats: investigations of the influence of hypoxia and reoxidation on lipid peroxidation. *Physiol Bohemoslov.* 39, 257-60.

Kumral, A., et al., 2006. Neuroprotective effect of the peptides ADNF-9 and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res.* 1115, 169-78.

Lafemina, M. J., et al., 2006. Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. *Pediatr Res.* 59, 680-3.

Lan, J., et al., 2000. Formation of the base modification 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine and DNA fragmentation following seizures induced by systemic kainic acid in the rat. *J Neurochem.* 74, 302-9.

Lee, H. M., et al., 2008. Sustained hypoxia modulates mitochondrial DNA content in the neonatal rat brain. *Free Radic Biol Med.* 44, 807-14.

Lee, H. M., et al., 2002. Hypoxia induces mitochondrial DNA damage and stimulates expression of a DNA repair enzyme, the Escherichia coli MutY DNA glycosylase homolog (MYH), in vivo, in the rat brain. *J Neurochem.* 80, 928-37.

Liang, L. P., et al., 2000. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience.* 101, 563-70.

Liang, L. P., Patel, M., 2006. Seizure-induced changes in mitochondrial redox status. *Free Radic Biol Med.* 40, 316-22.

Lowry, O. H., et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.

Mikati, M. A., et al., 2003. Hippocampal programmed cell death after status epilepticus: evidence for NMDA-receptor and ceramide-mediated mechanisms. *Epilepsia.* 44, 282-91.

Mishra, O. P., et al., 2000. Hypoxia-induced generation of nitric oxide free radicals in cerebral cortex of newborn guinea pigs. *Neurochem Res.* 25, 1559-65.

Mishra, O. P., et al., 2006. Effect of nitric oxide synthase inhibition during post-hypoxic reoxygenation on Bax and Bcl-2 protein expression and DNA fragmentation in neuronal nuclei of newborn piglets. *Brain Res.* 1101, 20-8.

Mueller, S. G., et al., 2001. Brain glutathione levels in patients with epilepsy measured by in vivo (1)H-MRS. *Neurology.* 57, 1422-7.

Nadin, S. B., et al., 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem.* 49, 1183-6.

Offen, D., et al., 2000. Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. *Brain Res.* 854, 257-62.

Ong, W. Y., et al., 2000. Changes in glutathione in the hippocampus of rats injected with kainate: depletion in neurons and upregulation in glia. *Exp Brain Res.* 132, 510-6.

Otteneder, M. B., et al., 2006. In vivo oxidative metabolism of a major peroxidation-derived DNA adduct, M1dG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 6665-9.

Parker, J., et al., 2007. Effect of post-hypoxic reoxygenation on DNA fragmentation in cortical neuronal nuclei of newborn piglets. *Neurosci Lett.* 412, 273-7.

Patel, M., Li, Q. Y., 2003. Age dependence of seizure-induced oxidative stress. *Neuroscience.* 118, 431-7.

Patel, M., et al., 2008. Seizure-induced formation of isofurans: novel products of lipid peroxidation whose formation is positively modulated by oxygen tension. *J Neurochem.* 104, 264-70.

Patel, M., et al., 2001. Enhanced hippocampal F2-isoprostane formation following kainate-induced seizures. *J Neurochem.* 79, 1065-9.

Reuter, A., Klinger, W., 1992. The influence of systemic hypoxia and reoxygenation on the glutathione redox system of brain, liver, lung and plasma in newborn rats. *Exp Toxicol Pathol.* 44, 339-43.

Rotstein, M., et al., 2006. NAP enhances neurodevelopment of newborn apolipoprotein E-deficient mice subjected to hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther.* 319, 332-9.

Salgo, M. G., Pryor, W. A., 1996. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys.* 333, 482-8.

Sanchez, R. M., Jensen, F. E., 2001. Maturation aspects of epilepsy mechanisms and consequences for the immature brain. *Epilepsia.* 42, 577-85.

Sankar, R., Painter, M. J., 2005. Neonatal seizures: after all these years we still love what doesn't work. *Neurology.* 64, 776-7.

Santos, N. F., et al., 2000. Multiple pilocarpine-induced status epilepticus in developing rats: a long-term behavioral and electrophysiological study. *Epilepsia.* 41 Suppl 6, S57-63.

Shin, E. J., et al., 2008. Role of glutathione peroxidase in the ontogeny of hippocampal oxidative stress and kainate seizure sensitivity in the genetically epilepsy-prone rats. *Neurochem Int.* 52, 1134-47.

Singh, N. P., et al., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175, 184-91.

Spong, C. Y., et al., 2001. Prevention of fetal demise and growth restriction in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *J Pharmacol Exp Ther.* 297, 774-9.

Steingart, R. A., Gozes, I., 2006. Recombinant activity-dependent neuroprotective protein protects cells against oxidative stress. *Mol Cell Endocrinol.* 252, 148-53.

Steingart, R. A., et al., 2000. VIP and peptides related to activity-dependent neurotrophic factor protect PC12 cells against oxidative stress. *J Mol Neurosci.* 15, 137-45.

Sullivan, P. G., et al., 2003. Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death. *Ann Neurol.* 53, 711-7.

Takaki, M., et al., 2007. Age-dependent changes in the hippocampal antioxidant ability of EL mice. *Neurosci Res.* 58, 336-8.

Visochek, L., et al., 2005. PolyADP-ribosylation is involved in neurotrophic activity. *J Neurosci.* 25, 7420-8.

Volpe, J. J., 2001. *Neurology of the newborn.* Saunders, Philadelphia.

von Siebenthal, K., et al., 1992. Near-infrared spectroscopy in newborn infants. *Brain Dev.* 14, 135-43.

Wallin, C., et al., 2000. Alterations in glutathione and amino acid concentrations after hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 125, 51-60.

Weiss, S., et al., 1996. Anatomical studies of DNA fragmentation in rat brain after systemic kainate administration. *Neuroscience.* 74, 541-51.

Figure legends

Fig. 1. Electroencephalographic recordings from immature rats at normoxic and hypoxic conditions. EEG data were acquired with transmitters coupled on the NIRS sensors configured to record 2-channel scalp EEG (ch1, channel 1; ch2, channel 2). At normoxic condition (21% O₂), it was possible to verify EEG waves at physiological pattern (panel A). However, when rats on PND 10 were subjected to global hypoxia (12-min period of 5-7% O₂), burst-suppression pattern were detected (panel B).

Fig. 2. Physiological changes induced by global hypoxia in immature rats. Rats on PND 10 were subjected to global hypoxia (12-min period of 5-7% O₂), and EEG activity, StO₂ and HRT were simultaneously measured during HS induction protocol. In the beginning at 21% O₂, StO₂ and HRT data were at basal levels with normal EEG activity. As the intra-chamber O₂ concentration decreased, StO₂ and HRT started to diminish associated with epileptiform discharges (high frequency spikes). When the O₂ concentration returned to normoxic condition in the end of HS model protocol, all the physiological parameters become normalized. EEG, electroencephalographic recording; StO₂, cerebral tissue oxygen saturation (%); HRT, heart rate (beats/min).

Fig. 3. Temporal profile of DNA damage in immature rat hippocampus after HS. DNA damage was assessed with alkaline comet assay of hippocampal tissue obtained from rat pups exposed to HS and normoxic animals at different time points. Values represent the mean \pm S.D.; $n = 4$ rats/group. **** $p < 0.001$ vs. normoxic rats in Bonferroni post hoc test after two-way ANOVA.

Fig. 4. Temporal profile of oxidative DNA damage in immature rat hippocampus after HS. Oxidative DNA damage was assessed with alkaline comet assay with Endo III and Fpg (panels A and B, respectively) enzymes of hippocampal tissue obtained from rat pups exposed to HS and normoxic animals at different time points. Open circles represent normoxic rats, while filled circles represent the rat pups subjected to HS model. Values represent the mean \pm S.D.; $n = 4$ rats/group. ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.001$ vs. normoxic rats in Bonferroni post hoc test after two-way ANOVA.

Fig. 5. Temporal profile of TBARS products in immature rat hippocampus after HS. Lipid peroxidation was assessed by the reaction of thiobarbituric acid with MDA during an acid-heating reaction of hippocampal tissue obtained from rat pups exposed to HS and normoxic animals at different time points. The results are expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein) and the values represent the mean \pm S.D.; $n = 4$ rats/group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. normoxic rats in Bonferroni post hoc test after two-way ANOVA.

Fig. 6. Temporal profile of reduced GSH content in immature rat hippocampus after HS. Intracellular total glutathione was determined by photometric determination of hippocampal tissue obtained from rat pups exposed to HS and normoxic animals at different time points. The results are expressed as GSH content (nmol/mg protein) and the values represent the mean \pm S.D.; $n = 4$ rats/group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. normoxic rats in Bonferroni post hoc test after two-way ANOVA.

Fig. 7. The dose-dependent effect of systemic NAP treatment on DNA damage in immature rat hippocampus at different time points after HS. The rat pups received an intraperitoneal injection of NAP solution at a dose of 0.03, 0.3 or 3 $\mu\text{g/g}$ just after HS model (groups NAP 0.03, NAP 0.3, NAP 3; respectively). Some pups were exposed to HS but they receive vehicle instead of NAP (group HS). DNA damage was assessed with alkaline comet assay of hippocampal tissue at different time points after the insult. Values represent the mean \pm S.D.; $n = 4$ rats/group. *** $p < 0.001$ vs. HS vehicle-treated rats in Bonferroni post hoc test after two-way ANOVA.

Fig. 8. The dose-dependent effect of systemic NAP treatment on Endo III-sensitive sites in rat hippocampus at different time points after HS. The rat pups with HS exposure received an intraperitoneal injection of NAP solution at a dose of 0.03, 0.3 or 3 $\mu\text{g/g}$ just after HS model (groups NAP 0.03, NAP 0.3, NAP 3; respectively). Some pups exposed to HS received vehicle instead of NAP (group HS). The time points analyzed (3, 6 and 24 h corresponds to panels A, B and C, respectively) were chosen based on previous evidence of oxidative adducts formation. Values represent the mean \pm S.D.; $n = 4$ rats/group. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. HS vehicle-treated rats in Dunnett's multiple comparison post hoc test after one-way ANOVA.

Fig. 9. The dose-dependent effect of systemic NAP treatment on Fpg-sensitive sites in rat hippocampus at different time points after HS. The rat pups with HS exposure received an intraperitoneal injection of NAP solution at a dose of 0.03, 0.3 or 3 µg/g just after HS model (groups NAP 0.03, NAP 0.3, NAP 3; respectively). Some pups exposed to HS received vehicle instead of NAP (group HS). The time points analyzed (3, 6 and 24 h corresponds to panels A, B and C, respectively) were chosen based on previous evidence of oxidative adducts formation. Values represent the mean ± S.D.; $n = 4$ rats/group. *** $p < 0.001$ vs. HS vehicle-treated rats in Dunnett's multiple comparison post hoc test after one-way ANOVA.

Fig. 10. The dose-dependent effect of systemic NAP treatment on TBARS levels in rat hippocampus at different time points after HS. The rat pups with HS exposure received an intraperitoneal injection of NAP solution at a dose of 0.03, 0.3 or 3 µg/g just after HS model (groups NAP 0.03, NAP 0.3, NAP 3; respectively). Some pups were exposed to HS but they receive vehicle instead of NAP (group HS). The time points analyzed (3, 6 and 24 h corresponds to panels A, B and C, respectively) were chosen based on previous evidence of TBARS production. The results are expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein) and the values represent the mean ± S.D.; $n = 4$ rats/group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. HS vehicle-treated rats in Dunnett's multiple comparison post hoc test after one-way ANOVA.

Fig. 11. The dose-dependent effect of systemic NAP treatment on reduced GSH content in rat hippocampus at different time points after HS. The rat pups with HS exposure received an intraperitoneal injection of NAP solution at a dose of 0.03, 0.3 or 3 µg/g just after HS model (groups NAP 0.03, NAP 0.3, NAP 3; respectively). Some pups were exposed to HS but they receive vehicle instead of NAP (group HS). The time points analyzed (3, 6 and 24 h corresponds to panels A, B and C, respectively) were chosen based on previous evidence of GSH depletion. The results are expressed as GSH content (nmol/mg protein) and the values represent the mean ± S.D.; $n = 4$ rats/group. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. HS vehicle-treated rats in Dunnett's multiple comparison post hoc test after one-way ANOVA.

Table**Table 1**

Induction of physiological changes by HS modeling

Physiologic parameter	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4
StO ₂ (%)	73.93 ± 11.75	67.82 ± 11.08	49.34 ± 15.21 ^{***}	80.69 ± 12.13
HRT (beats/min)	179.90 ± 41.16	186.83 ± 43.68	85.54 ± 25.03 ^{***}	153.76 ± 42.56

StO₂, cerebral tissue oxygen saturation. HRT, heart rate. Data significant in relation to phases 1, 2 and 4 at ^{***} $p < 0.001$ as tested by repeated ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post hoc test.

Figures

Figure 1

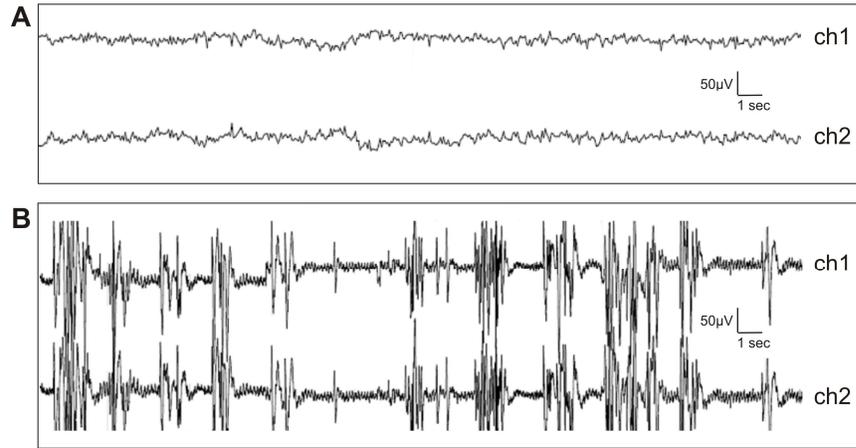


Figure 2

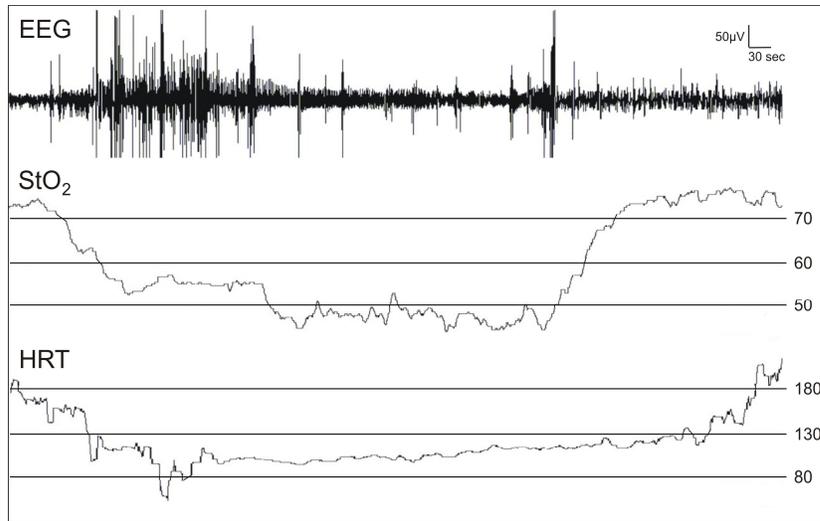


Figure 3

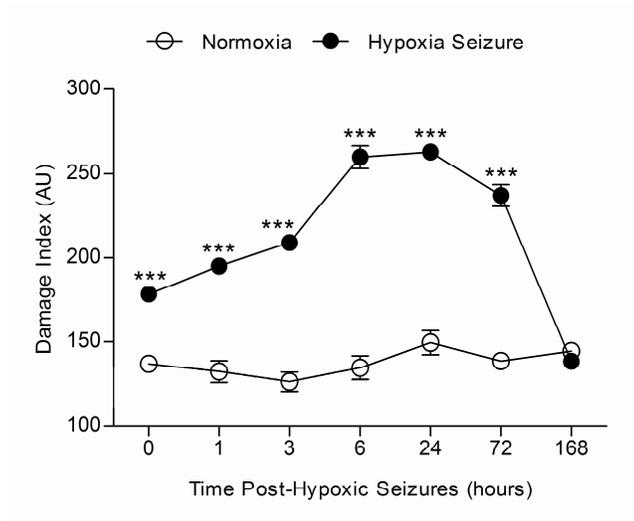


Figure 4

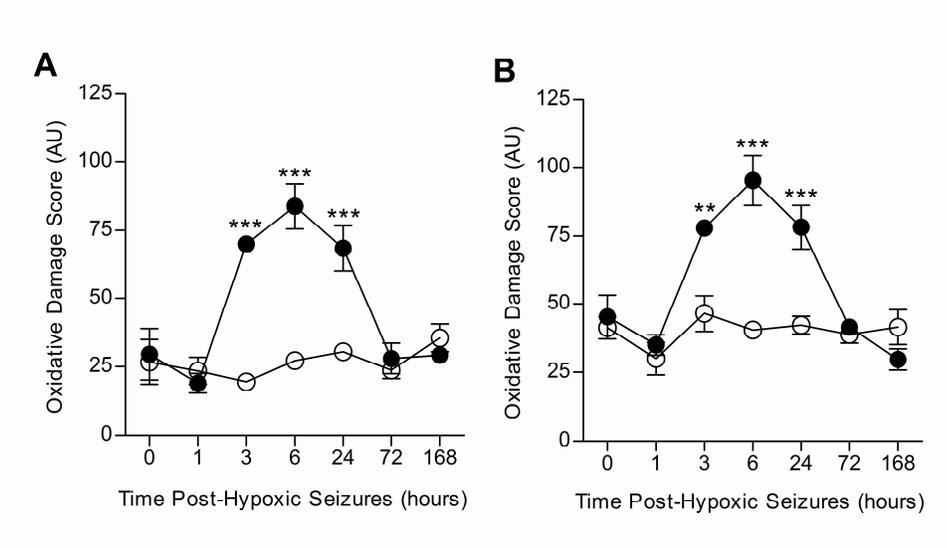


Figure 5

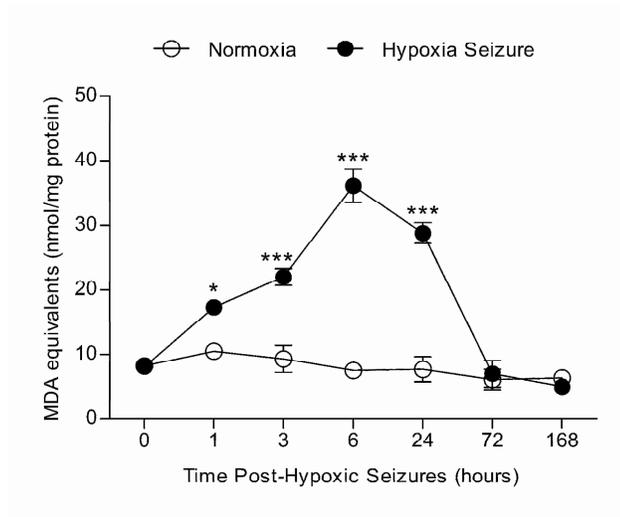


Figure 6

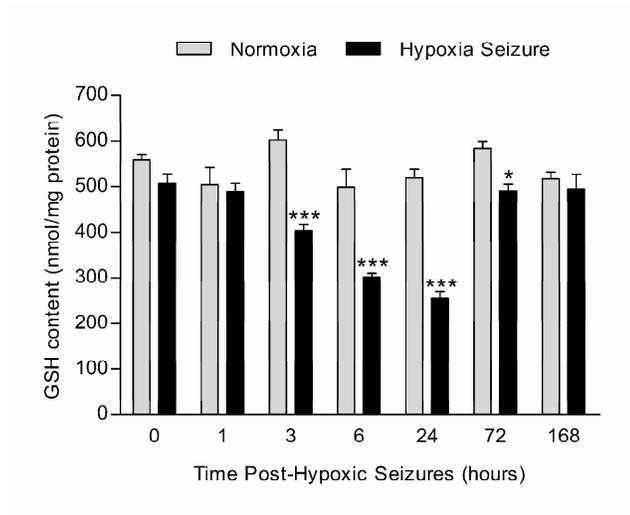


Figure 7

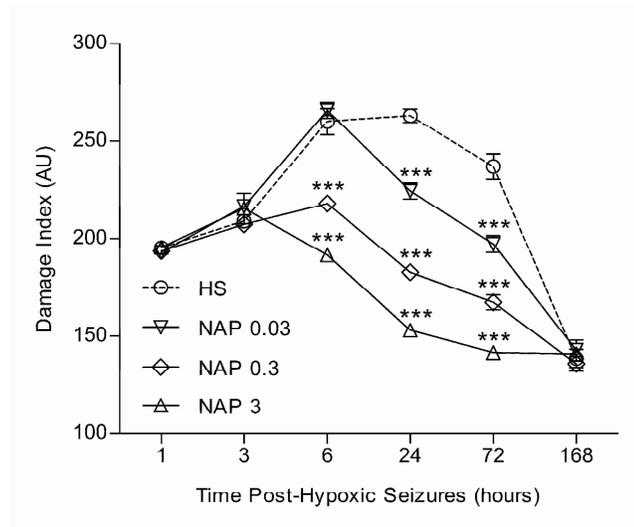


Figure 8

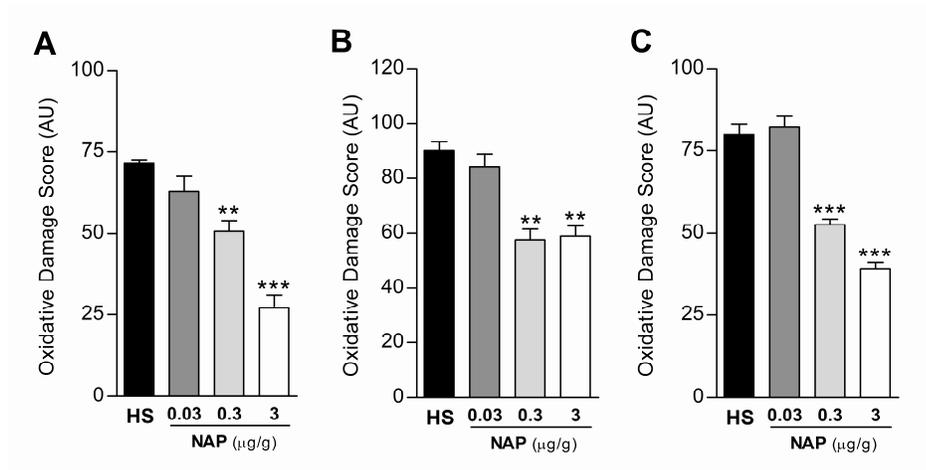


Figure 9

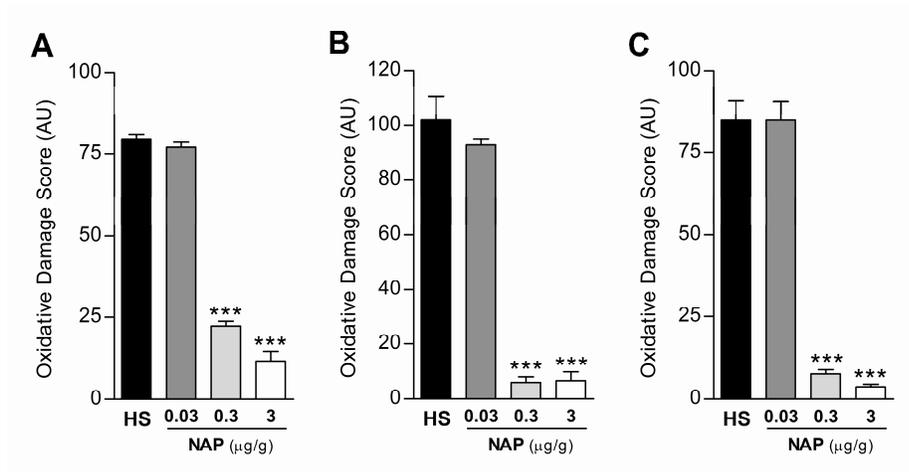


Figure 10

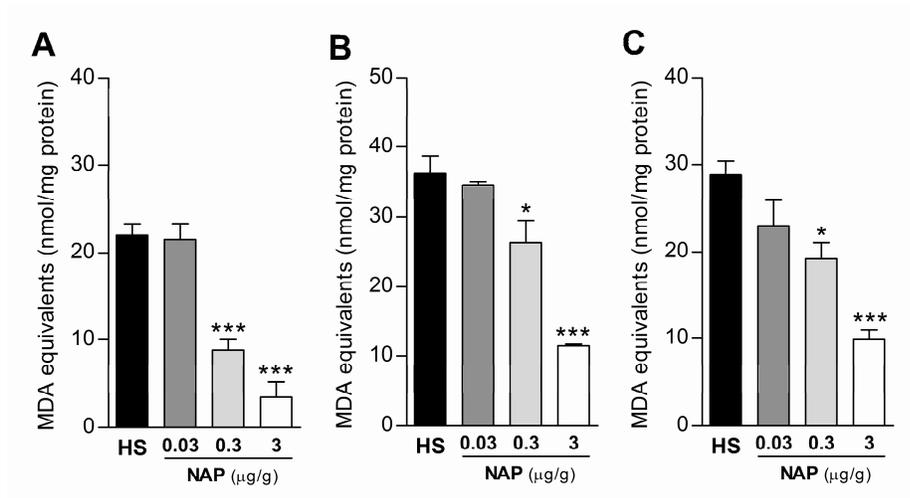
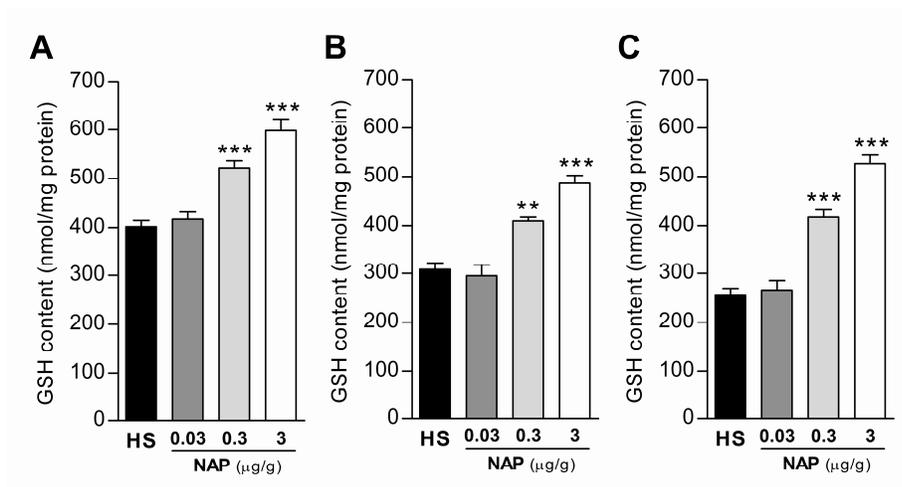


Figure 11



CAPÍTULO IV

7 CONCLUSÕES DETALHADAS

- 1) As CH induzem dano ao DNA hipocampal de ratos neonatos imediatamente após o insulto (0 h) e em até 72 h, com máximo ID entre 6 e 24 h;
- 2) Embora o dano ao DNA hipocampal de ratos neonatos esteja presente entre 0 e 72 h após aplicação do modelo de CH, a oxidação de purinas e pirimidinas somente é significativa em 3, 6 e 24 h, ocorrendo máximo de dano em 6 h;
- 3) Seguindo a evidência de dano ao DNA hipocampal, também se constatou peroxidação lipídica no hipocampo de ratos neonatos entre 1 e 24 h após aplicação do modelo de CH, havendo máxima produção de equivalentes de MDA em 6 h;
- 4) A fim de compreender a influência das CH sobre o sistema glutaciona e o seu favorecimento à ocorrência de dano oxidativo ao DNA e peroxidação lipídica hipocampal, observou-se depleção de GSH a partir de 3 h após o insulto até 72 h, havendo maior queda da concentração de GSH em 24 h;
- 5) Estabelecido o perfil temporal de estresse oxidativo no referente modelo animal, verificou-se que o neuropeptídeo NAP possui efeito dose-resposta na redução de dano ao DNA hipocampal de ratos neonatos em 6, 24 e 72 h após administração intraperitoneal;
- 6) Baseado na ação neuroprotetora do composto sobre a integridade do DNA hipocampal, verificou-se também que o neuropeptídeo NAP possui efeito dose-resposta na prevenção de purinas e pirimidinas oxidadas no hipocampo de ratos neonatos em 3, 6 e 24 h após administração intraperitoneal;
- 7) Supondo também haver ação neuroprotetora paralela em estruturas lipídicas, constatou-se que o neuropeptídeo NAP possui efeito dose-resposta na redução de equivalentes de MDA no hipocampo de ratos neonatos em 3, 6 e 24 h após administração intraperitoneal;
- 8) Por fim, na tentativa de elucidar um possível mecanismo de ação do neuropeptídeo NAP através da modulação do sistema glutaciona hipocampal, verificou-se um efeito dose-resposta no incremento do conteúdo de GSH no hipocampo de ratos neonatos em 3, 6 e 24 h após administração intraperitoneal.

ANEXO A – Aprovação do projeto pelo CEP-PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 1230/07-CEP

Porto Alegre, 23 de outubro de 2007.

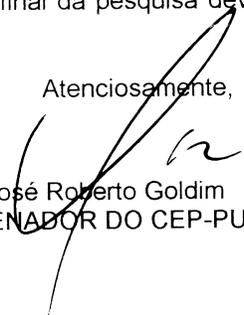
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 07/03852, intitulado: **“Efeitos da administração dos peptídeos NAP e ADNF-9 sobre o dano oxidativo hipocampal de animais submetidos ao modelo de hipóxia neonatal”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser entregues a este CEP

Atenciosamente,


Prof Dr José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Jaderson Costa da Costa
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO B – Normas de publicação da *Neurobiology of Disease*

Guide for Authors

Neurobiology of Disease is an international journal at the interface between basic and clinical neuroscience. The journal provides a forum for the publication of top-quality research papers on molecular and cellular definitions of disease mechanisms, the neural systems underpinning behavioral disorders of higher cortical function, the genetics of inherited neurological and psychiatric diseases, aging and the nervous system, and findings relevant to the development of new therapeutics. Timely reviews in these areas will be considered.

The Neuroscience Peer Review Consortium

Neurobiology of Disease is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers. It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results.

If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can now submit the manuscript to Neurobiology of Disease and indicate that the referees' reports from the first journal be made available to the Editors of Neurobiology of Disease.

N.B. Only manuscripts which were first submitted to another journal after the 1st January 2008 are eligible for the NPRC scheme.

It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to Neurobiology of Disease. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to Neurobiology of Disease without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, reformat the paper to Neurobiology of Disease's specification and submit the paper to Neurobiology of Disease with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that they are happy for referees' reports to be forwarded from the first Consortium journal. Authors will be asked upon submission to Neurobiology of Disease the title of the first journal submitted to and the manuscript ID that was given by that journal. The editorial office of Neurobiology of Disease will request the referees' reports from the first journal.

The Editors of Neurobiology of Disease will use forwarded referees' reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

Visit <http://nprc.incf.org> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Exceptions: It is the policy of Elsevier that authors need not obtain permission in the following cases only: (1) to use their original figures or tables in their future works; (2) to make copies of their papers for use in their classroom teaching; and (3) to include their papers as part of their dissertations.

Submission of Manuscripts It is a condition of publication that all manuscripts must be written in clear and grammatical English and be submitted to the Neurobiology of Disease Web site at <http://ees.elsevier.com/ynbdi>. Authors are requested to transmit the text and art of the manuscript in electronic form to this address. Minimal exceptions will be allowed. Complete instructions are available at the submission Web site. Authors who are unable to provide an electronic version should contact the editorial office prior to submission (e-mail: nbd@elsevier.com; telephone: (619) 699-6421; or fax: (619) 699-6855).

Language Editing: Prior to submission, authors for whom English is not their first language may find it helpful to use a language and copyediting service such as that available through <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or may contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions <http://www.elsevier.com/termsconditions>

When human subjects are used, manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject, with the approval of the appropriate local ethics committee, and in compliance with national legislation and the Code of Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>

When experimental animals are used, the materials and methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimise pain or discomfort, and that the experiments were conducted in accordance with international standards on animal welfare as well as being compliant with local and national regulations. Studies are expected to be compliant with minimal standards as defined by the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) http://europa.eu.int/comm/food/fs/aw/aw_legislation/scientific/86-609-ec_en.pdf and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/> Full details of any anaesthetic or analgesic dose and treatment must be given.

All manuscripts are expected to comply with contemporary standards of ethical practice in scientific publication, regarding such matters as study design and ethical approval, data probity and fabrication, authorship, declaration of conflict of interest, plagiarism and redundant publication.

Cover Letter. Each manuscript is to be accompanied by an electronic cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. Review papers need to be clearly identified as such in the cover letter. PDFs of all related manuscripts under consideration for publication must also be included with the submitted manuscript.

Authors should suggest at least four competent reviewers in their field and may also suggest individuals whom they wish to have excluded from the review process. The list of suggested reviewers should be compiled as a separate document.

There are no submission fees or page charges. Manuscripts are accepted for review with the understanding that no substantial portion of the study has been published or is under consideration for publication elsewhere and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out.

Copyright and Permissions. Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided after acceptance.

If material from other copyrighted works is included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com.

Preparation of Manuscript. Most recommendations of the Council of Biology Editors should be followed; consult the CBE Style Manual, 6th ed. (Council of Biology Editors, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814). It is important to differentiate between genes and proteins. All gene names and loci should be typed italic; proteins should be typed roman. Nonstandard abbreviations should be defined at their initial appearance.

Manuscripts should be double-spaced throughout. Pages should be numbered consecutively and organized as follows:

The **Title Page** (p. 1) should contain the article type (review, regular article), article title, authors' names and complete affiliations, footnotes to the title, and the address for manuscript correspondence (including e-mail address and telephone and fax numbers). The title of the paper should be brief; no longer than 100 characters in length, and should capture and communicate the key message of your research to a broader audience. To aid this, abbreviations, unless familiar to a broad audience, should be avoided.

The **Abstract** (p. 2) must be a single paragraph that summarizes the main findings of the paper in less than 150 words. After the abstract a list of up to 10 keywords that will be useful for indexing and searching should be included.

The **Introduction** should be as concise as possible (not to exceed 500 words), without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings. The discussion aspect should not exceed 1500 words.

Acknowledgments should be brief and should precede the references.

References should be cited in the text by name and date. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. Unpublished results or personal communications should be cited as such in the text. Please note the following examples:

Mattson, M.P., 2001. Inflammation, free radicals, glycation, metabolism and apoptosis, and heavy metals. In: Hof, P.R., Mobbs, C.V. (Eds.), *Functional Neurobiology of Aging*. Academic Press, San Diego, pp. 349-371.

Sharma, A., Valadi, N., Miller, A.H., Pearce, B.D., 2002. Neonatal viral infection decreases neuronal progenitors and impairs adult neurogenesis in the hippocampus. *Neurobiol. Dis.* 11, 246-256.

Stutzman, J., 1994. *Neurodegenerative Diseases*. Academic Press, San Diego.

GenBank/DNA Sequence Linking. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalized (see example below). This combination of letters and format will enable the typesetter to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required links to GenBank sequences.

Example: GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases, enabling readers to go directly to that source from the article.

Figures. Number figures consecutively with Arabic numerals. Please visit our Web site at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> for detailed instructions on preparing electronic artwork.

Color Figures. If together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in color in the printed version. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise in converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the color illustrations.

Authors should note that a request to revert from full colour to colour only in the electronic publication at the stage of typesetting and proof correction, will require separate editorial agreement, with possible re-review if necessary, and may significantly delay publication of your manuscript.

Color figures for exclusive use as cover illustrations may be submitted by authors who are also submitting a manuscript for consideration. These figures do not need to relate to the manuscript being submitted but should relate to the larger scope and focus of *Neurobiology of Disease*.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals in order of appearance in the text. Give each table a short descriptive title typed directly above and with essential footnotes below.

Preparation of Supplementary Material. Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer additional possibilities for publishing supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background

datasets, sound clips, and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>). To ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Please note, however, that supplementary material will not appear in the printed journal. Files can be stored on 3½-inch diskette, ZIP disk, or CD (either MS-DOS or Macintosh). For more detailed instructions, contact the Editorial Office (e-mail: nbd@elsevier.com; telephone: (619) 699-6421; or fax: (619) 699-6855).

PDF proofs will be e-mailed to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and proofs should be returned promptly. Authors will be charged for alterations that exceed 10% of the total cost of composition.

Distribution of Material.

Authors who publish a research article in Neurobiology of Disease must be prepared to freely distribute to academic researchers for their own use any cell lines, DNA clones, monoclonal antibodies, or genetically engineered mice described in the article. Nucleic acid and protein sequences, as well as crystallographic coordinates, must be deposited in the appropriate databases.

Offprints:

The corresponding author, at no cost, will be provided with a pdf offprint. Should they wish, they may opt to receive 25 paper offprints instead.

Author Enquiries.

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the Elsevier Author Gateway at <http://www.elsevier.com>. The Elsevier website also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions, and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Sponsored Articles:

Neurobiology of Disease offers authors or their institutions the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please click [here](#).

Disclaimer:

Whilst every effort is made by the publishers and editorial board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the publishers, the editorial board and editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any inaccurate or misleading data, opinion or statement.

Guide Author Site

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/622923/authorinstructions

ANEXO C – Ata da Defesa de Mestrado



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

1

2

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 085-P

3

4 Ao segundo dia do mês de março do ano de dois mil e nove, no Programa de Pós-graduação em
5 Medicina/Pediatria e Saúde da Criança (Mestrado) da Pontifícia Universidade Católica do Rio
6 Grande do Sul o mestrando **Samuel Greggio** apresentou a dissertação de mestrado intitulada
7 **“Efeito neuroprotetor do peptídeo NAP sobre o dano oxidativo**
8 **hipocampal de ratos neonatos submetidos ao modelo de crise**
9 **convulsiva induzida por hipóxia”**, sob a orientação do Professor Doutor Jaderson
10 Costa da Costa, em sessão pública, na Sala de Aula dos Cursos de Pós-graduação em Medicina, 3º
11 andar do Hospital São Lucas da PUCRS. A Comissão Examinadora foi presidida pelo Professor
12 Doutor Jaderson Costa da Costa e constituída pelos Professores Doutores: Rafael Roesler, Magda
13 Lahorgue Nunes e Paulo Márcio Condessa Pitrez. A sessão foi aberta pelo Professor Doutor
14 Jaderson Costa da Costa, Professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e
15 Saúde da Criança, que saudou os presentes e, inicialmente, deu ao mestrando as orientações sobre
16 o processo de defesa de dissertação concedendo-lhe cinquenta minutos para expor o trabalho.
17 Após a exposição, ao mestrando foi argüida pelos componentes da Comissão Examinadora,
18 respondendo a cada examinador. Encerrada a argüição os examinadores consideraram a candidata
19 **APROVADO com voto de Louvor**. O presidente da banca comunicou a aprovação do mestrando,
20 encerrando a sessão pública de apresentação para constar, lavrou-se esta ata que será assinada
21 pelos integrantes da Comissão Examinadora, pelo professor orientador, pelo Coordenador do
22 Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, pelo mestrando e por
23 mim, Carla Carmo de Melo Rothmann, secretária que a redigi.
24 Porto Alegre, 02 de março de 2009.

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

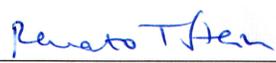
42

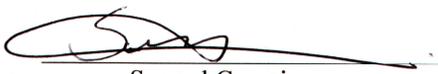

Prof. Dr. Rafael Roesler


Prof.ª Dr.ª Magda Lahorgue Nunes


Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez


Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa
Orientador


Prof. Dr. Renato Tetelbom Stein
Coordenador


Samuel Greggio
Mestrando


Sr.ª Carla Carmo de Melo Rothmann
Secretária

Campus Central

Av. Ipiranga, 6690 – P. 60 – 2º andar – IPB – Sala 03
CEP 90610-000 - Porto Alegre – RS - Brasil
Fone/Fax: (51) 3320.3000 ramal 2750
E-mail: pediatria-pg@pucrs.br
www.pucrs.br/medicina

APÊNDICE A – Artigo de revisão publicado na revista Scientia Medica

Crises convulsivas associadas à hipóxia neonatal e o potencial uso terapêutico do neuropeptídeo NAP

Hypoxia-associated neonatal seizures and potential therapeutic use of neuropeptide NAP

SAMUEL GREGGIO¹
JADERSON COSTA DA COSTA²

RESUMO

Objetivo: apresentar dados de revisão sobre os aspectos clínicos e fisiopatológicos das crises convulsivas neonatais associadas à hipóxia, as bases celulares e moleculares envolvidas neste processo e as evidências experimentais e clínicas da possível utilização terapêutica do neuropeptídeo NAP nesta condição.

Fonte de dados: para a captação dos artigos utilizou-se a base de dados PubMed, inserindo os termos NAP, neonatal seizures e perinatal hypoxia. O critério de seleção de artigos foi a especificidade em relação ao tema estudado, preferencialmente a partir do ano de 1990. Além disso, foram utilizados também artigos clássicos de anos anteriores que se aplicavam ao propósito desta revisão.

Síntese de dados: o risco de apresentar crises convulsivas está aumentado no período neonatal. Existem dificuldades no diagnóstico das crises, eficácia limitada do tratamento e potenciais efeitos adversos, dos anticonvulsivantes utilizados correntemente, no desenvolvimento cerebral dos recém-nascidos. Frente à urgência de novas estratégias para o tratamento das complicações resultantes de crises convulsivas neonatais associadas à hipóxia, o peptídeo NAP torna-se um forte candidato, considerando sua ação neuroprotetora em diversos modelos animais

ABSTRACT

Aims: To review clinical aspects, physiopathological data, cellular and molecular processes of hypoxia-associated neonatal seizures, and experimental and clinical evidences for the possible therapeutic use of neuropeptide NAP in this condition.

Source of data: A PubMed search was conducted to retrieve studies using the terms NAP, neonatal seizures and perinatal hypoxia. The criterion for article selection was the specificity to the subjects, mainly from 1990 to 2008. Besides, earlier classical studies were also used.

Summary of the findings: Risk for seizures is higher during the neonatal period. There are difficulties in seizure diagnosis, limited efficacy of treatment, and potential adverse effects, of currently used anticonvulsants, on the brain development of neonates. Given the necessity of new interventions for the neurological consequences of hypoxia-associated neonatal seizures, peptide NAP has become a promising candidate due to its neuroprotective action in a variety of animal models and clinical trials. With additional studies, peptide NAP could be employed as a new therapeutic agent for the prevention of cerebral hypoxia and neonatal seizures sequelae in pediatric patients.

Conclusions: Although there are positive evidences for the use of peptide NAP in animal models of neurological diseases and preliminary success in clinical trials has been reported, further studies must be taken to understand its

¹ Biomédico. Mestrando em Saúde da Criança, Faculdade de Medicina da PUCRS.

² Professor Titular de Neurologia da Faculdade de Medicina da PUCRS. Diretor do Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS.

e em ensaios clínicos. Com estudos adicionais, o peptídeo NAP poderá ser empregado como novo agente terapêutico para a prevenção da hipóxia cerebral e das seqüelas das crises convulsivas em recém-nascidos.

Conclusões: apesar dos indícios positivos da aplicação do peptídeo NAP em modelos animais de neuropatologias e de seu sucesso preliminar em ensaios clínicos, são necessárias pesquisas adicionais a fim de entender particularidades desse composto, tais como mecanismo de ação e viabilidade clínica para o tratamento das crises convulsivas neonatais.

DESCRITORES: SISTEMA NERVOSO/efeitos de drogas; CONVULSÕES; RECÉM-NASCIDO; HIPÓXIA FETAL; MODELOS ANIMAIS; NEUROPEPTÍDEOS/uso terapêutico; AGENTES NEUROPROTETORES.

peculiarities, such as mechanism of action and clinical viability for patients who suffered from hypoxia-associated neonatal seizures.

KEYWORDS: NERVOUS SYSTEM/drug effects; SEIZURES; INFANT, NEWBORN; FETAL HYPOXIA; MODELS, ANIMAL; NEUROPEPTIDES/therapeutic use; NEUROPROTECTIVE AGENTS.

ASPECTOS CLÍNICOS DAS CRISES CONVULSIVAS ASSOCIADAS À HIPÓXIA NEONATAL

É crescente a fundamentação clínica e experimental que avalia as bases celulares, moleculares e funcionais do desenvolvimento do cérebro da criança ou do animal em crescimento comparadas com as do cérebro do adulto. Sabe-se que o cérebro imaturo é particularmente suscetível a uma grande variedade de lesões. Algumas doenças neurológicas manifestam-se com diversos fenótipos ao longo de diferentes estágios da infância e, talvez, o fato mais intrigante seja a variedade de manifestações clínicas observada no período neonatal.¹

Uma enorme parcela das crises convulsivas em humanos acontece no primeiro ano de vida, com maior prevalência no período neonatal. Estas constituem um dos mais freqüentes eventos clínicos observados nos berçários e/ou unidades de tratamento intensivo neonatal, ocorrendo em 0,2% a 1,4% dos recém-nascidos, com maior predominância nos de baixo peso. Enquanto que a incidência de crises convulsivas neonatais varia de 1 a 4/1000 nascidos vivos, 14% dos recém-nascidos internados na unidade de tratamento intensivo neonatal do Hospital São Lucas da PUCRS apresentaram pelo menos um episódio clínico compatível com crise convulsiva. A mortalidade foi em torno de 15% e aproximadamente 1/3 dos casos evoluiu com seqüelas neurológicas.^{2,3}

Diversos são os fatores que distinguem as crises convulsivas neonatais daquelas caracte-

rísticas de crianças e adultos. A grande maioria delas é sintomática, 1/4 criptogênica e poucas ficam na categoria idiopática. Estas podem ser sutis, com discretas manifestações clínicas, e o padrão eletroencefalográfico comumente reflete um processo multifocal. A dificuldade diagnóstica é acentuada quando os neonatos apresentam movimentos ritmados e estereotipados sem correlação com alterações nos registros de eletroencefalograma (EEG). Isto pode caracterizar um evento não-convulsivo ou eventualmente convulsivo, ocorrendo em recém-nascidos com grandes lesões encefálicas. Assim, o diagnóstico das crises convulsivas neonatais dependerá da observação por um clínico experiente, da investigação por imagem e laboratorial e do EEG seriado.⁴

A relação entre crises neonatais e lesões hipocampais subseqüentes ainda não está totalmente esclarecida, tanto em ensaios clínicos como em estudos experimentais.⁵ Enquanto que estudos epidemiológicos prospectivos não encontraram uma ligação etiológica específica entre crises convulsivas na tenra idade, epilepsia crônica e danos cerebrais causados por esse processo, estudos retrospectivos demonstraram associação entre convulsões na infância, perda acentuada de neurônios hipocampais e gliose em pacientes com epilepsia refratária do lobo temporal.⁶⁻¹¹

O prognóstico dos recém-nascidos com crises convulsivas é muito variável. Em geral, metade dos casos evolui para óbito ou seqüelas graves – paralisia cerebral, epilepsia, déficits neurofuncionais a longo prazo sobre a memória, compor-

tamento e cognição – e a outra metade fica com seqüelas mínimas ou são normais. Basicamente, todas essas complicações são decorrentes de uma perturbação da conectividade neuronal e mudanças na composição de receptores e da estrutura dendrítica.²

Muitos dos processos epileptogênicos ocorrem somente durante uma janela de desenvolvimento crítica para o aprendizado, sinaptogênese e plasticidade neuronal. Os eventos transitórios, tais como febre, hipóxia e traumatismo cranioencefálico, em determinadas fases do desenvolvimento, podem gerar um insulto pró-convulsivante.¹²⁻¹⁴ Enquanto as convulsões geradas por hipóxia ocorrem mais freqüentemente nos neonatos, crises febris têm maior incidência em crianças entre 6 meses e 6 anos de idade, e as crises convulsivas conseqüentes a traumatismo cranioencefálico são mais freqüentes em crianças maiores.^{15, 16}

A hipóxia perinatal é um dos principais distúrbios associados às crises convulsivas neonatais.¹⁶ Acima de 70% das crianças que sofreram crises comprovadas por EEG – induzidas por hipóxia decorrente de complicações no parto – apresentam seqüelas, que podem variar de leves disfunções comportamentais até risco aumentado para o desenvolvimento de epilepsia, retardo mental e/ou paralisia cerebral na fase adulta.^{17, 18}

Processos hipóxicos graves podem resultar em crises freqüentes na primeira semana de vida, mesmo sob diversas intervenções farmacológicas. Geralmente, estas são recorrentes e prolongadas, requerendo politerapia associada à intensa sedação com barbitúricos e benzodiazepínicos. Um estudo randomizado concluiu que a administração combinada de fenobarbital e fenitoína controla em torno de 60% das crises convulsivas neonatais. No entanto, quando administradas separadamente, apesar de possuírem efeito anticonvulsivante semelhante, esses fármacos são eficazes em menos da metade dos neonatos.¹⁹ Portanto, as crises neonatais podem ser refratárias às drogas anticonvulsivantes disponíveis, determinando maior risco para seqüelas neurológicas.

Dados disponíveis indicam que o fenobarbital permanece sendo a terapia de primeira linha para o tratamento das crises neonatais, existindo poucas evidências na literatura médica que sustentem o emprego da maioria dos fármacos anticonvulsivantes nessa faixa etária.²⁰ Estudos experimentais demonstram, também, potenciais

efeitos adversos, no cérebro em desenvolvimento, de anticonvulsivantes usados atualmente, além de pobre eficácia sobre o controle das crises.²¹ A preocupação é com o risco-benefício do tratamento das crises convulsivas neonatais, assim, o desejável é que este seja o mais breve possível. Para que se possa definir a duração do tratamento, deve-se levar em consideração a etiologia das crises, o tipo de crise, e os resultados de EEG e de neuroimagem. Assim, a tendência atual é tratar por período menor os pacientes neurologicamente intactos, e por tempo maior aqueles com alterações neurológicas ou do desenvolvimento neuropsicomotor.³

As principais causas de hipóxia perinatal são complicações na gestação e no trabalho de parto, com sofrimento fetal, prematuridade e suas complicações.⁵ Infelizmente, não existe intervenção para recém-nascidos com encefalopatia hipóxica que possa prevenir os prejuízos cerebrais e as seqüelas neurológicas, mesmo quando não há lesão evidente de estruturas cerebrais.²² Além disto, a grande variabilidade de tentativas terapêuticas reflete a falta de padronização diagnóstica e de protocolos de tratamento, principalmente nos casos de refratariedade imediata à terapia com fenobarbital.²

BASES CELULARES E MOLECULARES DAS CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE POR HIPÓXIA NEONATAL

Embora o progresso recente seja sutil em relação aos tratamentos efetivos para crises convulsivas neonatais – sejam elas atribuídas a hipóxia perinatal ou a qualquer outro insulto – tem havido avanço considerável acerca do entendimento de sua fisiopatologia. Alguns estudos, em especial, contribuíram para a identificação de fatores que influenciam o mecanismo epileptogênico, a responsividade aos anticonvulsivantes e o impacto das crises neonatais e da hipóxia sobre a integridade do sistema nervoso central (SNC).²¹

A maior facilidade do cérebro imaturo em desenvolver crises convulsivas deve-se a um desequilíbrio entre os sistemas excitatório e inibitório. Além disso, existe maior densidade sináptica e de espinhos dendríticos do nascimento até os primeiros meses de vida. O entendimento da maior suscetibilidade dos recém-nascidos em desenvolver eventos ictais foi reforçado a partir da constatação de que a

expressão idade-dependente de determinadas subunidades de receptores glutamatérgicos ionotrópicos dos tipos N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) é acentuada entre o 7^o e 14^o dias de vida pós-natal, enquanto que de receptores de kainato tem pico de expressão mais tardio. Outro fator que contribui para a excitabilidade fisiológica do recém-nascido é a resposta despolarizante de receptores tipo ácido γ -aminobutírico (GABA) quando estimulados, ao passo que no cérebro de adultos ocorre resposta hiperpolarizante. Além disso, neurônios corticais neonatais contêm altas concentrações intracelulares de cloreto devido à pouca expressão do cotransportador KCC2 e à grande prevalência do cotransportador NKCC1. Assim, quando estimulados, ocorre um fluxo reverso de íons cloreto para o meio extracelular, contribuindo consequentemente para a despolarização neuronal. De forma semelhante à que ocorre em neonatos humanos, em muitos modelos de roedores o ponto máximo de suscetibilidade à crise ocorre na segunda semana pós-natal.²³

A hipóxia cerebral resulta em depleção de compostos altamente energéticos por mecanismos metabólicos dependentes de energia em neurônios e células gliais. Embora as consequências da hipóxia perinatal possam ser observadas clinicamente no período pós-natal, os processos patológicos agudos precedentes ao início do dano cerebral ainda não estão totalmente esclarecidos. Estudos sugerem que não é apenas uma simples reação, mas uma complexa sequência de eventos. No entanto, tais fenômenos não são exclusivos da fase aguda do processo hipóxico, mas também abrangem o processo de reoxigenação pós-hipóxia.²⁴

A hipóxia cerebral é comprovadamente capaz de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, como óxido nítrico, a partir da ativação de receptores NMDA. Com aumento do Ca^{2+} intracelular, são ativadas diversas vias enzimáticas para geração de radicais livres, tais como: fosfolipase A2, metabolismo do ácido aracônico pela ciclooxigenase e lipooxigenase, conversão da xantina desidrogenase a xantina oxidase através de proteases, e ativação de óxido nítrico sintetase (NOS). O aumento na produção desses compostos promove peroxidação lipídica de membranas, e diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, podendo induzir à necrose.²⁵

Adicionalmente, há ativação de receptores nucleares (IP_3 e Ca^{2+} -ATPase de alta afinidade)

que promovem aumento do influxo celular de cálcio, ocorrendo estimulação da CaM cinase IV e fosforilação da proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP-cíclico (CREB). Ao passo que o processo hipóxico não interfere na expressão gênica da proteína Bcl-2, há intensa estimulação da expressão de Bax, alterando a razão anti-apoptose/pró-apoptose que favorece a morte celular programada. Sendo assim, ocorre fragmentação do DNA nuclear, que pode ser resultante da ativação de endonucleases dependentes de Ca^{2+} , ativação das caspases 9 e 3 mediadas pela Bax, e/ou reações dependentes de radicais livres.²⁵

Levando em consideração todos os mecanismos celulares envolvidos na hipóxia, aceita-se que exista um papel central do óxido nítrico na lesão cerebral mediada por hipóxia. O que justifica esta hipótese é que, quando administrado um inibidor enzimático específico, como N-nitro-L-arginina (NNLA; inibidor da NOS), ocorre prevenção de diversos mecanismos próprios da hipóxia cerebral, como geração de radicais livres, nitração das subunidades de receptores NMDA, ativação da CaM quinase IV, aumento da fosforilação da CREB no sítio Ser133, expressão aumentada da proteína apoptótica Bax e fragmentação do DNA nuclear.²⁶

AMPLIANDO OS ESTUDOS EXPERIMENTAIS: UTILIZAÇÃO DE UM MODELO DE CRISES CONVULSIVAS NEONATAIS INDUZIDAS POR HIPÓXIA

Frente às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das crises convulsivas neonatais, a complexidade dos estudos em humanos torna a pesquisa, neste enfoque, passível de variabilidade. Sendo assim, modelos animais permitem investigações controladas e prospectivas, assim como a utilização de intervenções e desdobramentos dos mecanismos envolvidos. Esses modelos são adequados quando conseguem mimetizar a dependência entre a idade e o fenômeno em questão, e também desenvolver complicações agudas e crônicas que possam ser observadas clinicamente.⁵

Embora uma correlação precisa do perfil de desenvolvimento entre humanos e roedores seja ainda um foco de discussão, observações sobre crescimento cerebral e processos de mielinização sugerem que as primeiras duas semanas de desenvolvimento pós-natal dos roedores sejam

compatíveis com o período de transição de lactente para criança em humanos.²⁷ É exatamente nesse período que os roedores apresentam maior suscetibilidade a crises convulsivas induzidas por hipóxia, mais precisamente entre os dias 10 a 12 de vida pós-natal (P10-12). No entanto, roedores com menor tempo de vida (P5-7), ou mais velhos (P15-60) não apresentaram resposta convulsivante quando submetidos a um episódio de hipóxia global (5-7% de oxigênio por 15 minutos). As respostas características desses animais foram crises tônico-clônicas acompanhadas de descargas alteradas de EEG, com foco epileptogênico no hipocampo e no neocórtex.^{28,29}

Roedores expostos à hipóxia com 10 a 11 dias de vida pós-natal (P10-11) demonstraram latência diminuída para geração de crises, na fase adulta, quando estimulados com fluorotil, ácido kaínico e pentilenotetrazol.^{22,30,31} Acerca do dano tecidual nesse modelo animal, constatou-se que apenas a região do mesencéfalo apresentou diminuição significativa do número de células neuronais, enquanto que o hipocampo e o córtex temporal não foram prejudicados pela hipóxia cerebral.³⁰ A princípio, sabe-se que crises prolongadas e *status epilepticus* em roedores com pouco tempo de vida causam mínima lesão cerebral, ao contrário do que é observado comumente nas extensas lesões hipocampais e límbicas no cérebro de ratos adultos. Estas distintas constatações não estão relacionadas à morte neuronal induzida por crise convulsiva, mas são atribuídas à conectividade neuronal alterada e à expressão de receptores específicos.³²

No trabalho de Chen et al.,³³ foi observada redução crônica dos níveis de fosforilação da CREB no sítio Ser133, da proteína pós-sináptica de densidade 95 (PSA-95), e do complexo PSA-95 acoplado às subunidades dos receptores NMDA (NR1, NR2A e NR2B), mesmo na ausência de perda neuronal na área hipocampal de CA1 de animais previamente expostos a hipóxia no décimo dia de vida (P10). Além disto, os animais apresentaram desempenho prejudicado no labirinto aquático de Morris, evidenciando alteração crônica da memória de longa duração. No entanto, a ativação dos receptores dopaminérgicos D1/D5 – através da administração contínua do agonista A68930 em P17-24 – resultou em melhora significativa no desempenho cognitivo, assim como aumento da expressão do complexo PSA-95/NMDA e CREB^{Ser133} fosforilada.

A partir de estudos eletrofisiológicos de fatias hipocampais de ratos – tanto após hipóxia em

P10, como em animais adultos previamente expostos – verificou-se a confirmação dos achados comportamentais de aumento da excitabilidade hipocampal e da suscetibilidade a crises convulsivas. Em ambos os casos a amplitude e duração da potenciação de longa duração na área hipocampal de CA1 estavam acentuadas em comparação aos animais controle. Registros extracelulares nas áreas de CA1 e CA3 apresentaram duração pós-disparo significativamente aumentada em resposta ao *kindling* de ratos hipóxicos. Verificou-se, também, maior indução de descargas ictais em CA1 de fatias hipocampais provenientes de animais hipóxicos, quando estas foram perfundidas com meio livre de magnésio. Estes dados sugerem que, mesmo na ausência de lesão morfológica ou morte neuronal evidente, houve alteração funcional da excitabilidade hipocampal de maneira aguda e crônica, devido a um insulto convulsivo breve e induzido por hipóxia cerebral durante um período crítico do desenvolvimento do SNC.³⁴

Utilizando esse mesmo modelo animal, crises convulsivas induzidas por hipóxia foram relativamente refratárias à administração de antagonistas de receptores NMDA (lorazepam ou MK-801), mas não de receptores AMPA (topiramato e NBQX).^{22,35} Partindo destas constatações, concluiu-se que as crises convulsivas são dependentes da ativação de receptores AMPA, verificando também expressão diminuída de subunidade GluR2 – limitador do influxo de Ca²⁺ pelo canal iônico – no hipocampo e neocórtex, em até 72-96 horas após hipóxia, em ratos P10.³⁶ Ao contrário do que ocorre na morte neuronal decorrente da excessiva ativação de receptores NMDA em animais adultos, o influxo de Ca²⁺ através de receptores AMPA pobres em subunidades GluR2 em ratos imaturos produz resultados histológicos benignos, embora ainda patológicos.

Recentemente, constatou-se que a estimulação de receptores AMPA pelo processo epileptogênico da hipóxia resulta na ativação imediata da fosfatase calcineurina (CaN) na região hipocampal de CA1. Além disso, demonstrou-se que a defosforilação das subunidades b2/3 de receptores GABA_A e conseqüente diminuição da funcionalidade são dependentes da ativação de CaN, resultante de níveis elevados de Ca²⁺ intracelular. Em contrapartida, quando os animais foram pré-tratados com a droga imunossupressora FK-506 (inibidor de CaN), houve prevenção da ocorrência de crises induzidas por

hipóxia. Adicionalmente, através de registros eletrofisiológicos de fatias cerebrais preparadas imediatamente após indução de crise por hipóxia em ratos P10, observou-se diminuição da amplitude e frequência de correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas (sIPSCs) e em miniatura (mIPSCs) de neurônios hipocâmpais de CA1. Sendo assim, os dados sugerem que receptores AMPA permeáveis a Ca^{2+} e CaN tem influência sobre a supressão inibitória aguda da transmissão sináptica, contribuindo assim para a hiperexcitabilidade hipocâmpal decorrente das crises convulsivas induzidas por hipóxia cerebral.³²

Conforme Sanchez et al.,³⁷ observou-se que mesmo após 3-5 dias da indução de crises por hipóxia em ratos P10, pode-se ainda verificar diminuição de frequência e amplitude de sIPSCs e diminuição de amplitude de mIPSCs de neurônios piramidais de CA1. Curiosamente, uma semana após o insulto inicial, apenas a frequência de sIPSCs no grupo hipóxico permaneceu diminuída. Enquanto que as modificações agudas podem ser justificadas pela atividade da CaN e pela rápida desregulação de componentes pré e pós-sinápticos da transmissão inibitória, os dados sugerem que a diminuição persistente da frequência de sIPSCs possa resultar da diminuição do disparo espontâneo de interneurônios inibitórios pré-sinápticos.

Todas estas informações são de extrema importância, pois através delas pode-se identificar alvos terapêuticos celulares ou moleculares que irão viabilizar estratégias de reversão das consequências a longo prazo, e não apenas controle anticonvulsivo. Estudos com modelos animais e ensaios clínicos devem manter sintonia, a fim de possibilitar o entendimento sobre o quão segura e eficazmente os dados de roedores podem prever as respostas em humanos. É essencial a colaboração interdisciplinar entre neurocientistas e neurologistas para garantir sucesso nesses estudos.²¹

Ao mesmo tempo em que os achados e deduções dos modelos animais dão suporte à idéia de que as crises neonatais provocam epileptogênese e déficits cognitivos, estas constatações contrastam com investigações clínicas, as quais sugerem que as crises neonatais são marcadores sintomáticos de neuropatologias ou transtornos metabólicos pré-existentes ou em desenvolvimento. Mesmo com diversos trabalhos de alta qualidade em modelos animais de crises convulsivas – oferecendo enorme contribuição para

o entendimento e reformulação de tradicionais conceitos na epileptologia – ainda não há evidências convincentes de que crises neonatais *per se* são a causa original da epileptogênese. Acredita-se também que exista um fator de predisposição envolvido nas crises neonatais e suas conseqüências, visto que um mesmo insulto é capaz de gerar distintas reações entre os neonatos. Desta forma, um grande número de crises neonatais demonstra ser multifatorial, sendo este um fator de confusão entre pesquisas clínicas e experimentais. Segundo Lombroso,²³ o mais importante a ser destacado é que sempre o pior desfecho das crises convulsivas neonatais está correlacionado com a etiologia mais grave, e não com a duração ou com a frequência do fenômeno ictal.

NEUROPEPTÍDEO NAP: RELAÇÃO COM HIPÓXIA E POTENCIAL TERAPÊUTICO

Muitos são os fatores que contribuem para a falta de progresso na terapêutica das crises convulsivas neonatais. Estudos rigorosos confirmaram a impressão clínica de eficácia limitada, sobre os neonatos, das drogas anticonvulsivantes mais usadas. Até o presente momento, não foi desenvolvido um composto especialmente para o controle de crises convulsivas neonatais. Outros desafios referentes à melhora na terapêutica e no desfecho desses pacientes incluem a diversidade etiológica, as comorbidades e a complexidade diagnóstica das crises.²¹

A indução de proteínas neurotróficas é uma parte fundamental da resposta do SNC a uma grande variedade de insultos que afetam a integridade neuronal. Geralmente, os neurônios, quando estimulados por processos danosos, enviam sinais extracelulares a astrócitos e microglia que os intermedeiam, induzindo à liberação de neurotrofinas específicas.³⁸ A proteína neuroprotetora atividade dependente (ADNP; *activity-dependent neuroprotective protein*) foi identificada em células gliais e pode ser secretada por estas e controlada pelo peptídeo vasoativo intestinal (VIP; *vasoactive intestinal peptide*).³⁹ No entanto, a ADNP contém um sítio ativo denominado NAP – peptídeo de apenas 8 aminoácidos de seqüência NAPVSIPQ – que já se demonstrou *in vitro* proteger células neuronais da toxicidade associada com peptídeo beta amilóide, NMDA, bloqueio elétrico (tetrodotóxina), glicoproteína gp120 (vírus do HIV), fator

de necrose tumoral alfa (TNF- α), dopamina, H₂O₂, privação de nutrientes e sobrecarga de zinco. Na maioria dos casos, a neuroproteção torna-se evidente em concentração de NAP na ordem de femtomolar e picomolar. Já em estudos *in vivo*, NAP tem ação protetora contra colinotoxicidade, deficiência de apolipoproteína E, traumatismo craniano, oclusão da artéria cerebral média, síndrome alcoólica fetal, hipóxia-isquemia, esclerose múltipla (encefalomielite autoimune) e disfunções cognitivas e de ansiedade associadas à meia idade.⁴⁰

Demonstrou-se que o peptídeo NAP liga-se especificamente à tubulina, principalmente com a subunidade β -tubulina cérebro específica, após internalização neuronal. Esta propriedade – condizendo com função de chaperona – facilita a reunião de microtúbulos que aumentam a sobrevivência e a integridade celular e atuam na manutenção da funcionalidade.⁴¹ Tais resultados sustentam a hipótese de um mecanismo de ação que não requer receptores neuronais de superfície nem ação dependente da quiralidade desse peptídeo.⁴² Como o NAP é solúvel em membranas lipídicas, atinge o SNC minutos após a administração intraperitoneal, intravenosa ou intranasal, sendo capaz de ultrapassar facilmente a barreira hematoencefálica. Acerca do potencial imunogênico do peptídeo, foram realizados testes em coelhos e não houve detecção de anticorpos contra NAP no soro destes animais. Após uma bateria de testes toxicológicos em ratos e cães, incluindo toxicidade de doses repetidas, testes cardiopulmonares e ensaios de função comportamental, não foram observados efeitos adversos com concentrações de NAP até 500 vezes acima da considerada biologicamente ativa.⁴⁰

Rotstein et al.⁴³ avaliaram o potencial neuroprotetor do peptídeo NAP na lesão hipóxico-isquêmica neonatal, através da exposição à hipóxia global pós-natal de camundongos deficientes em apolipoproteína E (ApoE). Após hipóxia e subsequente administração diária de solução contendo NAP (injeção subcutânea em P1-14; 25 μ l/mg), pôde-se constatar efeitos positivos nos desfechos cognitivos e nas habilidades motoras avaliadas. Recentemente, Kumral et al.⁴⁴ verificaram que uma única administração intraperitoneal de solução contendo NAP (0,3 μ g) foi capaz de diminuir significativamente a formação de óxido nítrico, resultando na preservação da densidade neuronal e na redução de neurônios em processo de apoptose nas áreas

hipocâmpais e no giro denteado de ratos recém-nascidos com lesão cerebral hipóxico-isquêmica.

O neuropeptídeo NAP está sob proteção conferida por patente e licenciada exclusivamente para estudos clínicos desenvolvidos pela empresa canadense Allon Therapeutics Inc. (TSX: NPC), The Neuro Protection CompanyTM. Este grupo de biotecnologia visa o desenvolvimento de drogas para o tratamento de uma grande variedade de patologias neurodegenerativas. As formulações intranasal (AL-108) e intravenosa (AL-208) do peptídeo NAP estão sendo submetidas a ensaios clínicos. Conforme informações disponíveis no endereço eletrônico da empresa, um ensaio clínico humano de fase Ia já foi finalizado, utilizando AL-108 em pacientes com Doença de Alzheimer e esquizofrenia, havendo planejamento para a realização de outros estudos em populações de risco para o desenvolvimento dessas patologias. Acerca do AL-208, está sendo desenvolvido um ensaio clínico humano de fase Ib a fim de avaliar segurança, tolerabilidade e farmacocinética em indivíduos saudáveis e diabéticos. Além desse, outro ensaio clínico de fase IIa está em andamento para verificar a eficácia de uma única dosagem de AL-208 em pacientes com déficit cognitivo leve após cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea. A companhia também utiliza variações dessas formulações – como por exemplo, AL-209, AL-309 e AL-408 – em estudos pré-clínicos com modelos experimentais de Doença de Alzheimer, síndrome alcoólica fetal e esclerose amiotrófica lateral.⁴⁵

CONCLUSÕES

Crises convulsivas neonatais associadas à hipóxia são prejudiciais para o desenvolvimento normal do SNC, provavelmente ocasionando complicações futuras que poderão comprometer a qualidade de vida do indivíduo. Em face da variabilidade no diagnóstico e nas condutas terapêuticas, que dependem das condições do atendimento neonatal, esses casos demandam uma nova abordagem de tratamento, mais específica e que não comprometa o desenvolvimento normal do SNC.

O peptídeo NAP é um fármaco altamente potente e, pelas evidências científicas revisadas neste artigo, parece ser uma alternativa terapêutica promissora no tratamento das crises convulsivas neonatais associadas à hipóxia. Por ser uma droga de fácil administração, grande

ação neuroprotetora contra uma variedade de neuropatologias e que atinge facilmente o SNC, o NAP apresenta características que o tornam uma droga conveniente para pacientes pediátricos. Além disso, como foi demonstrado em diversos estudos, tanto em modelos animais como em ensaios clínicos, as propriedades farmacológicas do NAP formam a base do seu potencial terapêutico único: atividade em concentração de femtomolar e aparente estabilidade *in vivo*.

Embora seu mecanismo de ação não esteja completamente esclarecido, a ação neuroprotetora abrangente do NAP pode ser justificada por sua capacidade de estabilizar a estrutura neuronal, agindo diretamente no citoesqueleto microtubular, e por sua ação anti-oxidativa, seja pela redução do acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio ou na manutenção da atividade mitocondrial. Apesar do entusiasmo do uso versátil do peptídeo NAP para o tratamento de várias doenças neurológicas, ainda são necessários mais estudos experimentais e clínicos para garantir segurança e viabilidade de sua administração.

REFERÊNCIAS

- Jensen FE. Developmental factors regulating susceptibility to perinatal brain injury and seizures. *Curr Opin Pediatr*. 2006;18:628-33.
- Bartha AI, Shen J, Katz KH, et al. Neonatal seizures: multicenter variability in current treatment practices. *Pediatr Neurol*. 2007;37:85-90.
- Dacosta J, Palmira A, Yacubian, EM, et al. Crises convulsivas no recém-nascido. São Paulo: Lemos; 1998.
- Dacosta J, Nunes, ML, Fiori, RM. Convulsões no período neonatal. *J Pediatr (Rio J)*. 2001;77:115-22.
- Jensen FE, Baram TZ. Developmental seizures induced by common early-life insults: short- and long-term effects on seizure susceptibility. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2000;6:253-7.
- Annegers JF, Hauser WA, Shirts SB, et al. Factors prognostic of unprovoked seizures after febrile convulsions. *N Engl J Med*. 1987;316:493-8.
- Berg AT, Shinnar S. Do seizures beget seizures? An assessment of the clinical evidence in humans. *J Clin Neurophysiol*. 1997;14:102-10.
- Cendes F, Andermann F, Dubeau F, et al. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology*. 1993;43:1083-7.
- Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JA. Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol*. 1964;10:233-48.
- Harvey AS, Grattan-Smith JD, Desmond PM, et al. Febrile seizures and hippocampal sclerosis: frequent and related findings in intractable temporal lobe epilepsy of childhood. *Pediatr Neurol*. 1995;12:201-6.
- Nelson KB, Ellenberg JH. Predictors of epilepsy in children who have experienced febrile seizures. *N Engl J Med*. 1976;295:1029-33.
- Dinner D. Posttraumatic epilepsy. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.
- Shinnar S. Prolonged febrile seizures and mesial temporal sclerosis. *Ann Neurol*. 1998;43:411-2.
- Westmark KD, Barkovich AJ, Sola A, et al. Patterns and implications of MR contrast enhancement in perinatal asphyxia: a preliminary report. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1995;16:685-92.
- Jennett WB, Lewin W. Traumatic epilepsy after closed head injuries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1960;23:295-301.
- Volpe JJ. Neurology of the newborn. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000.
- Legido A, Clancy RR, Berman PH. Neurologic outcome after electroencephalographically proven neonatal seizures. *Pediatrics*. 1991;88:583-96.
- Bergamasco B, Benna P, Ferrero P, et al. Neonatal hypoxia and epileptic risk: a clinical prospective study. *Epilepsia*. 1984;25:131-6.
- Painter MJ, Scher MS, Stein AD, et al. Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures. *N Engl J Med*. 1999;341:485-9.
- Booth D, Evans DJ. Anticonvulsants for neonates with seizures. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004(4): CD004218.
- Silverstein FS, Jensen FE. Neonatal seizures. *Ann Neurol*. 2007;62:112-20.
- Koh S, Tibayan FD, Simpson JN, et al. NBQX or topiramate treatment after perinatal hypoxia-induced seizures prevents later increases in seizure-induced neuronal injury. *Epilepsia*. 2004;45:569-75.
- Lombroso CT. Neonatal seizures: gaps between the laboratory and the clinic. *Epilepsia*. 2007;48(Suppl 2): 83-106.
- Parker J, Ashraf QM, Akhter W, et al. Effect of post-hypoxic reoxygenation on DNA fragmentation in cortical neuronal nuclei of newborn piglets. *Neurosci Lett*. 2007;412:273-7.
- Mishra OP, Zubrow AB, Ashraf QM, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibition during post-hypoxic reoxygenation on Bax and Bcl-2 protein expression and DNA fragmentation in neuronal nuclei of newborn piglets. *Brain Res*. 2006;1101:20-8.
- Mishra OP, Fritz KI, Delivoria-Papadopoulos M. NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2001;7:249-53.
- Gottlieb A, Keydar I, Epstein HT. Rodent brain growth stages: an analytical review. *Biol Neonate*. 1977;32: 166-76.
- Jensen FE, Applegate CD, Holtzman D, et al. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann Neurol*. 1991;29:629-37.
- Jensen FE, Wang C. Hypoxia-induced hyperexcitability in vivo and in vitro in the immature hippocampus. *Epilepsy Res*. 1996;26:131-40.
- Chen WF, Chang H, Huang LT, et al. Alterations in long-term seizure susceptibility and the complex of PSD-95 with NMDA receptor from animals previously exposed to perinatal hypoxia. *Epilepsia*. 2006; 47:288-96.

31. Jensen FE, Holmes GL, Lombroso CT, et al. Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. *Epilepsia*. 1992; 33:971-80.
32. Sanchez RM, Dai W, Levada RE, et al. AMPA/kainate receptor-mediated downregulation of GABAergic synaptic transmission by calcineurin after seizures in the developing rat brain. *J Neurosci*. 2005;25:3442-51.
33. Chen WF, Chang H, Wong CS, et al. Impaired expression of postsynaptic density proteins in the hippocampal CA1 region of rats following perinatal hypoxia. *Exp Neurol*. 2007;204:400-10.
34. Jensen FE, Wang C, Stafstrom CE, et al. Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia *In vivo*. *J Neurophysiol*. 1998;79:73-81.
35. Jensen FE, Blume H, Alvarado S, et al. NBQX blocks acute and late epileptogenic effects of perinatal hypoxia. *Epilepsia*. 1995;36:966-72.
36. Sanchez RM, Koh S, Rio C, et al. Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. *J Neurosci*. 2001;21:8154-63.
37. Sanchez RM, Justice JA, Zhang K. Persistently decreased basal synaptic inhibition of hippocampal CA1 pyramidal neurons after neonatal hypoxia-induced seizures. *Dev Neurosci*. 2007;29:159-67.
38. Zemlyak I, Manley N, Sapolsky R, et al. NAP protects hippocampal neurons against multiple toxins. *Peptides*. 2007;28:2004-8.
39. Furman S, Steingart RA, Mandel S, et al. Subcellular localization and secretion of activity-dependent neuroprotective protein in astrocytes. *Neuron Glia Biol*. 2004;1:193-9.
40. Gozes I, Morimoto BH, Tiong J, et al. NAP: research and development of a peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP). *CNS Drug Rev*. 2005;11:353-68.
41. Divinski J, Holtser-Cochav M, Vulih-Schultzman I, et al. Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin. *J Neurochem*. 2006;98:973-84.
42. Busciglio J, Pelsman A, Helguera P, et al. NAP and ADNF-9 protect normal and Down's syndrome cortical neurons from oxidative damage and apoptosis. *Curr Pharm Des*. 2007;13(11):1091-8.
43. Rotstein M, Bassan H, Kariv N, Speiser Z, Harel S, Gozes I. NAP enhances neurodevelopment of newborn apolipoprotein E-deficient mice subjected to hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(1):332-9.
44. Kumral A, Yesilirmak DC, Sonmez U, Baskin H, Tugyan K, Yilmaz O, et al. Neuroprotective effect of the peptides ADNF-9 and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res*. 2006;1115:169-78.
45. Allon Therapeutics Inc. The Neuroprotection Company™ [Internet] Vancouver (BC): Allon Therapeutics; c2005. [acesso 2008 Abr 7]. Disponível em: www.allontherapeutics.com/index.htm

Endereço para correspondência:
 JADERSON COSTA DA COSTA
 Av. Ipiranga, 6690, 2º andar
 CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil
 Fone: (51) 3320-3000 ramal 2173
 E-mail: jcc@puccs.br