

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Kelly Bordin Trelles

**ESTUDO DO SISTEMA PURINÉRGICO E COLINÉRGICO NO
ENCÉFALO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPOPERFUSÃO
ENCEFÁLICA CRÔNICA E AO AMBIENTE ENRIQUECIDO**

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

Kelly Bordin Trelles

**ESTUDO DO SISTEMA PURINÉRGICO E COLINÉRGICO NO
ENCÉFALO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPOPERFUSÃO
ENCEFÁLICA CRÔNICA E AO AMBIENTE ENRIQUECIDO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Kelly Bordin Trelles

ESTUDO DO SISTEMA PURINÉRGICO E COLINÉRGICO NO ENCÉFALO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPOPERFUSÃO ENCEFÁLICA CRÔNICA E AO AMBIENTE ENRIQUECIDO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 19 de agosto de 2016:

Jeandre Augusto dos Santos Jaques, Dr. (UFMS)
(Presidente/Orientador)

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (UFSM)
(Co-Orientadora)

Margarete Dulce Bagatini, Dra. (UFFS)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial ao meu amado esposo Cristiano e aos nossos filhos Carlos Eduardo e Luiza. Dedico também aos meus pais Plínio e Heloisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu amado Cristiano, meu maior incentivador e responsável pelas maiores alegrias em minha vida. Obrigada pelo teu companheirismo e por estar comigo na realização de mais esta etapa.

Ao meu filho Cadu, que mesmo tão jovem é o meu maior exemplo de superação, maturidade e força.

À minha pequena Luiza que desde sua chegada a este mundo percorreu esta trajetória junto a mamãe.

Aos meus pais pelo exemplo de honestidade, humanidade e perseverança. Por não medir esforços para estar ao meu lado.

As tias Vera e Rosangela e a prima Anna Francisca pela amizade e principalmente por me fazerem acreditar que é possível e necessário investir no que amamos fazer.

Aos meus sogros Rosemary e Rudi pelo apoio.

Ao professor Jeandre Augusto dos Santos Jaques agradeço sua disponibilidade e cordialidade sempre presentes ao lidar com minhas dúvidas e dificuldades. Pelos ensinamentos e conselhos sempre bem colocados e por seu exemplo de dedicação. Obrigada pela confiança!

À professora Daniela Bitencourt Rosa Leal por me proporcionar esta oportunidade e me permitir ingressar em seu grupo de estudos. Agradeço também pela atenção e esforço para que eu pudesse realizar meus projetos.

À querida colega Ana Paula Martini que além de proporcionar o conhecimento necessário para que pudesse concretizar meus objetivos esteve sempre disposta para me auxiliar e incentivar.

A todos meus colegas do laboratório 4229, agradeço a cada um de vocês a compreensão, dedicação, ensinamentos, companheirismo e amizade.

As colegas Juliana e Luana por toda dedicação destinada a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica pelos ensinamentos destinados aos alunos.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

ESTUDO DO SISTEMA PURINÉRGICO E COLINÉRGICO NO ENCÉFALO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPOPERFUSÃO ENCEFÁLICA CRÔNICA E AO AMBIENTE ENRIQUECIDO

AUTORA: Kelly Bordin Trelles

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Daniela Bitencourt Rosa Leal

A hipoperfusão encefálica crônica (HEC) vem sendo frequentemente associada às doenças neurodegenerativas. Uma redução persistente do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) altera a homeostase neuronal causando danos isquêmicos difusos e ativando diversos sistemas, dentre eles os sistemas purinérgico e colinérgico. Os nucleotídeos extracelulares ATP, ADP, AMP e o nucleosídeo adenosina são importantes moléculas sinalizadoras no sistema nervoso central (SNC). Seus níveis extracelulares são controlados pela ação de um complexo enzimático formado pelas enzimas E-NTPDase, E-5' nucleotidase e E-ADA. A enzima acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel essencial no mecanismo colinérgico podendo também atuar como um marcador inflamatório. O ambiente enriquecido (AE), por promover neurogênese hipocampal e plasticidade sináptica parece ter efeito neuroprotetor sobre os comprometimentos relacionados ao envelhecimento. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do AE utilizando o modelo experimental de HEC por oclusão de dois vasos (2VO) na atividade das enzimas do sistema purinérgico e AChE. Ratos machos Wistar (200-250g) (n=40) foram divididos em 4 grupos, dois deles expostos 30 dias ao AE e os demais grupos alojados em ambiente padrão (AP). Os grupos foram nomeados como: 2VO/AE (n=12), sham/AE (n=8), 2VO/AP (n=12) e sham/AP (n=8). Os resultados revelaram um aumento na atividade da enzima E-NTPDase na hidrólise do ATP nos grupos 2VO/AE e 2VO/AP em sinaptossomas do córtex e no grupo 2VO/AE do hipocampo quando comparados com seus respectivos controles. E também um aumento na hidrólise do ADP em sinaptossomas no córtex do grupo 2VO/AP e no hipocampo do grupo 2VO/AE. Quanto à atividade da enzima E-5'-NT foi observado um aumento significativo nos grupos 2VO/AE e 2VO/AP. No entanto, verificou-se um aumento menos pronunciado da hidrólise do AMP no hipocampo dos animais 2VO/AE em relação ao 2VO/AP. Quando avaliou-se a atividade da enzima E-ADA, nenhuma diferença estatística foi observada nos grupos 2VO em relação a seus controles. A atividade da enzima AChE aumentou em sinaptossomas do córtex no grupo 2VO/AE e no hipocampo do grupo 2VO/AP. Os resultados apresentados sugerem que os danos causados pela HEC na fase crônica levam ao aumento dos níveis de adenosina no espaço extracelular e a exposição ao AE, especialmente no hipocampo, pode reduzir a hidrólise do AMP. Além disso, a atividade da enzima AChE aumentou nos ratos hipoperfundidos. Com isso, concluímos que a hipoperfusão crônica altera a atividade das enzimas do sistema purinérgico e colinérgico e o AE pode exercer um efeito adjuvante à neuroproteção.

Palavras-chave: Hipoperfusão encefálica crônica, ambiente enriquecido, demência, sistema purinérgico, acetilcolinesterase

ABSTRACT

STUDY OF PURINERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEM IN THE BRAIN OF ANIMALS SUBJECTED TO CHRONIC CEREBRAL HYPOPERFUSION AND ENRICHED ENVIRONMENT

AUTHORA: Kelly Bordin Trelles

ADVISOR: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

CO-ADVISORA: Prof^a. Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Chronic cerebral hypoperfusion (CCH) has frequently been associated with neurodegenerative diseases. A persistent reduction of cerebral blood flow (CBF) changes the neuronal homeostasis causing diffuse ischemic damage and activating various systems, including the purinergic and cholinergic systems. Extracellular nucleotides ATP, ADP, AMP and adenosine nucleoside are important signaling molecules in the central nervous system (CNS). Their extracellular levels are controlled by the action of an enzyme complex formed by the enzymes E-NTPDase, E-5'nucleotidase and E-ADA. The enzyme acetylcholinesterase (AChE) plays an essential role in cholinergic mechanism also can act as an inflammatory marker. The enriched environment (EE), to promote hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity seems to have neuroprotective effect on commitments related to aging. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of EE using the experimental model of HEC by occluding two vessels (2VO) in the activity of the enzymes AChE and purinergic system. Male Wistar rats (200-250g) (n = 40) were divided into 4 groups, two of them exposed to the EE 30 days and the other groups housed in standard environment (SE). The groups were named as: 2VO/EE (n = 12), sham/EE (n = 8), 2VO/SE (n = 12) and sham/SE (n = 8). The results showed an increase in E-NTPDase enzyme activity in the hydrolysis of ATP in 2VO/EE and 2VO/SE groups in the cortex synaptosomes and 2VO/EE group hippocampus when compared to their respective controls. Also an increase in the hydrolysis of ADP in synaptosomes in the cortex of 2VO/SE group and hippocampal 2VO/EE group. As for E-5'-NT enzyme activity was observed a significant increase in 2VO/EE and 2VO/SE groups. However, there is a less pronounced increase in AMP hydrolysis in the hippocampus of animals 2VO/EE relative to 2VO/SE. When we evaluated the activity of E-ADA, no statistical difference was observed in 2VO groups compared to their controls. The activity of AChE enzyme increased in the cortex synaptosomes in 2VO/EE and hippocampal 2VO/SE group. The results suggest that the damage caused by HEC in chronic phase leading to increased adenosine levels in the extracellular space and the EE exposure, especially in the hippocampus, can reduce AMP hydrolysis. Additionally the activity of AChE enzyme increased in hypoperfused rats. Thus, conclude that chronic hypoperfusion alters the activity of the enzymes of the purinergic and cholinergic system and the EE may have an adjuvant effect on neuroprotection.

Keywords: chronic brain hypoperfusion, enriched environment, dementia, purinergic system, acetylcholinesterase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Desenho esquemático do clampeamento das carótidas	19
Figura 2 –	Fases da hipoperfusão	20
Figura 3 –	Cascata isquêmica	22
Figura 4 –	Representação dos componentes do sistema purinérgico.	25
Figura 5 –	Componentes do sistema colinérgico	29
Figura 6 –	Desenho esquemático das áreas estimuladas pelo enriquecimento ambiental	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2VO	Modelo de Oclusão de 2 Vasos
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina difosfato
AE	Ambiente enriquecido
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BuChE	Butirilcolinesterase
Ca ²⁺	Cálcio
ChAT	Colina acetiltransferase
DA	Doença de Alzheimer
DV	Demência vascular
E-5'-NT	Ecto-5'-nucleotidase
E-ADA	Adenosina desaminase
E-NPPs	Ecto-nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases
E-NTPDases	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
HEC	Hipoperfusão encefálica crônica
Mg ²⁺	Magnésio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPACC	Oclusão permanente das artérias carótidas comuns
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central

LISTA DE ANEXOS

Anexo A –	Certificado aprovação comitê de ética em uso de animais (CEUA)	68
Anexo B –	Normas para submissão artigo científico revista Cell Biochemistry and Function	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 DEMENCIAS.....	16
3.2 HIPOPERFUSAO ENCEFÁLICA CRONICA.....	17
3.3 SISTEMA PURINÉRGICO.....	23
3.4 SISTEMA COLINÉRGICO.....	28
3.5 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL.....	30
4 MANUSCRITO CIENTÍFICO	33
Abstract.....	34
Introdution.....	35
Materials and Methods.....	37
Results.....	40
Discussion.....	42
References.....	45
5 CONCLUSÃO	55
6 REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

A demência cresce acentuadamente com a idade. Projeções para a população brasileira apontam para um crescimento de 7,6% para 7,9% entre 2010 e 2020 na taxa de prevalência de demência na população com 65 anos, ou seja, 55.000 novos casos por ano (BURLÁ et al., 2013). A demência pode ser definida como uma síndrome caracterizada pelo declínio progressivo e global de memória, associado ao déficit de uma ou mais funções cognitivas (língua, agnosia, apraxias, funções executivas), com uma intensidade que possa interferir no desempenho social diário ou ocupacional do indivíduo (CARAMELLI & BARBOSA, 2002; MACHADO & CARAMELLI, 2006).

A hipoperfusão encefálica crônica (HEC) é um achado comum em diversas distúrbios ligados a alterações cerebrovasculares e sanguíneas, revelando assim seu importante papel na neurodegeneração e demência (ZHAO & GONG, 2014). Esta hipótese está baseada na observação de que a perfusão cerebral normalmente declina durante o envelhecimento e piora na presença de fatores de risco vasculares a longo prazo (SAXENA et al., 2015).

Diversos modelos animais buscam mimetizar os efeitos da redução da perfusão cerebral, dentre eles, a oclusão permanente das artérias carótidas comuns (2VO) em ratos (DE LA TORRE, 2012). O dano isquêmico provocado pelo 2VO é maior em neurônios do hipocampo e em zonas de fronteira das artérias corticais e na substância branca (JIWA et al., 2010). Embora este seja um modelo amplamente utilizado, a alta mortalidade dos animais é um ponto negativo. Para isso, foi desenvolvido um modelo modificado, que consiste na oclusão das artérias com uma semana de intervalo. Neste, os danos são similares aos do modelo convencional, no entanto, a mortalidade dos animais diminui significativamente (CECHETTI et al., 2010).

Durante a HEC, o fluxo sanguíneo cerebral (FSC) reduz e espécies reativas ao oxigênio são produzidas podendo aumentar os danos ao cérebro. Além disso, déficits cognitivos, como dificuldade na aprendizagem e memória também são encontrados (CECHETTI et al., 2012a; FARKAS et al., 2007; BAYAT et al., 2015; ZHU et al., 2011). Como um neuromodulador endógeno no cérebro, os níveis extracelulares de adenosina representam um mecanismo endógeno crítico na regulação das respostas imunes e inflamatórias e estão marcadamente aumentados em condições hipóxico/isquêmicas (CHEN et al., 2014).

O sistema purinérgico é composto por três principais componentes: os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, os quais são os mediadores da sinalização; os receptores, através dos quais estes nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos e, as ectoenzimas, responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares destas moléculas (YEGUTKIN, 2008). O controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos da adenina e da adenosina, bem como a consequente sinalização purinérgica por eles induzida através dos receptores, é fundamental na manutenção dos processos fisiológicos (ROBSON et al., 2006). Este controle é realizado por uma variedade de enzimas ancoradas à superfície celular ou localizadas no meio intersticial de forma solúvel (ZIMMERMANN, 2011). Tais enzimas são conhecidas como ectonucleotidases e podem ser classificadas como E-NTPDase (nucleosídeo trifostato 5'difosfohidrolase ou apirase; EC 3.6.1.5), E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase; EC 3.1.4.1) e E-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) sendo amplamente distribuídas nos tecidos (Figura 9) (ZIMMERMANN, 2000). Outra ectoenzima também importante no metabolismo purinérgico é a adenosina deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), responsável pela desaminação do nucleosídeo adenosina (ZIMMERMANN et al., 2012a).

Estudos tem demonstrado que a HEC pode induzir uma disfunção colinérgica central, sugerindo que uma diminuição na ACh no cortex cerebral e hipocampo em ratos 2VO poderiam resultar a partir da redução na habilidade na síntese de ACh e aumento na habilidade em degradar ACh em condições de HEC. Ainda, os achados de que neurônios intactos no córtex e hipocampo estão significativamente correlacionados ChAT, AChE e ACh sugerem que o aumento do dano neuronal pode contribuir para a disfunção colinérgica central em ratos 2VO. Dado que a ACh possui papel crucial nos processos de aprendizagem e memória (DEIANA; PLATT; RIEDEL, 2011; MICHEAU; MARIGHETTO, 2011).

De forma a minimizar os prejuízos causados pela HEC, o ambiente enriquecido (AE) tem sido apontado por aumentar o estímulo sensorial e social e conduzir fortemente as mudanças plásticas no cérebro. O AE é conhecido principalmente pelo seu papel na proteção neuronal via fatores tróficos, neurogênese, arborização dendrítica e sinaptogênese na qual é acompanhada pela melhora nas habilidades cognitivas (BAYAT et al., 2015). E o AE emerge como uma condição poderosa para mudanças celulares, moleculares e comportamentais em nível de hipocampo (MORA, 2013).

Sabendo do importante envolvimento enzimático em condições de hipóxia/isquemia foi utilizado o modelo 2VO para induzir uma HEC e investigar os efeitos preventivos do AE sobre a atividade das enzimas do sistema purinérgico e AChE.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de enzimas do sistema purinérgico e colinérgico em estruturas cerebrais de animais submetidos a um modelo de hipoperfusão encefálica crônica (HEC) e expostos a um ambiente enriquecido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar *ex vivo* 30 dias após a indução da HEC:
 - A atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-NT e E-ADA em sinaptossomas de córtex cerebral e hipocampo;
 - A atividade da enzima AChE em sinaptossomas de córtex cerebral e hipocampo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DEMÊNCIAS

Estudos sobre o envelhecimento e desordens neurodegenerativas relacionados com a idade estão cada vez mais frequentes (HERRERA et al., 2002). Segundo a projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a quantidade de pessoas acima de 65 anos vai praticamente quadruplicar até 2060. De acordo com o censo, a população com essa faixa etária é de 14,9 milhões de pessoas (7,4% do total) e chegará a 58,4 milhões (26,7%). A expectativa média de vida do brasileiro deve aumentar dos atuais 75 anos para 81 (IBGE, 2013). E o que realmente preocupa, é que com a expectativa de vida aumentando em todo mundo, o número de pessoas acometidas por demências cresce proporcionalmente (MATSON et al., 2014).

Em abril de 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou o documento “Demência: Uma Questão de Saúde Pública”, demonstrando preocupação com esse problema que afeta a qualidade de vida das pessoas longevas, especialmente nos países em desenvolvimento. A OMS estimou em 35,6 milhões o número de pessoas com demência em 2010, projetando uma duplicação neste número a cada 20 anos; ou seja, 65,7 milhões em 2030 e 115,4 milhões em 2050. No Brasil, informações sobre incidência e prevalência de demências restringem-se a pequenas áreas geográficas e a determinados períodos de tempo, ou seja, não há continuidade e nem amplitude nos registros dessa doença (NITRINI et al., 2009).

A distinção entre declínio cognitivo e provável demência é de grande importância (VANDENBERGHE & TOURNOY, 2005). Atualmente, define-se demência como condição na qual ocorre decréscimo cognitivo (linguagem, agnosias, apraxias, funções executivas) comparado a um nível prévio do indivíduo, com comprometimento de suas funções sociais e capacidade de realizar as atividades do cotidiano com uma intensidade que possa interferir no seu desempenho social diário ou ocupacional (DE SOUZA-TALARICO et al., 2016).

As síndromes demenciais podem ser classificadas em duas categorias: degenerativas e não degenerativas. As demências não degenerativas são decorrentes de acidentes vasculares,

processos infecciosos, traumatismos, dentre outras. Já as demências degenerativas têm sua origem predominantemente cortical, das quais fazem parte a Demência do Corpo de Lewy, Demência Frontotemporal, Demência Vascular (DV) e Doença de Alzheimer (DA). O diagnóstico etiológico se baseia em exames laboratoriais e de neuroimagem, sendo importante contar com a constatação do perfil neuropsicológico característico (ALLEGRI & HARRIS, 2001; CARAMELLI & BARBOSA, 2002; GALLUCCI & FORLENZA, 2005; GORZONI & PIRES, 2006).

A DV por hipoperfusão é uma forma de demência que se deve essencialmente a uma diminuição global no fluxo sanguíneo cerebral (FSC) com hipóxia, isquemia e lesões daí decorrentes (necrose laminar cortical, enfarte incompleto da substância branca, microenfartes cortico-subcorticais, esclerose do hipocampo e destruição neuronal seletiva (JELLINGER, 2014). Eventos hemodinâmicos como hipotensão grave ou parada cardíaca/respiratória transitória são normalmente as causas subjacentes (ROMÁN, 2005).

Distúrbios da circulação cerebral têm sido associados com declínio da função cognitiva em idosos e com o desenvolvimento de DV (KUANG et al., 2008). Esta hipótese baseia-se na observação de que a perfusão cerebral normalmente diminui durante o envelhecimento e piora na presença contínua dos fatores de risco até atingir um limiar crítico em que a perfusão é insuficiente para atender às demandas metabólicas do tecido cerebral (DE LA TORRE, 2012). O encéfalo necessita de uma grande quantidade de sangue para manter as suas funções normais, devido a sua alta taxa metabólica e a incapacidade de suas células em armazenar um estoque suficiente de moléculas de alta energia (SEELEY, 2008). Estudos indicam que uma redução persistente no fluxo sanguíneo cerebral (FSC) provoca disfunções neurológicas induzindo a deterioração cognitiva e dano neuronal, podendo comprometer os processos de aprendizagem e de memória, o que contribui para o desenvolvimento e progressão de demência (FARKAS et al, 2007; LIU & ZHANG, 2012; ZLOKOVIC, 2011).

3.2 HIPOPERFUSÃO ENCEFÁLICA CRÔNICA

O FSC é rigidamente controlado pelo metabolismo cerebral local (GUROL, 2013; LIU et al., 2015), no entanto, vários fatores de risco vasculares alteram a homeostase levando à sua redução. Dentre estes fatores estão a hipertensão, o diabetes, a aterosclerose

generalizada, o tabagismo e as doenças cardíacas (MEYER, 2000; ROMÁN, 2005). Distúrbios do FSC podem ser divididos em isquemia global, isquemia focal e hipoperfusão encefálica crônica (HEC), estando esta última relacionada tanto com a demência vascular (DV) quanto com a DA (ZHAO et al., 2014a).

A HEC é responsável por muitas alterações fisiopatológicas no cérebro, tais como perturbação do metabolismo, anormalidades na síntese de proteínas, lesões neuronais, ativação da glia, e lesões de substância branca (LIU & ZHANG, 2012). O estresse oxidativo de origem vascular como um resultado da HEC desempenha um papel significativo no aparecimento e progressão de doenças neurodegenerativas (IADECOLA, 2013). O dano oxidativo das células endoteliais vasculares, células gliais e neurônios prejudicam a função vascular através do acoplamento neurovascular resultando em um ciclo vicioso de redução adicional da perfusão cerebral (LIU & ZHANG, 2012).

As regiões mais afetadas pela HEC costumam ser o hipocampo e as zonas da fronteira arterial cortical, onde se inclui a matéria branca profunda e a zona cortical. O hipocampo, que representa um papel importante na retenção de memória e no processo de aprendizagem é altamente sensível aos danos isquêmicos (CECHETTI et al., 2012b; FARKAS et al., 2007).

Neste contexto, o modelo de HEC através da oclusão permanente das artérias carótidas comuns (modelo 2 vasos – 2VO) (Figura 1) inicialmente descrito por De La Torre & Fortin (1994) (DE LA TORRE & FORTIN, 1994), vem sendo empregado como modelo experimental em animais para o estudo da demência vascular, já que a hipoperfusão é um importante achado em humanos acometidos por este mal (KASPAROVÁ et al., 2005; OBRENOVICH et al., 2009). Com o intuito de aumentar a taxa de sobrevivência dos animais, foi desenvolvido um modelo HEC modificado no qual é realizada a oclusão bilateral permanente das artérias carótidas com um intervalo de 1 semana com o intuito de evitar uma redução abrupta do fluxo de sangue cerebral (CECHETTI et al., 2010).

Os principais resultados do modelo modificado, bem como o proposto inicialmente por De La Torre & Fortin (1994), incluem danos histopatológicos e na função da aprendizagem espacial. É possível também investigar o efeito da HEC na disfunção cognitiva com lesão significativa à substância branca, danos neuronais no hipocampo e processos neurodegenerativos (FARKAS et al., 2007; JING et al., 2015). Este comprometimento cognitivo pode estar relacionado à perda progressiva de neurônios piramidais do hipocampo,

uma associação frequentemente observada em envelhecimento e demência em humanos (CECHETTI et al., 2010).

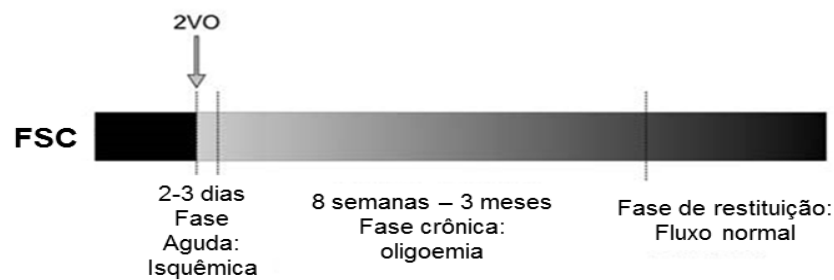
Figura 1 – Desenho esquemático mostrando o local da posição relativa do clampeamento da artéria carótida comum.



Fonte: Adaptada de (OHTA et al., 1997)

Diversos componentes do metabolismo cerebral foram caracterizados no modelo 2VO, e estes dados indicam que as mudanças no FSC podem ser divididas em três fases, com uma gradual transição entre elas em relação ao estado metabólico e homeostático celular (figura 2). A primeira, definida como fase aguda, ocorre imediatamente após a oclusão e dura de 2 a 3 dias. Nessa fase, o FSC cai drasticamente e se mantém muito baixo neste período criando condições hipóxico-isquêmicas que podem comprometer a atividade eletrofisiológica do tecido nervoso. Uma fase de hipoperfusão crônica segue com duração de 8 semanas a 3 meses. Neste período, o tecido sofre com uma moderada hipoglicemia somada a uma oliguemia, podendo ser considerada a fase que mais se assemelha com a redução do FSC em humanos diagnosticados com demência. A última fase, chamada de restituição, corresponde ao período no qual o fluxo sanguíneo volta ao seu estado basal e a hipoperfusão vai cessando lentamente. A principal justificativa para esta restituição do FSC nos ratos, é que estes animais possuem o polígono de Willis completo (CHOY et al., 2006; FARKAS et al., 2007).

Figura 2 – Fases da Hipoperfusão



As sucessivas fases da hipoperfusão encefálica crônica induzida pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns em ratos. As fases são determinadas a partir dos graus de perfusão cerebral, estado metabólico e atividade eletrofisiológica. Abreviações: 2VO: oclusão bilateral permanente das artérias carótidas comuns; FSC: fluxo sanguíneo cerebral. Fonte: Adaptado de FARKAS et al. (2007).

No entanto, o FSC em ratos 2VO não é idêntico ao observado durante o envelhecimento ou a demência em humanos. Nestes animais, após a indução de oclusão 2VO, o FSC cai drasticamente e, em seguida, começa a normalizar após cerca de 3 meses devido a mecanismos compensatórios e adaptativos. O espaço de tempo no qual a hipoperfusão cerebral em ratos 2VO é comparável ao envelhecimento em humanos é de 8 semanas a 12 semanas, um período relativamente curto (CHOY et al., 2006).

Após a realização da oclusão 2VO em ratos, o FSC no córtex cerebral e na substância branca reduz aproximadamente 35 a 45% em relação aos controles, enquanto que no hipocampo esta redução se aproxima a 60% (OHTA et al., 1997; OTORI et al., 2003). Os valores do FSC se recuperam gradualmente em uma semana, mas permanecem significativamente mais baixos do que os valores dos controles durante quatro semanas após a indução 2VO (OTORI et al., 2003).

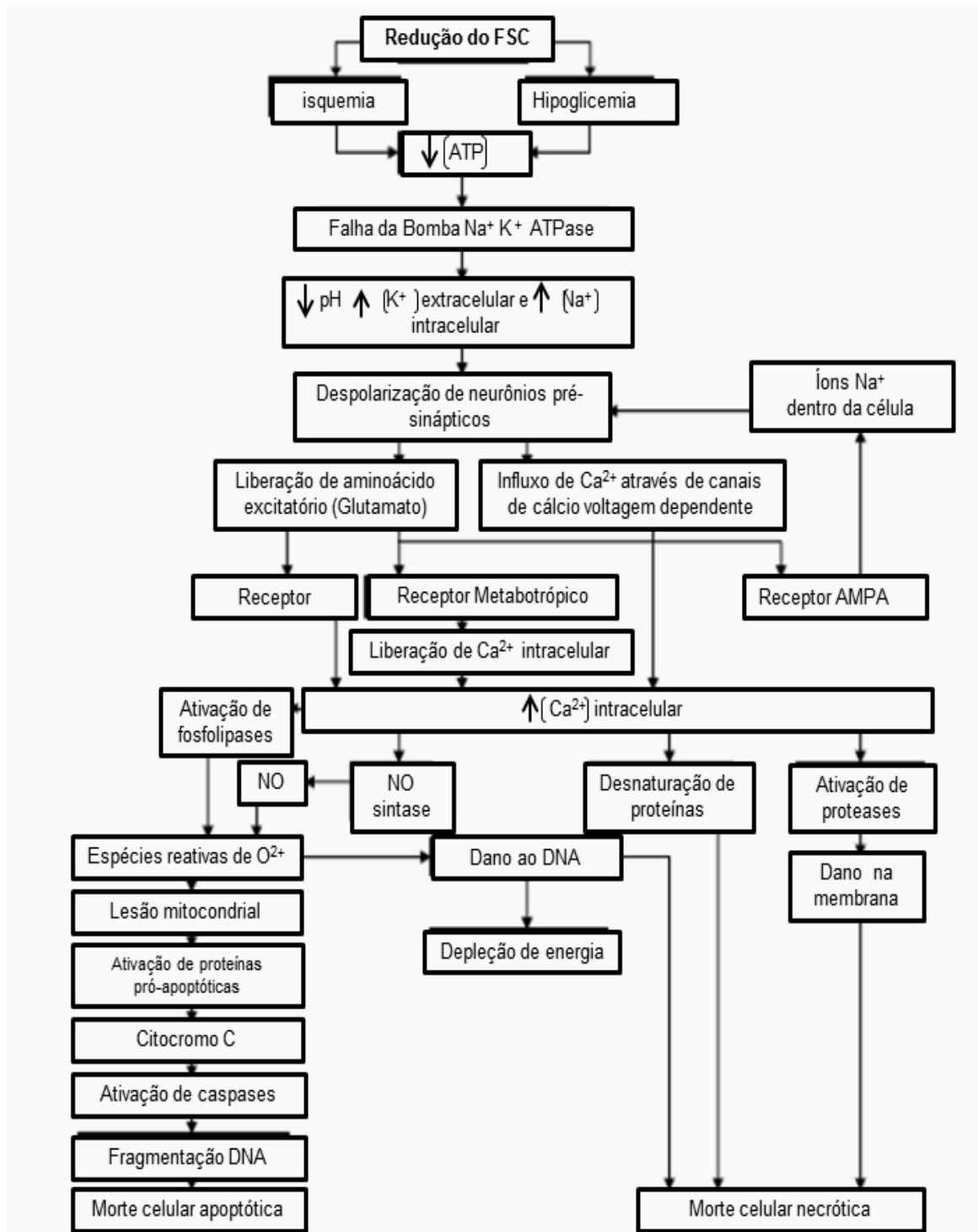
O tipo predominante de morte celular neuronal na HEC não está bem esclarecido. Na lesão cerebral isquêmica, ambos os modos de morte celular (necrose e apoptose) ocorrem, sendo determinada pela severidade e tempo da lesão (HARUKUNI & BHARDWAJ, 2006). O fator determinante para o modo de morte neuronal é a concentração intracelular de ATP. Como uma abordagem básica, a apoptose ocorre na presença de ATP, enquanto que a necrose é tipicamente caracterizada pela falta do substrato (UEDA & FUJITA, 2004). Uma depleção súbita de ATP e fosfocreatina foi detectada no córtex cerebral de 5 - 10 min após a indução

2VO e persistiu, embora em menor grau até duas semanas (BRIEDE & DUBURS, 2007; PLASCHKE, 2005). Estes dados sugerem que a morte celular por necrose, muito provavelmente, predomina na fase aguda de 2VO, enquanto que a morte neuronal tardia pode ser apoptótica (BENNETT et al., 1998). Estes dados levam a questionar se a lesão neuronal observada após a indução pelo modelo 2VO é induzida pela fase inicial, isquêmica, ou se é o resultado de uma neurodegeneração de longa duração causada pela fase crônica, oligêmica da 2VO (FARKAS et al., 2007).

A cadeia de eventos que levam à morte celular neuronal na HEC começa com depleção energética, devido à redução do fluxo sanguíneo e a consequente hipóxia e hipoglicemia (BRIEDE & DUBURS, 2007; PLASCHKE, 2005). Na lesão cerebral isquêmica a perda de ATP é seguida pela disfunção das bombas iônicas dependentes de energia, despolarização dos neurônios, e a geração de espécies de reativas de oxigênio (ROS), que se tornam letais para os neurônios quando em altas concentrações (Figura 3). Considera-se atualmente que o modelo 2VO cria uma condição permanente de isquemia/oligemia grave o suficiente para sustentar o estresse oxidativo contínuo (provavelmente em ambas as fases aguda e crônica), que poderia muito bem ser a razão para o dano neuronal persistente e progressivo (FARKAS et al., 2007).

Tendo em vista a constatação de mudanças nas taxas de perfusão cerebral ao longo do tempo no modelo 2VO, diversos estudos foram desenvolvidos no interesse de estabelecer se a deficiência de aprendizagem desenvolve-se exclusivamente devido à queda brusca do fluxo sanguíneo na fase aguda ou piora na fase crônica da 2VO. Déficits de memória de curto prazo, memória de trabalho, e memória espacial de longo prazo também são observados 8 semanas após HEC (SHU et al., 2013). No modelo 2VO uma disfunção colinérgica central e o aumento do dano oxidativo está correlacionado com a aprendizagem espacial e perda de memória e disfunção da memória de trabalho (XI et al., 2014).

Figura 3 – Cadeia de eventos após redução do fluxo sanguíneo cerebral



Cascata neurotóxica envolvida na Isquemia Cerebral. FSC: fluxo sanguíneo cerebral; ATP: adenosina trifosfato; NO: óxido nítrico; Ca²⁺: cálcio. Fonte: Adaptado de WHALGREN & AHMED (2004).

A perda dos corpos celulares e junções sinápticas dos neurônios são algumas evidências da neurodegeneração. Não há perda aparente de neurônios após a primeira semana da cirurgia 2VO nos ratos. No entanto a partir da segunda semana começa a ser observado dano hipocampal, que continua a aumentar no decorrer da HEC. Observou-se que 12 semanas após a cirurgia 2VO havia dano nas células neuronais e redução da densidade celular no córtex cerebral e na região CA1 do hipocampo. Mas não há somente dano e perda dos neurônios como também alteração das ramificações dendríticas e nas junções sinápticas. Esse fato foi sugerido pela constatação da redução da proteína associada à microtúbulo-2, que é uma fosfoproteína do citoesqueleto envolvida na ramificação dendrítica, remodelação e plasticidade. A sinaptofisina, que se encontra nas vesículas sinápticas, também diminuiu após a HEC (FARKAS et al., 2007; MENDEZ-OTERO et al., 2009; PIMENTEL-COELHO et al., 2013 XI et al., 2014). Mecanismos inflamatórios e imunes desempenham um papel importante na progressão das lesões em substância branca induzida pela HEC (MIKI et al., 2009). Um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pode resultar em déficits de perfusão regionais e manutenção deficiente do fluxo em nível crítico para tratos de substância branca (LIU et al., 2013).

Danos físicos, isquemia ou a liberação inapropriada de neurotransmissores são geralmente acompanhadas por eventos como o influxo de Ca^{2+} e o início de uma cascata de eventos que levam à ativação de várias vias de sinalização celular que estão associadas à neurodegeneração. Por outro lado, os danos celulares também podem acarretar na ativação de vias que culminam na produção e ativação de fatores que estão envolvidos na recuperação celular (BHAT et al., 2004 SAPOLSKY, 2001; ZHAO et al., 2014b).

3.3 SISTEMA PURINÉRGICO

Na isquemia cerebral os derivados de adenina são liberados em grandes quantidades (PIMENTEL et al., 2011). O ATP é liberado a partir de células danificadas e atua tanto como um fator citotóxico quanto um mediador pró-inflamatório, sendo um sinal universal de "alerta" (FRANKE et al., 2012) quando em níveis elevados (micromolar e milimolar). O ATP e seus produtos de degradação ADP, AMP e adenosina, assim como outros nucleotídeos e

nucleosídeos constituem um conjunto de moléculas que agem como mensageiros das células, exercendo uma variedade de efeitos sobre os mais diversos tecidos e sistemas (BURNSTOCK et al., 2011).

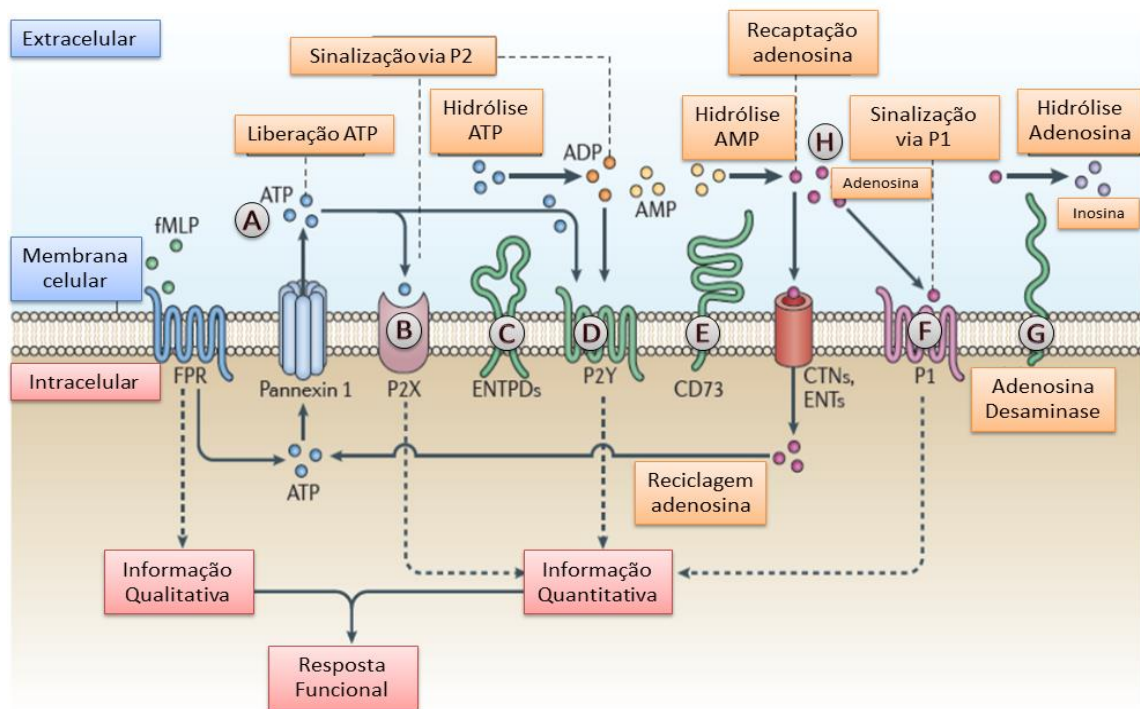
O ATP, molécula sinalizadora do sistema purinérgico, é um nucleotídeo trifosfatado existente em todas as células e está envolvido na regulação de vários processos fisiopatológicos no meio extracelular. Este nucleotídeo é armazenado em vesículas nas terminações sinápticas e, após despolarização neuronal, é liberado atuando em receptores específicos na membrana pós-sináptica, denominados purinoreceptores (BURNSTOCK, 1972; 1976; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). O ATP pode ser liberado juntamente com vários neurotransmissores, tais como acetilcolina, glutamato, noradrenalina, serotonina e ácido γ -amino butírico (GABA) (BURNSTOCK, 2004; VERKHRATSKY et al., 2009; ZIMMERMANN, 2008). A liberação de ATP nos terminais pré e pós-sinápticos pode ocorrer como um mecanismo fisiológico ou em resposta a danos celulares, como a hipóxia e outras injúrias (BURNSTOCK, 2006).

Além disso, o ATP pode ser liberado por exocitose pelas células neuronais e não neuronais através de transportadores que se ligam a esse nucleotídeo ou via canais de conexina ou panexina (SABIROV & OKADA, 2005). Os canais de panexina-1 são responsáveis pela liberação de ATP, controlando a permeabilidade da membrana durante os mecanismos de apoptose (LOCOVEI et al., 2006).

O ATP pode atuar tanto como transmissor quanto como co-transmissor, agindo através de purinoreceptores do tipo P2, divididos em duas famílias distintas de acordo com a base do mecanismo de ação, farmacologia e clonagem molecular, sendo eles P2X e P2Y (BURNSTOCK et al., 2011; BURNSTOCK & KENNEDY, 1985). Como este nucleotídeo não é capaz de atravessar as membranas biológicas por difusão ou transporte ativo, o controle de sua concentração extracelular é realizado pela ação das ectonucleotidasas que catalisam sua conversão até adenosina (Figura 4) (BONAN et al., 2000; GODING & HOWARD, 1998) (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006). A adenosina está envolvida na síntese de ácidos nucléicos, metabolismo de aminoácidos, modulação do estado metabólico da célula e, diferente do ATP, não é considerada um neurotransmissor clássico, uma vez que não é armazenada em vesículas ou liberada por exocitose, sendo então classificada como neuromodulador (FREDHOLM, 2007; SHEN et al., 2012; VON LUBITZ et al., 1999). Devido a esse papel de neuromodulação, ela está envolvida na regulação de importantes

mecanismos no SNC, como cognição e memória (RIBEIRO et al., 2003; SHEN et al., 2012; WEI et al., 2011).

Figura 4 – Representação dos componentes do sistema purinérgico.



Componentes da Sinalização Purinérgica: ATP liberado extracelularmente (A); Receptor tipo P2X (B); E-NTPDase (C); Receptor tipo P2Y(D); E-5'-NT (E); Receptor tipo P1 (F); E-ADA (G); Adenosina formada a partir do ATP via E-5'-NT e E-NTPDase (H); Fonte: Adaptado de JUNGER (2011).

A adenosina está envolvida na síntese de ácidos nucleicos, metabolismo de aminoácidos, modulação do estado metabólico da célula e, diferente do ATP, não é considerada um neurotransmissor clássico, uma vez que não é armazenada em vesículas ou liberada por exocitose, sendo então classificada como neuromodulador (FREDHOLM, 2007; SHEN et al., 2012; VON LUBITZ et al., 1999). Devido a esse papel de neuromodulação, ela está envolvida na regulação de importantes mecanismos no SNC, como cognição e memória (RIBEIRO et al., 2003; SHEN et al., 2012; WEI et al., 2011).

No sistema nervoso central (SNC), a adenosina desempenha um papel crítico no controle de uma variedade de funções neurais (BOISON et al., 2011; JONES, 2009; SEBASTIÃO et al., 2000). Através da ativação dos seus receptores acoplados à proteína G, a adenosina participa da regulação de vários processos fisiológicos e patológicos, tais como na regulação do sono, estado geral de excitação e atividade, a excitabilidade neuronal local, e a adequação do fluxo de sangue cerebral conforme a demanda energética. Além disso, a manipulação da sinalização de adenosina pode representar um potencial terapêutico em doenças neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, e em doenças psiquiátricas tais como a esquizofrenia e o autismo (RIBEIRO et al., 2003). Como um neuromodulador endógeno cerebral, os níveis extracelulares de adenosina estão aumentados sob condições hipóxico-isquêmicas (CHEN et al., 2014).

Existem duas fontes de adenosina extracelular. Primeira, a adenosina extracelular pode ser derivada a partir do transporte de adenosina gerada intracelularmente. Segunda e predominante, a adenosina pode ser formada a partir da hidrólise extracelular dos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) através da cascata catalítica das ectonucleotidases (ANTONIOLI et al., 2013; HASKO et al., 2005).

Os nucleotídeos encontram-se presentes em altas concentrações no interior das células em relação ao meio extracelular, o que é característico de moléculas sinalizadoras. Uma vez liberados no meio extracelular os nucleotídeos interagem com receptores purinérgicos e esta sinalização é finalizada pela ação de enzimas, conhecidas genericamente como ectonucleotidases, que hidrolisam os nucleotídeos até os seus respectivos nucleosídeos no meio extracelular (BATTASTINI et al., 2011).

As ectonucleotidases encontram-se ancoradas na membrana celular, possuindo seu sítio ativo voltado para o meio extracelular ou presentes na forma solúvel no meio intersticial. As ectonucleotidases são constituídas por quatro famílias de enzimas: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPs), fosfatases alcalinas (APs) e Ecto-5'-nucleotidases (E-5'-NTs) (BONAN, 2012; SCHETINGER et al., 2007; ZIMMERMANN et al, 2012a). Outra ectoenzima também importante no metabolismo purinérgico é a adenosina deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), responsável pela desaminação do nucleosídeo adenosina (ZIMMERMANN et al, 2012a; ZIMMERMANN, 2000).

As E-NTPDases hidrolisam tanto ATP como ADP (adenosina difosfato), formando AMP (adenosina monofostato) na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (BIGONNESSE et al., 2004; ROBSON et al., 2006; ROSEMBERG et al., 2010). Os membros da família das E-NTPDases são codificados por oito genes diferentes. Quatro membros desta família de enzimas são localizados na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular (1, 2, 3 e 8) (AUGUSTO et al., 2013; BRAUN et al., 2000; BIEDERBICK et al., 2000; KACZMAREK et al., 1996; MULERO et al., 1999; ROBSON et al., 2006; SÉVIGNY et al., 2000). Os demais (4, 5, 6 e 7) possuem localização intracelular (WANG; GUIDOTTI, 1998).

As E-5'-NT estão amplamente distribuídas no SNC (BONAN et al., 1998). Encontram-se predominantemente expressas nas células da glia, mas várias evidências têm mostrado que também estão presentes nos neurônios (COGNATO et al., 2010; SILVA et al., 2012). No hipocampo estão localizadas pré e pós-sinapticamente (AUGUSTO et al., 2013). São responsáveis pela desfosforilação do AMP, sendo por isto, consideradas as principais enzimas responsáveis pela formação de adenosina (ZIMMERMANN et al., 2012b). Estão presentes na regulação da permeabilidade vascular e equilíbrio inflamatório em múltiplos órgãos, incluindo o cérebro (NIEMELÄ et al., 2008). Sua atividade encontra-se aumentada em astrócitos, células microgliais (BRAUN et al., 1998) e em sinaptossomas de hipocampo após isquemia focal e reperfusão (SCHETINGER et al., 1998). Trinta dias após a indução de HEC, observou-se um aumento na expressão e atividade da E-5'-NT no corpo caloso de ratos. Estes dados sugerem que esta enzima pode ter um importante papel no desenvolvimento das doenças neurológicas associadas com desordens imunes e inflamatórias através da modulação dos níveis extracelulares de adenosina (HOU et al., 2015).

A adenosina desaminase (ADA) é uma enzima que participa do catabolismo das purinas (SINGH & SHARMA, 2000). No cérebro, localiza-se principalmente no citosol, podendo também ser encontrada em neurônios e sinaptossomas (FRANCO et al., 1998). O complexo ADA-proteína recombinante constitui uma ecto-ADA, sendo importante na regulação das concentrações extracelulares de adenosina catalisando a desaminação deste substrato e a formação de inosina (FRANCO et al., 1997). A deficiência de ADA acarreta em um aumento dos níveis de adenosina extracelular, o que pode contribuir para condições patológicas (ALDRICH et al., 2000).

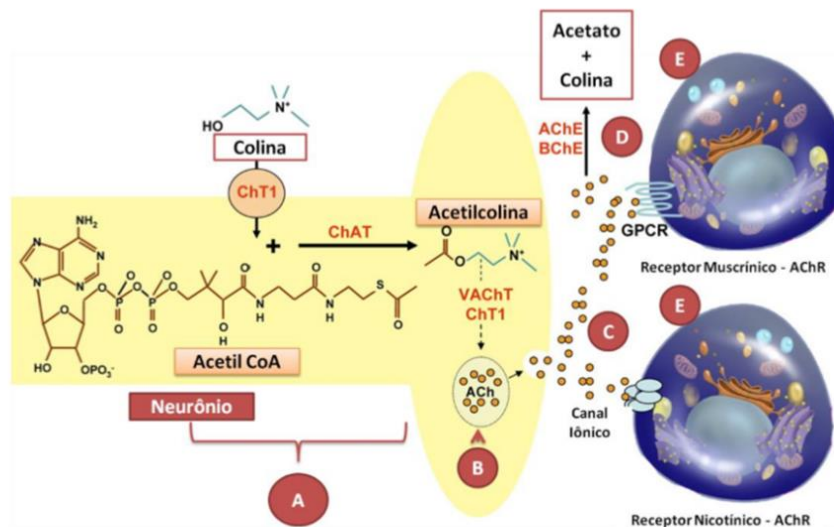
3.4 SISTEMA COLINÉRGICO

O sistema colinérgico está presente em várias funções vitais (MESULAM et al., 2002b). A acetilcolina (ACh) desempenha um papel fundamental no SNC e está relacionada à modulação da resposta neuronal por estímulos sensoriais (MURPHY & SILLITO, 1991), ao comportamento, participação em circuitos neurais do controle do sono, aprendizado e memória (SHAKED et al., 2008), à organização cortical do movimento e ao controle do fluxo sanguíneo cerebral (MORETTO et al., 2004; NESS, 2014). Ela é sintetizada nos neurônios pré-sinápticos, a partir da acetilcoenzima A (acetil-CoA) e da colina, pela colina acetiltransferase (ChAT) (CRAWFORD et al., 1982; ECKENSTEIN & THOENEN, 1982). Após a síntese é transportada dentro de vesículas para os terminais dos axônios colinérgicos, onde é armazenada (PICCIOTTO et al., 1998) (figura 5).

A acetil-CoA usada na síntese de ACh é formada na matriz mitocondrial após o metabolismo de transformação da glicose em piruvato. A colina provém diretamente da reciclagem da ACh, que é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) na fenda sináptica, ou a partir da fosfatidilcolina. Essas duas fontes de colina são particularmente importantes para o SNC, pois a colina presente no plasma não ultrapassa a barreira hematoencefálica. A liberação de ACh depende das variações no potencial elétrico das membranas dos terminais nervosos e este processo é dependente da concentração de cálcio intracelular (ODA, 1999; PICCIOTTO et al., 1998).

Ao ser liberada na fenda sináptica, interage com receptores específicos causando despolarização e propagação do potencial de ação na célula pós-sináptica. Seus efeitos são mediados pela ativação de receptores nicotínicos e muscarínicos (CHOY et al., 2006; SOREQ & SEIDMAN, 2001; VAN DER ZEE et al., 1989). A ACh que permanece na fenda sináptica é degradada pelas colinesterases que a hidrolisam em colina e acetato, eliminando os efeitos desencadeados por esta molécula. Grande parte da colina resultante é captada pelo terminal do axônio colinérgico por um transportador de colina e utilizada na síntese de novo (MESULAM et al., 2002a; SOREQ & SEIDMAN, 2001).

Figura 5 – Componentes do Sistema Colinérgico



Acetilcolina: Produção, liberação, degradação e interação com receptores colinérgicos. Fonte: Adaptada de Shah, et al. (2008).

Na fenda sináptica, existem dois diferentes tipos de colinesterases, que hidrolisam a ACh (Figura 5) e são classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas, especificidade de inibidores e distribuição nos tecidos: a AChE e a butirilcolinesterase (BuChE). A AChE hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, presente principalmente nas sinapses dos SNC e periférico parassimpático e ainda junção neuromuscular; e a BuChE hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. Ambas as colinesterases são amplamente distribuídas no organismo (SOREQ & SEIDMAN, 2001).

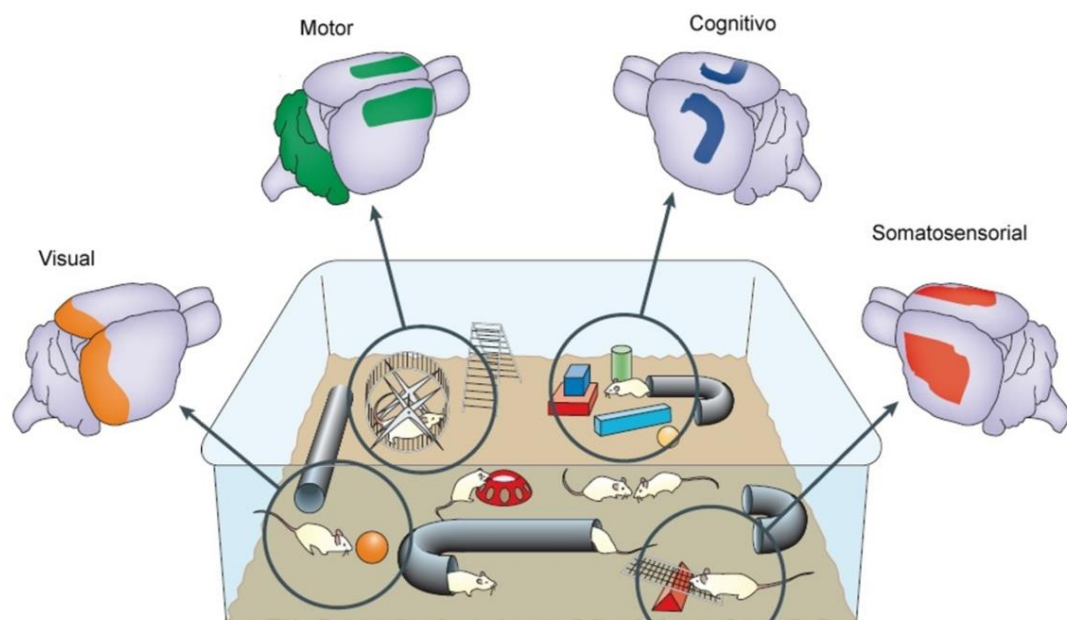
A AChE desempenha um papel essencial no mecanismo colinérgico, catalisando a hidrólise do substrato acetilcolina em acetato e colina (MASSOULIÉ et al., 2008). Esta enzima também pode modular funções não colinérgicas, tais como glutamatérgicas e dopaminérgicas (SHAKED et al., 2008; SOREQ & SEIDMAN, 2001) Há alguns anos, uma nova propriedade foi identificada para as enzimas AChE e BChE: a atuação dessas enzimas como marcadores inflamatórios (DAS, 2007). A atividade dessas enzimas no plasma e nos tecidos é elevada em pacientes com DA (GEULA & MESULAM, 1995; GIACOBINI, 2003; PERRY et al., 1998) e diabetes mellitus e, como resultado deste aumento, o nível de ACh no plasma e tecidos é reduzido (ABBOTT et al., 1993; SRIDHAR et al., 2005).

3.5 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Estratégias para minimizar os efeitos do envelhecimento sobre a memória e, assim, garantir a qualidade de vida, têm sido empregadas em diversos estudos nessa área, sendo o enriquecimento ambiental (EA) uma delas (ARAI & FEIG, 2011; NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006). O EA é um modelo experimental em que os animais são condicionados a um ambiente que potencializa as interações sociais e desenvolve a estimulação motora e sensorial (Figura 6) (SEGOVIA et al., 2010).

A exposição de animais ao EA há muito tempo tem demonstrado benefícios cognitivos tanto em animais saudáveis quanto enfermos, jovens ou idosos. Esses efeitos foram inicialmente estudados na década de 1960, em que foi observado o maior peso cerebral e maior espessura do córtex de ratos estimulados pelo ambiente. Posteriormente, esses estudos visaram a aspectos mais sutis, buscando o envolvimento de fatores como o aumento de neurotransmissores, altos níveis de neurotropinas e alterações nos receptores (DIAMOND, 2001).

Figura 6 – Desenho esquemático das áreas estimuladas pelo enriquecimento ambiental



Fonte: Adaptado de NITHIANANTHARAJAH & HANNAN (2006).

O enriquecimento pode ser utilizado tanto para aumentar o conforto dos animais utilizados nos experimentos como também para assegurar que resultados científicos de boa qualidade sejam obtidos (SHERWIN, 2004). Além de melhorar o bem-estar, o EA também parece melhorar a habilidade cognitiva. Ratos que tem experimentado o enriquecimento tendem a ter melhor desempenho do que aqueles criados em ambiente padrão, especialmente em testes de cognição (LEGGIO et al., 2005). Alguns trabalhos utilizam a manutenção permanente dos animais neste ambiente, enquanto outros utilizam a estimulação prévia a um evento isquêmico (BELAYEV et al., 2003; BIERNASKIE & CORBETT, 2001).

Sob a perspectiva da prevenção primária, o EA que envolve a combinação de aumento da interação social, exercício físico e exposição contínua a tarefas de aprendizagem demonstrou ter um efeito protetor em modelos animais de HEC. O mecanismo pelo qual isso acontece ainda não foi esclarecido, embora se propõe que possa ser devido ao fato de reduzir o estresse oxidativo e a lipoperoxidação no hipocampo, ou ao recuperar a plasticidade sináptica (CECHETTI et al., 2012a; CECHETTI et al., 2012b; YANG et al., 2015b; ZHU et al., 2011). Além disso, estudos relacionam a melhora nos déficits de memória à mudanças neuroquímicas e fisiológicas do cérebro como o aumento dos níveis de proteínas pré-sinápticas no hipocampo e neocórtex de camundongos (LAMBERT et al., 2005).

Ainda, paralelo à regulação da acetilação de histonas e alguns fatores de transcrição relacionados à neuroproteção especula-se que a melhora cognitiva induzida pelo EA em ratos hipoperfundidos possa resultar da regulação positiva de neuroproteção endógena. O recrutamento de vias neuroprotetoras endógenas pode representar um alvo possível para as intervenções terapêuticas em doenças relacionadas com HEC tais como a DA e DV (YANG et al., 2015a).

No entanto, a magnitude destes efeitos e a sua persistência após o término do enriquecimento varia acentuadamente entre os estudos. O uso de diferentes protocolos de enriquecimento, provavelmente, desempenha um papel importante nesta variação. Em ratos submetidos a 4 semanas de enriquecimento durante a idade adulta os resultados foram semelhantes ao resultado dos ratos submetidos ao enriquecimento pós-desmame quando testados na mesma tarefa. Os autores concluíram que um período de enriquecimento mínimo é necessário para induzir efeitos comportamentais sobre a tarefa do campo aberto, bem como os efeitos comportamentais de enriquecimento podem persistir pelo menos parcialmente por

muitos meses após a sua cessação e o grau desta persistência parece ser maior em animais expostos a maiores tempos de enriquecimento (AMARAL et al., 2008).

Com o aumento da expectativa de vida no mundo, as doenças cerebrovasculares são consideradas uma questão de saúde pública. Com isso, surge o crescente interesse em encontrar novas abordagens para preservar a saúde cerebral. Sabendo-se da relação do sistema purinérgico e colinérgico com a modulação de funções do sistema nervosa central e dos benefícios do EA, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de ectonucleotidases e da acetilcolinesterase em sinaptossomas de córtex cerebral e hipocampo de ratos 2VO expostos previamente ao EA.

4 MANUSCRITO CIENTÍFICO

A metodologia, os resultados e a discussão inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscrito científico. O manuscrito está disposto na mesma forma a qual será submetido à revista científica *Cell Biochemistry and Function*.

Environmental enrichment effects in the activity of E-NTPDase, E-5'-NT, E-ADA and AchE in hippocampus and cerebral cortex of rats with chronic cerebral hypoperfusion

Kelly B. Trelles^a, Ana Paula R. Martini^c, Livia G. Castilhos^b, Jader B. Ruchel^a, Juliana S. de Oliveira^a, Fátima H. Abdala^b, Luana P. Magni^a, Alessandra G. Manzoni^d, Daniela B.R. Leal^{ab}, Jeandre Augusto Jaques^{ae*}

^a Graduate Program in Biochemistry Toxicology, Department of Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^b Program Graduate Diploma in Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^c Program Graduate Diploma in Rehabilitation Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Department of Biochemistry, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

^e Postgraduate Diploma in Pharmacy Program, Center for Biological and Health Sciences, Foundation Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil.

*** Corresponding author:**

Jeandre Augusto dos Santos Jaques, (jeandreaugusto@hotmail.com; jeandre.jaques@ufms.br)

Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil.

Phone: +55.67.3345.7958

ABSTRACT

Chronic cerebral hypoperfusion (CCH) has been associated with the development and progression of dementia. Environmental enrichment (EE) has been widely used in research as a non-pharmacological alternative in the prevention of damage caused by senescence. Here, we use the permanent occlusion model of common carotid arteries (2VO) to investigate the

possible effects of EE in the purinergic and AChE enzyme system. Wistar male rats (n = 40) were used, 20 exposed to EE for 30 days before 2VO and 20 maintained in a standard environment (SE). After surgery, were divided animals into four groups: 2VO/ EE (n = 12), sham/ EE (n = 8); 2VO/ SE (n = 12) and sham/ SE (n = 8). We analyzed *ex vivo* enzyme activity of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase; EC 3.6.1.5), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT; EC 3.1.3.5), ecto-adenosine deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4) and acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) in synaptosomes of cerebral cortex and hippocampus 30 days after 2VO. An increase in AMP hydrolysis was observed only in hippocampus. The increase of AMP hydrolysis in the 2VO/EE group was not as pronounced as 2VO/SE, which might indicate that EE prevented the exacerbated damaged in the brain tissue which resulted in a lower response. An increase in the AChE activity in cortex of group 2VO/EE and in hippocampus of 2VO/SE group. Thus, we suggest that the damage caused by CCH in the chronic phase, lead to increased levels of adenosine in the extracellular space, which can be modulated by exposure to EE especially in the hippocampus.

KEY WORDS: Chronic cerebral hypoperfusion; senescence; dementia; environmental enrichment; purinergic system; acetylcholinesterase

INTRODUCTION

Chronic cerebral hypoperfusion (CCH) is a common event in elderly people. It is associated with impairments of cognitive function in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) and vascular dementia (VD)^{1, 2}. The overall reduction in cerebral blood flow (CBF) induces hypoxia, ischemia, and damage resulting from it³. Inflammatory reactions may also contribute to cognitive impairment and neuronal damage occurring in various regions of the brain including the hippocampus and cerebral cortex⁴⁻⁶.

CCH is also responsible for many pathophysiological changes in the brain, such as metabolic disorders, protein synthesis abnormalities, neuronal injury and glial activation^{7, 8}. Researches in the last decade suggest that CCH can promote neurodegeneration in the neuronal failure energy, production of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines by activated microglial cells which, in turn, damage neurons and contribute to the white matter lesions^{5, 9-12}.

A permanent occlusion model of common carotid arteries in rats (model 2 vessels - 2VO) has been applied to the study of dementias⁵. In order to increase the survival rate of the animals, it was developed the modified CCH model. It is performed with an interval of 1 week to avoid an abrupt reduction in cerebral blood flow (CBF)¹³. Some changes in the hippocampus may appear 4 weeks after the event, with the increase of astrocytes density and loss of CA1 area cells⁵.

The cholinergic dysfunction is well documented in VD, even in the presence of associate AD¹⁴ and plays a crucial role in the progression of neurodegeneration¹⁵. This dysfunction may be found in hippocampus and cerebral cortex of rats with CCH induction^{6, 16-18}. Cholinergic neurons that project into the hippocampus play a critical role in learning and memory function, and the cholinergic terminals in the presynaptic membrane are sensitive to ischaemic insults¹⁹. Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) can be used as a marker of cholinergic function, since changes in enzyme activity may indicate changes in the availability of ACh and its receptors¹⁴.

Furthermore, there is increasing evidence for the involvement of purinergic signaling in neurodegenerative diseases²⁰. Included in this system are nucleosides and nucleotides, purinergic receptors and ectoenzymes such as ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase; EC 3.6.1.5) and ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT; EC 3.1.3.5). These enzymes are involved in the hydrolysis of ATP to adenosine, which is subsequently deaminated to inosine by ecto-adenosine deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4)²¹⁻²². As an endogenous neuromodulator, extracellular adenosine is markedly increased in hypoxic/ischemic conditions²³. Adenosine is involved in the regulation of many functions of the central nervous system (CNS) such as cognition and memory²⁴⁻²⁶. Furthermore, it is suggested that E-5'-NT plays a protective role in development of CCH by regulating the expression of proinflammatory cytokines and the activation of glial cells²⁷. Besides, it is also implicated in the regulation of normal and abnormal behavior²⁸.

From the perspective of primary prevention, the enriched environment (EE), which involves the combination of increased social interaction, physical exercise and exposure to continuous learning tasks is shown to have a protective effect in animal models of CCH^{29, 30}. The stimulus exposure time is very important. In very short periods, EE does not promote the same results observed over prolonged periods in both sick and healthy animals³⁰. The mechanism by which this happens is not clear, although it is proposed to be due reduced

oxidative stress and lipid peroxidation in the hippocampus, or recovery of synaptic plasticity³¹⁻³⁴. Knowing the influence of cholinergic and purinergic systems in CNS lesions, in the present study we evaluated the effects of pre-injury EE exposure in rats with induced CCH in the activity of acetylcholinesterase and purinergic ectoenzymes activities in synaptosomes of cerebral cortex and hippocampus.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (8 - 10 weeks old, weighing 200 - 250g) were used to carry out the experiments. Animals were randomly divided into four groups, as follows: (1) 2VO operated with enriched environment (2VO + EE; n=12); (2) sham operated with enriched environment (sham + EE; n=8); (3) 2VO operated with standard environment (2VO + SE; n=12); (4) sham operated with standard environment (sham + SE; n=8). The animals were kept on cages (50 x 60 x 22 cm) containing 4 animals, and on a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 07:00 and off at 19:00), at a temperature of 22 ± 2 °C (55 ± 5 % of humidity) with free access to food and water. All rats were adapted on cages conditions during 7 days before start the experiment. After surgery, all groups were kept on standard conditions. Furthermore, this investigation was approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our university (n. 8848220615).

Modified two-vessel occlusion protocol 2VO

Rats were anesthetized for surgery with ketamine (60 – 80 mg/kg)/ xylazine (15 mg/kg) i.p. and placed in supine position. An anterior neck ventral midline incision was made and the common carotid arteries were then exposed and gently separated from the vagus nerve. Arteries were occluded with 5-0 silk suture. The right common carotid artery was first occluded and the wound was sutured. After one week, a new incision was made and the left carotid was occluded. Animals received a topical application of 10% lidocaine in the incision and analgesic medication was administered orally each 4h (acetaminophen 50mg/ 250g body weight) during 3 days³² 37.5 ± 0.5 °C to maintain their body temperature, until recovery from anesthesia¹³. Sham-operated controls received the same surgical procedures without carotid

artery clamping. During the interval between the occlusion of right and left carotid arteries, animals were maintained in their cages.

Environmental enrichment

The boxes contained objects such as balls, PVC pipes, cardboard rolls, legos of different shapes and sizes and pvc curve with cover to hide. Four objects were placed per box and changed every 3 days to maintain the stimulus. All animals from the EE group were exposed to the same objects. The objects were organized so that all the animals were exposed to the same objects. The rats were kept full-time in enriched environment cages for 30 days prior to surgery (adapted from³⁵ Lee et al, 2013). After surgery, all animals were submitted to a standard environment.

Synaptosome preparation

Rats were anesthetized with isoflurane and then decapitated to obtain the cerebral cortex and hippocampus. These structures were homogenized in 10 volumes of ice-cold Medium I, which consisted of 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA and 5 mM HEPES, with a pH of 7.5 in a motor driven Teflon-glass homogenizer and centrifuged at 1,000 g at 4 °C for 15 min to obtain the supernatant 1 (S1), as described by Marisco and colleagues (2013)³⁶. The synaptosomes were isolated using a discontinuous Percoll gradient³⁷. The S1 was layered on the discontinuous Percoll gradient (23, 15 and 7 % in 320 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.25 mM DTT, 5 mM Tris, pH 7.4) and, afterwards, centrifuged at 31,000 g at 4 °C for 5 min to obtain the synaptosomes. After the collection from the interfaces between the Percoll layers 15 and 23 %, the synaptosomes were washed with pre-gassed (carbogen) cerebrospinal fluid (aCSF) containing: 22 mM NaH₂CO₃, 1.8 mM MgCl₂, 129 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 3.5 mM KCl, 10 mM D-glucose, pH 7.4. The pellet was suspended in an isosmotic solution and the final protein concentration was adjusted to 0.4 – 0.6 mg/mL. Synaptosomes were prepared fresh daily, maintained at 0 – 4 °C throughout the procedure and used for enzymatic assays.

Protein determination

Protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford using serum albumin as standard³⁸.

Enzyme assays

E-NTPDase and E-5'-NT activities

E-NTPDase assay was carried out in a reaction containing 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose and 45 mM tris-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µL as previously described³⁹. Twenty microliters of synaptosomal fraction (8 – 12 µg of protein) were added to the reaction and pre-incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to obtain a final concentration of 1.0 mM and incubation proceeded for 20 min in either case. E-5'-nucleotidase activity⁴⁰ was determined in a reaction containing 10 mM MgSO₄ and 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, in a final volume of 200 µL. Twenty microliters of enzyme preparation (8 – 12 µg of protein) were added to the reaction and pre-incubated at 37 °C for 10 min. For the E-5'-NT activity the reaction was initiated by the addition of AMP to a final concentration of 2.0 mM and the incubation was proceeded for 20 min. In both activities enzymes, the reaction was stopped by the addition of 200 µL of 10 % trichloroacetic acid (TCA) The tubes were chilled on ice for 10 min and the released inorganic phosphate (Pi) was assayed, as described previously Chan e col. (1986)⁴¹ using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard. Controls were carried out by adding the synaptosomal fraction after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. All samples were run in duplicate. Enzyme activities are reported as nmol of Pi released/ min/ mg of protein.

E-ADA activity

ADA activity of synaptosomal fraction was determined as previously described Giusti & Galanti (1984)⁴² based on the direct measurement of ammonia formation, produced when ADA acts in the presence of adenosine. The samples were added to the reaction mixture containing 21 mM of adenosine, pH 6.5, and the incubation was carried out for 60min. at 37 °C. The eaction was stopped by adding 106 mM and 167.8 mM sodium nitroprussiate and hypochlorite solution. Ammonium sulfate 75 µM was used as ammonium standard. The protein content used for this experiment was adjusted to 0.4 – 0.6 mg/mL. Results are expressed as units of ADA activity/ mg protein (U/ mg of protein). One unit of ADA is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of ammonia/ min from adenosine at standard assay conditions.

AChE Activity

AChE enzymatic assay was determined by the method of Ellman et al.⁴³ with slight modification by Rocha et al.⁴⁴. The reaction mixture (2 mL of final volume) contained 100 mM K⁺-phosphate buffer, pH 7.5, and 1 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The method is based on the yellow anion formation, 5-thio-2-nitrobenzoic acid, measured by absorbance at 412 nm during 2 min incubation at 25°C. The enzyme was pre-incubated for 2 min. The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide (AcSCh). All samples were run in duplicate or triplicate and the enzyme activity is expressed as μmol of AcSCh hydrolyzed/ h/ mg of protein.

Statistical Analysis

Data were analyzed by the Kruskal–Wallis test and one-way ANOVA when appropriate. *Post hoc* analyses were carried out by the Tukey's or Dunn's test, when indicated. Differences were considered significant when probability was $P < 0.05$. A $P < 0.05$ was considered significant. All data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS

E-NTPDase hydrolysis of ATP

Figure 1A shows the activity of E-NTPDase in cortex of synaptosomes when ATP was used as substrate. The hydrolysis of ATP in the 2VO/EE group (20.53 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.6, n = 9) showed a significant increase when compared to sham/EE group (15.48 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.4, n = 6) ($P < 0.05$). Likewise, the hydrolysis was altered for the 2VO/SE group (21.19 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.3, n = 10) in relation to sham/SE (12.57 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.6, n = 8) ($P < 0.001$). In addition, Figure 1B shows the E-NTPDase activity for hippocampal synaptosomes. A significant increase in ATP hydrolysis in the 2VO/EE group (25.44 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 3.145; n = 9) and 2VO/SE group (23.36 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.707, n = 6) was observed in these two groups in relation to their respective sham groups

(sham/EE (9,087 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1,70 n = 6) sham/SE (17,34 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 4,644 n = 6). Among the groups exposed to EE and SE there was no significant difference in ATP hydrolysis both in cerebral cortex and hippocampus ($P > 0.05$).

E-NTPDase hydrolysis of ADP

Figure 2A shows that E-NTPDase hydrolysis of ADP in synaptosomes of the cerebral cortex was increased in the 2VO/SE group (13.5 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.12, n = 10) when compared to sham/SE (8.23 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.26, n = 8) ($P < 0.01$). This difference was not observed between the groups exposed to EE. In addition, the figure 2B shows the hippocampus synaptosomes hydrolysis for ADP. The result obtained showed an increased in ADP hydrolysis for 2VO/EE group (11.48 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.1, n = 9) ($P < 0.01$) when this group was compared to sham/EE (4.36 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.2, n = 6). A similar increase was observed in the 2VO/SE (11.98 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.706, n=10) in relation to sham/SE (7.620 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.424, n=6) ($P < 0.01$).

E-5'-NT activity

In the cerebral cortex, the E-5'-NT activity showed no significant statistic difference among the groups (Figure 3A). However, the AMP hydrolysis in hippocampal synaptosomes of rats 30 days after CCH induction showed to be altered (Figure 3B). The 2VO/EE group (12.57 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.1, n = 9) presented an increased in AMP hydrolysis when compared to sham/EE (8.90 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.0; n = 6) ($P < 0.05$). Besides that, an increased in AMP hydrolysis was observed in the 2VO/SE group (17.34 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 1.0; n = 7) compared to sham/SE (8.55 nmol of Pi/ min/ mg of protein; SEM = 2.02, n = 6) ($P < 0.01$). AMP hydrolysis in 2VO/EE (12,57 nmol of Pi/ min/ mg of protein SEM = 1,095 n = 9) and 2VO/SE (17,34 nmol of Pi/ min/ mg of protein SEM = 2,042 n = 7) groups also differed significantly in the hippocampus ($P < 0.05$).

E-ADA activity

E-ADA activity using adenosine as a substrate showed no significant difference between injury and sham groups both in the cortex ($P > 0.05$) and hippocampus ($P > 0.05$) (Figure 4).

AChE activity

Figure 5A shows AChE activity in synaptosomes of cerebral cortex increased in 2VO/EE group (8.93 μmol of AcSCh hydrolyzed/h/ mg of protein; SEM = 0,86 n = 10) compared to the sham/EE (7.34 μmol of AcSCh hydrolyzed/h/ mg of protein; SEM: 0.28; n= 7) ($P < 0.05$). The results for synaptosomes of hippocampus are shown in Figure 5B. The values obtained for AChE activity in 2VO/SE group (11.98 μmol of AcSCh hydrolyzed/h/ mg of protein; SEM = 1.7, n = 10) demonstrated to be increase when related to sham/SE group (7.62 μmol of AcSCh hydrolyzed/h/ mg of protein; SEM = 1.42, n = 8). Besides that a high tendency was note in the AChE activity in 2VO/EE group compared to the sham/EE ($p = 0.07$).

DISCUSSION

The 2VO model has been widely used to understand the damage caused by CCH^{5,45,46}. The event chains that eventually leads to neuronal cell death begins with the neuronal energy failure due to reduced blood flow and consequent hypoxia and ischemia⁵. In addition, several mechanisms, including the participation of purinergic signaling, have been proposed to be involved in this process²⁷.

E-NTPDase is express in various cell types including those of the nervous system. It is involved in pathophysiological processes with acute effects in cellular metabolism, adhesion, cell proliferation, differentiation and apoptosis, neurodegenerative disorders, among others⁴⁷. The increase in E-NTPDase activity (for ATP and ADP hydrolysis) in the hippocampus and cerebral cortex observed in 2VO rats may be related to changes in cell metabolism caused by hypoperfusion. The activity of ectonucleotidases involves the regulation of extracellular nucleotide levels released from the damaged tissue, which may play a role in post-ischemic control in cellular responses mediated by nucleotides⁴⁸. ATP is regarded as an important mediator in cerebral ischemia^{49, 50}. Xu et al⁵⁰ report that ATP released during neuronal damage increases the inflammatory effects of cytokines and prostraglandin E2 in astrocytes

and contribute to a chronic inflammation seen in AD. In the course of neurodegeneration and neuroinflammation, nucleotides play the role of signaling molecules that can participate in the development of pathological changes⁵¹. Several studies indicate the benefits of EE as a therapeutic and preventive strategy in neuronal injury⁵¹⁻⁵⁴. However, ATP and ADP hydrolysis was not altered as a consequence of environmental enrichment *per se*.

The enzyme E-5'-NT plays a key role in the regulation of extracellular hydrolysis of nucleotides, hydrolyzing AMP to adenosine. CNS adenosine is involved in a variety of physiological and pathological processes such as sleep, place neuronal excitability and adjusting blood flow to energy demand²⁴. Our results revealed no changes in the E-5'-NT in cerebral cortex, but there was an increase in AMP hydrolysis in the hippocampus. As a result, it can be expected an increase in the concentration of adenosine in the extracellular space, which may be related to the neuromodulatory effect of this nucleoside²⁷. Hou and collaborators also observed an increase in E-5'-NT activity in the corpus callosum 2VO rats 30 days after the induction of hypoperfusion, suggesting that adenosine plays an important protective role for induced lesions in the white matter of CCH through the regulatory action of glial cells and expression of proinflammatory cytokines.

It has been widely explored that exposure to EE promotes an improvement in cognitive functions in attempt to increase the synaptic plasticity, dendritic branching density, neurogenesis and expression of synaptic proteins^{55,56}. Furthermore, it produces many effects in the hippocampus, such as, an increase in hippocampus volume and morphological, electrophysiological and vascular alterations in aged rats⁵⁷⁻⁶⁰. In general, only a few weeks of environmental enriched exposition can increase neurogenesis in the hippocampus of aged rats, improving the robust survival of cells that overcomes the ages effects²⁹. We found a significant reduction in the E-5'-NT activity in 2VO / EE group in comparison to 2VO / SE group. Taking into account, we can suggest that the plastic effects promoted by EE in the hippocampus of 2VO rats leads to a reduced need modulation by adenosine front of the damage caused by hypoperfusion⁶¹. Cechetti and colleagues¹³ reported that the neuroprotective effects of EE reduced cognitive damage and oxidative stress biomarkers caused by CCH. Zhu and colleagues suggest that the benefits of EE in 2VO mice are linked to improved expression of pCREB, synaptophysin and MAP-2. Beyond that, the EE reversed their cognitive impairment without affecting basal synaptic transmission and possibly the presynaptic neurotransmitter release.

The E-ADA is a ubiquitous enzyme that catalyzes adenosine as well as 2' - deoxyadenosine. During brain ischemia, an increase in extracellular adenosine is primarily regulated by this enzyme promoting the generation of inosine⁶². There are multiple mechanisms for debugging of adenosine demonstrating that it is tightly regulated in the extracellular space⁶³. The E-ADA has an important role in the regulation of adenosine signaling in inflammatory and immune processes after ischemia. Therefore, it is suggested that the E-ADA inhibitors can play an important role in the regulation of hypoxic-ischemic events⁶⁴. Although the activity of this enzyme is often modified in neuronal injuries, here there was no significant difference in its activity when compared to control groups. One reason for this may be the need to maintain higher levels of this nucleoside in the extracellular space, to allow adenosine to play its neuromodulator and neuroprotective roles.

A well-established fact is related to the involvement of cholinergic system with cognitive function in neurodegenerative diseases^{6, 16, 65}. Previous studies have demonstrated that CCH can induce central cholinergic disorders with reduced levels of acetylcholine in the cortex and hippocampus in the 2VO model^{6, 66-68}. In our study, the AChE activity in cortex of 2VO / EE group was significantly higher than control group. The increase in hippocampus AChE activity occurred in 2VO/ SE group but only as a tendency in 2VO/ EE group, suggesting the neuronal damage after 30 days in this structure as a consequence of hypoperfusion. These results were more evident in hippocampus than in cerebral cortex. One explanation for this may be because the hippocampus is more vulnerable to the effects of hypoperfusion and ischemic events^{5, 69, 70}. In relation to previous exposure to environmental stimuli EE did not present a pronounced effect compared to SE to reduce the damage to cholinergic neurons. Different to our findings, the study of Cechetti et al.⁶¹ showed that EE reversed the cognitive deficits in spatial tasks and oxidative damage in the hippocampus after CCH. In addition, changes in brain-derived neurotrophic factor and NR1 subunit of the NMDA type glutamate expression shows the interactive nature of the molecular pathways involved in EE paradigm cognitive impairment after CCH⁷¹.

In summary, we show evidence that CCH may cause changes in cholinergic function associated with the increase in adenine nucleotide hydrolysis and maintaining adenosine levels in the extracellular space. EE was able to modulate E-5'-NT activity that is responsible for the formation of adenosine. Further studies are necessary to investigate the interaction of EE in other components of the purinergic system and their roles in CCH.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

REFERENCES

1. Schuff, N., et al., *MRI of hippocampal volume loss in early Alzheimer's disease in relation to ApoE genotype and biomarkers*. Brain, 2009. **132**(Pt 4): p. 1067-77.
2. Zhao, Y., et al., *Chronic cerebral hypoperfusion causes decrease of O-GlcNAcylation, hyperphosphorylation of tau and behavioral deficits in mice*. Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 10.
3. Jellinger, K.A., *Neuropathology of prolonged unresponsive wakefulness syndrome after blunt head injury: review of 100 post-mortem cases*. Brain Inj, 2013. **27**(7-8): p. 917-23.
4. Farkas, E., et al., *Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain*. Acta Neuropathol, 2004. **108**(1): p. 57-64.
5. Farkas, E., P.G. Luiten, and F. Bari, *Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases*. Brain Res Rev, 2007. **54**(1): p. 162-80.
6. Xi, Y., et al., *Neuronal damage, central cholinergic dysfunction and oxidative damage correlate with cognitive deficits in rats with chronic cerebral hypoperfusion*. Neurobiol Learn Mem, 2014. **109**: p. 7-19.
7. Liu, H. and J. Zhang, *Cerebral hypoperfusion and cognitive impairment: the pathogenic role of vascular oxidative stress*. Int J Neurosci, 2012. **122**(9): p. 494-9.
8. Liu, H., et al., *Decreased cerebral perfusion and oxidative stress result in acute and delayed cognitive impairment*. Curr Neurovasc Res, 2012. **9**(3): p. 152-8.
9. Kitagawa, J., et al., *Effect of chronic inflammation on dorsal horn nociceptive neurons in aged rats*. J Neurophysiol, 2005. **93**(6): p. 3594-604.
10. Adibhatla, R.M. and J.F. Hatcher, *Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies*. BMB Rep, 2008. **41**(8): p. 560-7.
11. Urabe, Y., et al., *Pigs-in-a-blanket coronary arteries: a case of immunoglobulin G4-related coronary periarteritis assessed by computed tomography coronary angiography, intravascular ultrasound, and positron emission tomography*. Circ Cardiovasc Imaging, 2012. **5**(5): p. 685-7.
12. Bang, M.L. and S. Owczarek, *A matter of balance: role of neurexin and neuroligin at the synapse*. Neurochem Res, 2013. **38**(6): p. 1174-89.
13. Cechetti, F., et al., *The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate*. Braz J Med Biol Res, 2010. **43**(12): p. 1178-83.
14. Soreq, H. and S. Seidman, *Acetylcholinesterase--new roles for an old actor*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(4): p. 294-302.
15. Wang, Z., et al., *MR evaluation of cerebral oxygen metabolism and blood flow in stroke-like episodes of MELAS*. J Neurol Sci, 2012. **323**(1-2): p. 173-7.
16. Venturini, C.D., et al., *Resveratrol and red wine function as antioxidants in the nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes*. Oxid Med Cell Longev, 2010. **3**(6): p. 434-41.
17. Egashira, T., F. Takayama, and Y. Yamanaka, *Effects of bifemelane on muscarinic receptors and choline acetyltransferase in the brains of aged rats following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries*. Jpn J Pharmacol, 1996. **72**(1): p. 57-65.
18. Liu, Y., et al., *Isoflurane tolerance against focal cerebral ischemia is attenuated by adenosine A1 receptor antagonists*. Can J Anaesth, 2006. **53**(2): p. 194-201.
19. Zhu, X., et al., *(-)-SCRI693 Protects against Memory Impairment and Hippocampal Damage in a Chronic Cerebral Hypoperfusion Rat Model*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28908.

20. Burnstock, G., *Purinergic signalling in neuroregeneration*. Neural Regen Res, 2015. **10**(12): p. 1919.
21. Yegutkin, G.G., *Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(5): p. 673-94.
22. Zimmermann, H., *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 299-309.
23. Chen, F., et al., *Non-pharmaceutical therapies for stroke: mechanisms and clinical implications*. Prog Neurobiol, 2014. **115**: p. 246-69.
24. Ribeiro, J.A., A.M. Sebastiao, and A. de Mendonca, *Participation of adenosine receptors in neuroprotection*. Drug News Perspect, 2003. **16**(2): p. 80-6.
25. Shen, Y.C., et al., *Activating oxidative phosphorylation by a pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma*. Br J Cancer, 2013. **108**(1): p. 72-81.
26. Wei, C.J., et al., *Selective inactivation of adenosine A(2A) receptors in striatal neurons enhances working memory and reversal learning*. Learn Mem, 2011. **18**(7): p. 459-74.
27. Hou, X., et al., *Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is involved in chronic cerebral hypoperfusion-induced white matter lesions and cognitive impairment by regulating glial cell activation and pro-inflammatory cytokines*. Neuroscience, 2015. **297**: p. 118-26.
28. Kuleshkaya, N., et al., *CD73 is a major regulator of adenosinergic signalling in mouse brain*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66896.
29. Speisman, R.B., et al., *Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats*. Neurobiol Aging, 2013. **34**(1): p. 263-74.
30. Diamond, M.C., *Response of the brain to enrichment*. An Acad Bras Cienc, 2001. **73**(2): p. 211-20.
31. Cechetti, F., et al., *Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment*. Brain Res Bull, 2012. **87**(1): p. 109-16.
32. Cechetti, F., et al., *Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat*. Neurobiol Learn Mem, 2012. **97**(1): p. 90-6.
33. Zhu, H., et al., *Time-dependent changes in BDNF expression of pentylene tetrazole-induced hippocampal astrocytes in vitro*. Brain Res, 2012. **1439**: p. 1-6.
34. Zhang, H.N., et al., *Transient elevation of synaptosomal mitochondrial proteins and Hsp70 early in a rat model of chronic cerebrovascular hypoperfusion*. Neurol Sci, 2013. **34**(4): p. 471-7.
35. Lee, M.Y., et al., *Alteration of synaptic activity-regulating genes underlying functional improvement by long-term exposure to an enriched environment in the adult brain*. Neurorehabil Neural Repair, 2013. **27**(6): p. 561-74.
36. Marisco, P.C., et al., *Piracetam prevents scopolamine-induced memory impairment and decrease of NTPDase, 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities*. Neurochem Res, 2013. **38**(8): p. 1704-14.
37. Dunkley, P.R., P.E. Jarvie, and P.J. Robinson, *A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes*. Nat Protoc, 2008. **3**(11): p. 1718-28.
38. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
39. Schetinger, M.R., et al., *New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities*. Neurochem Res, 2000. **25**(7): p. 949-55.
40. Heymann, D., M. Reddington, and G.W. Kreutzberg, *Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain*. J Neurochem, 1984. **43**(4): p. 971-8.
41. Chan, M.K., *Protein loading test before and after kidney donation*. Aust N Z J Med, 1986. **16**(5): p. 691-4.
42. Giusti, G. and B. Galanti, *[Post-transfusion hepatitis: the point of view of the infectious disease specialist]*. Ric Clin Lab, 1984. **14 Suppl 1**: p. 3-16.
43. Ellman, G.L. and E. Callaway, *Erythrocyte cholinesterase-levels in mental patients*. Nature, 1961. **192**: p. 1216.
44. Rocha, J.B., T. Emanuelli, and M.E. Pereira, *Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 1993. **53**(3): p. 431-7.
45. Zhai, Y., et al., *Chronic Cerebral Hypoperfusion Accelerates Alzheimer's Disease Pathology with Cerebrovascular Remodeling in a Novel Mouse Model*. J Alzheimers Dis, 2016. **53**(3): p. 893-905.
46. Zhao, Y. and C.X. Gong, *From chronic cerebral hypoperfusion to Alzheimer-like brain pathology and neurodegeneration*. Cell Mol Neurobiol, 2015. **35**(1): p. 101-10.
47. Robson, S.C., J. Sevigny, and H. Zimmermann, *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 409-30.

48. Braun, N., et al., *Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase*. Brain Res, 1997. **766**(1-2): p. 213-26.
49. Burnstock, G., *Purinergic signalling and the autonomic nervous system in health and disease*. Auton Neurosci, 2015. **191**: p. 1.
50. Xu, Y., et al., *ATP binding to Rho transcription termination factor. Mutant F355W ATP-induced fluorescence quenching reveals dynamic ATP binding*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13719-27.
51. Apolloni, S., et al., *Membrane compartments and purinergic signalling: P2X receptors in neurodegenerative and neuroinflammatory events*. FEBS J, 2009. **276**(2): p. 354-64.
52. Bayat, M., et al., *Enriched environment improves synaptic plasticity and cognitive deficiency in chronic cerebral hypoperfused rats*. Brain Res Bull, 2015. **119**(Pt A): p. 34-40.
53. Belayev, A., et al., *Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats*. Brain Res, 2003. **964**(1): p. 121-7.
54. Yang, Y., et al., *Cognitive Improvement Induced by Environment Enrichment in Chronic Cerebral Hypoperfusion Rats: a Result of Upregulated Endogenous Neuroprotection?* J Mol Neurosci, 2015. **56**(2): p. 278-89.
55. Leggio, M.G., et al., *Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat*. Behav Brain Res, 2005. **163**(1): p. 78-90.
56. Xu, X., L. Ye, and Q. Ruan, *Environmental enrichment induces synaptic structural modification after transient focal cerebral ischemia in rats*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(3): p. 296-305.
57. Nithianantharajah, J. and A.J. Hannan, *Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(9): p. 697-709.
58. Palmer, A.M., M.A. Messerli, and K.R. Robinson, *Neuronal galvanotropism is independent of external Ca(2+) entry or internal Ca(2+) gradients*. J Neurobiol, 2000. **45**(1): p. 30-8.
59. Hattiangady, B. and A.K. Shetty, *Implications of decreased hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy*. Epilepsia, 2008. **49** Suppl 5: p. 26-41.
60. Kumar, A., et al., *Evaluation of age-related changes in translocator protein (TSPO) in human brain using (11)C-[R]-PK11195 PET*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 232.
61. Cechetti, F., et al., *Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat*. Life Sci, 2012. **91**(1-2): p. 29-36.
62. Tamura, R., et al., *Neuroprotective effects of adenosine deaminase in the striatum*. J Cereb Blood Flow Metab, 2016. **36**(4): p. 709-20.
63. Nguyen, M.D., et al., *Clearance of rapid adenosine release is regulated by nucleoside transporters and metabolism*. Pharmacol Res Perspect, 2015. **3**(6): p. e00189.
64. Pimentel, V.C., et al., *Neuroinflammation after neonatal hypoxia-ischemia is associated with alterations in the purinergic system: adenosine deaminase I isoenzyme is the most predominant after insult*. Mol Cell Biochem, 2015. **403**(1-2): p. 169-77.
65. Sarter, M. and J.P. Bruno, *Developmental origins of the age-related decline in cortical cholinergic function and associated cognitive abilities*. Neurobiol Aging, 2004. **25**(9): p. 1127-39.
66. Egashira, K., et al., *Role of endothelium-derived nitric oxide in coronary vasodilatation induced by pacing tachycardia in humans*. Circ Res, 1996. **79**(2): p. 331-5.
67. Murakami, Y., et al., *Choto-san, a Kampo formula, improves chronic cerebral hypoperfusion-induced spatial learning deficit via stimulation of muscarinic M1 receptor*. Pharmacol Biochem Behav, 2005. **81**(3): p. 616-25.
68. Xiong, Y.Y. and V. Mok, *Age-related white matter changes*. J Aging Res, 2011. **2011**: p. 617927.
69. Mracsko, E., et al., *Changes in pro-oxidant and antioxidant enzyme levels during cerebral hypoperfusion in rats*. Brain Res, 2010. **1321**: p. 13-9.
70. Ozacmak, V.H., F. Barut, and H.S. Ozacmak, *Melatonin provides neuroprotection by reducing oxidative stress and HSP70 expression during chronic cerebral hypoperfusion in ovariectomized rats*. J Pineal Res, 2009. **47**(2): p. 156-63.
71. Sun, J., et al., *Extracellular ATP signaling is mediated by H(2)O(2) and cytosolic Ca(2+)(+) in the salt response of Populus euphratica cells*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e53136.

Figure 1

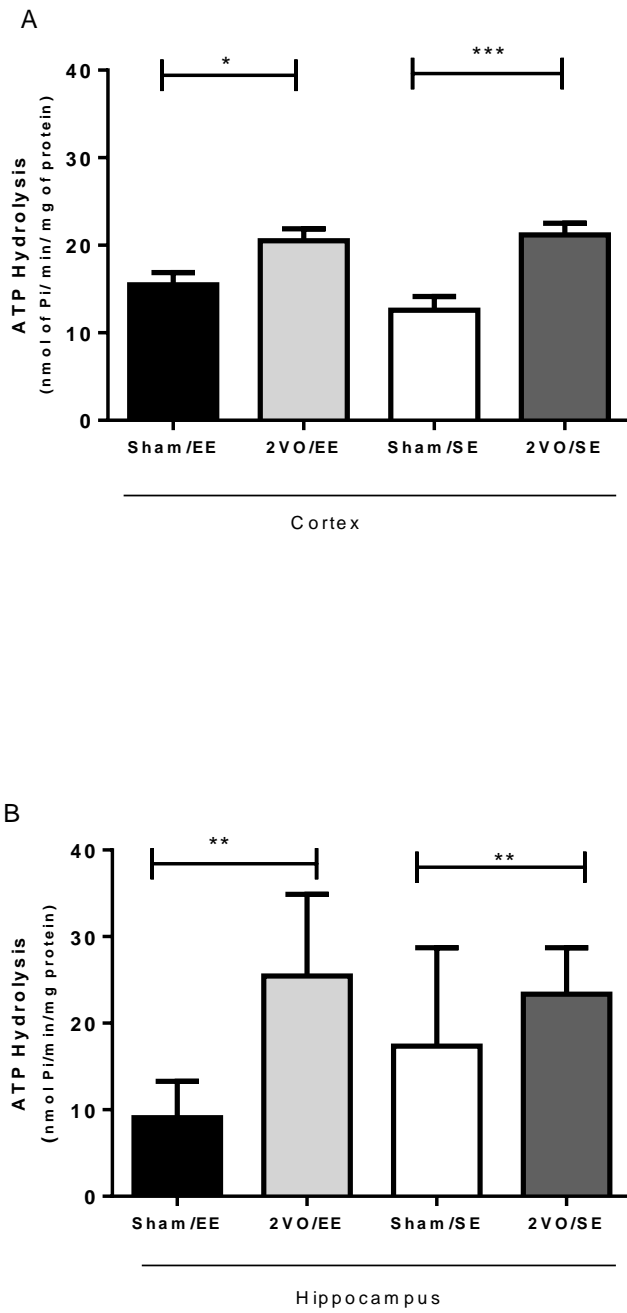


Figure 2

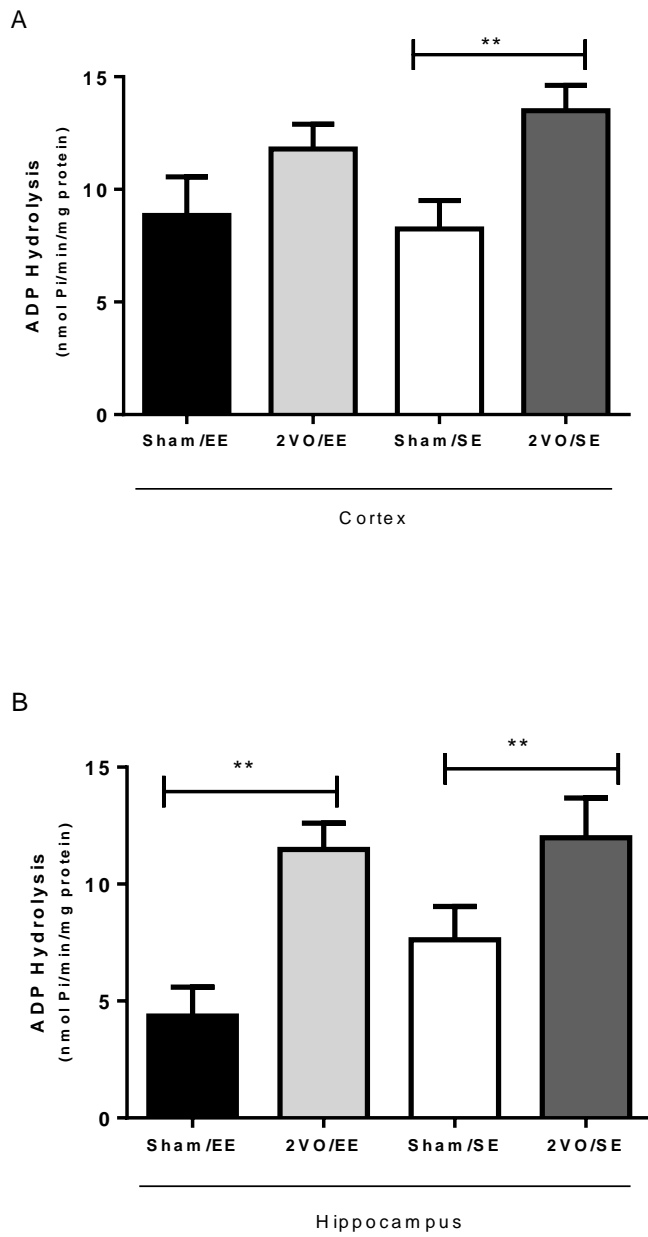


Figura 3

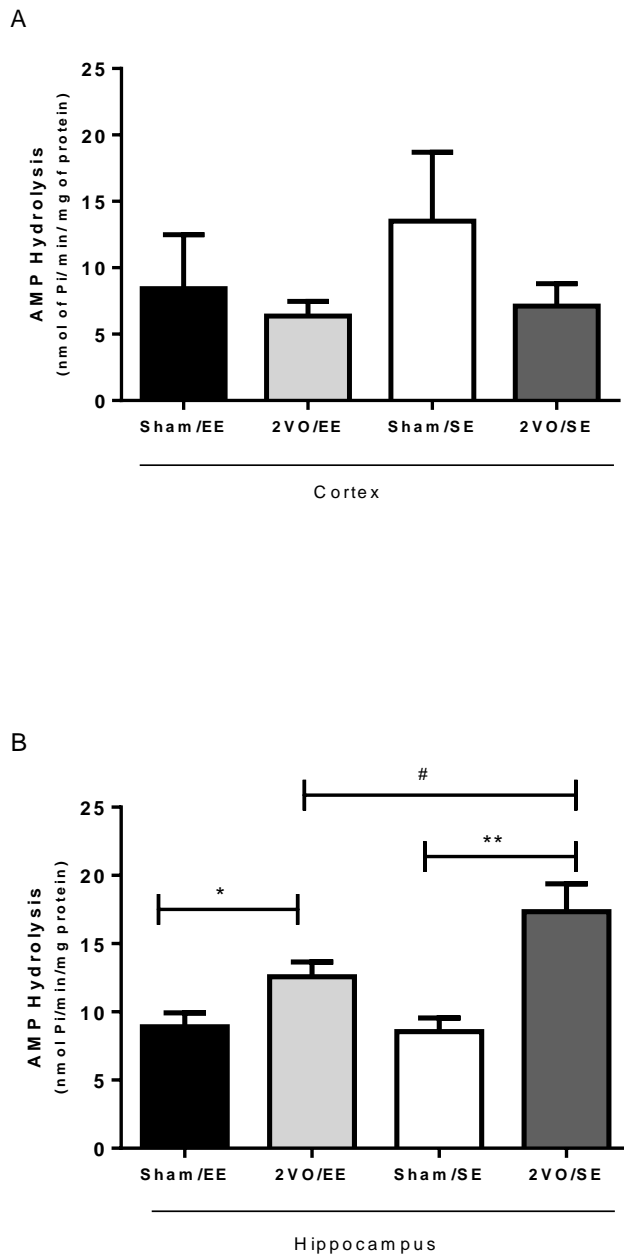
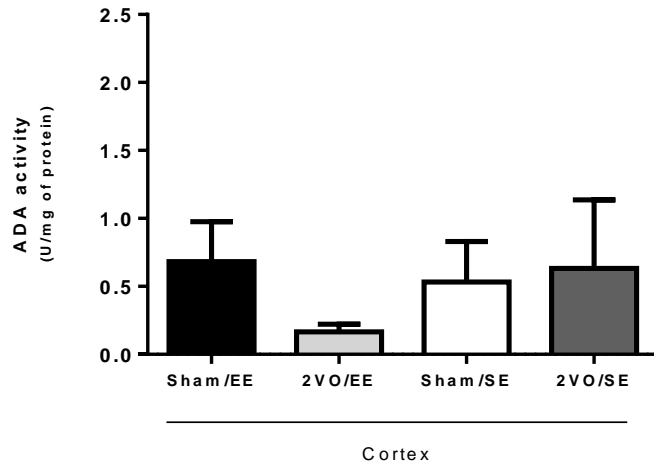


Figura 4

A



B

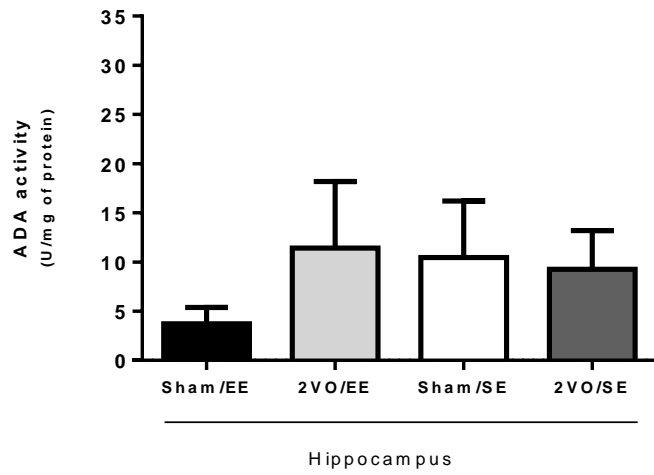
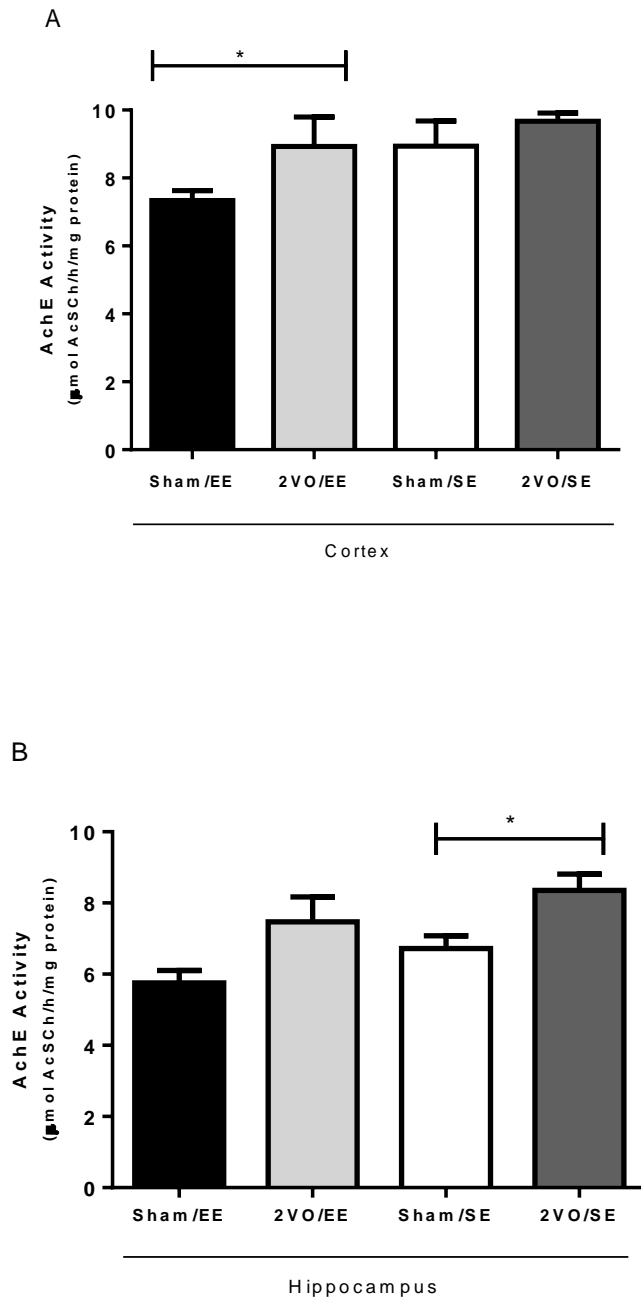


Figura 5



LEGENDS

Figure 1. ATP hydrolysis by E-NTPDase in cerebral cortex (A) and hippocampus (B) synaptosomes of 2VO rats exposed to EE. Results are expressed as nmol of Pi/ min/ mg of protein. Each column represents mean \pm SEM (n = 6 – 10). *(p < 0.05), ** (p < 0.01) and *** (p < 0.001). One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 2. ADP hydrolysis by E-NTPDase in cerebral cortex (A) and hippocampus (B) synaptosomes of 2VO rats exposed to EE. Results are expressed as nmol of Pi/ min/ mg of protein. Each column represents mean \pm SEM (n = 6 – 10). ** (p < 0.01). One-way ANOVA followed by Tukey's test was.

Figure 3. AMP hydrolysis by E-5'-NT in cerebral cortex (A) and hippocampus (B) synaptosomes of 2VO rats exposed to EE. Results are expressed as nmol of Pi/ min/ mg of protein. Each column represents mean \pm SEM (n = 3 – 8). * (p < 0.05), ** (p < 0.01) and # (p < 0.05). One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 4. Adenosine deamination by E-ADA in cerebral cortex (A) and hippocampus (B) synaptosomes of 2VO rats exposed EE. Results are expressed as U/mg of protein. Each column represents mean \pm SEM (n = 3 – 7). One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 5. AChE activity in cerebral cortex (A) and hippocampus (B) synaptosomes of 2VO rats exposed to EE. Results are expressed as μ mol of AcSCh hydrolyzed/ h/ mg of protein.

Each column represents mean \pm SEM (n = 7 – 10). * (p < 0.05). Kruskal Wallis followed by Dunn's test.

5 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- O aumento na atividade da E-NTPDase no córtex cerebral e no hipocampo dos animais hipoperfundidos pode representar um importante controle da mediação das purinas no processo de neuroproteção, promovendo a regulação dos nucleotídeos extracelulares liberados em resposta à redução da perfusão cerebral.
- O aumento na atividade da E-5'NT na hidrólise do AMP, especialmente no hipocampo, pode estar relacionada a maior vulnerabilidade dos neurônios hipocampais à redução da perfusão cerebral. Sendo assim, maiores níveis de adenosina são liberados em função de seu importante papel na neuromodulação. O aumento menos pronunciado na hidrólise do AMP no grupo exposto ao AE pode indicar os efeitos deste em lesões isquêmicas;
- A atividade da E-ADA não alterou significativamente nas estruturas analisadas. Podendo indicar que a redução crônica da perfusão cerebral requer a manutenção de níveis mais elevados de adenosina no espaço extracelular;
- O aumento da atividade da AChE no córtex cerebral e hipocampo dos animais hipoperfundidos possivelmente esteja associado aos danos crônicos causados pela HEC em neurônios colinérgicos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, C. A. et al. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 85, n. 1, p. 77–81, Jul 1993.
- ALDRICH, M. B.; BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R. E. The Importance of Adenosine Deaminase for Lymphocyte Development and Function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, n. 2, p. 311–315, Jun 2000.
- ALLEGRI, R. F.; HARRIS, P. Prefrontal cortex in memory and attention. **Revista De Neurologia**, v. 32, n. 5, p. 449–453, 2001.
- AMARAL, O. B. et al. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. **Physiology and Behavior**, v. 93, n. 1-2, p. 388–394, 2008.
- ANTONIOLI, L. et al. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 12, p. 842–57, 2013.
- ARAI, J. A.; FEIG, L. A. Long-lasting and transgenerational effects of an environmental enrichment on memory formation. **Brain research bulletin**, v. 85, n. 1-2, p. 30–5, 25 Apr 2011.
- AUGUSTO, E. et al. Ecto-5'-Nucleotidase (CD73)-Mediated Formation of Adenosine Is Critical for the Striatal Adenosine A2A Receptor Functions. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 28, p. 11390–11399, 2013.
- BAYAT, M. et al. Enriched environment improves synaptic plasticity and cognitive deficiency in chronic cerebral hypoperfused rats. **Brain Research Bulletin**, v. 119, p. 34–40, 2015.
- BELAYEV, A. et al. Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats. v. 964, p. 121–127, 2003.
- BENNETT, S. A. et al. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and

behavioral impairment. **Neuroreport**, v. 9, n. 1, p. 161–6, 5 Jan 1998.

BHAT, R. A. et al. Interaction of maize Opaque-2 and the transcriptional co-activators GCN5 and ADA2, in the modulation of transcriptional activity. **Plant molecular biology**, v. 55, n. 2, p. 239–52, Mei 2004.

BIEDERBICK, A. et al. First Apyrase Splice Variants Have Different Enzymatic Properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 25, p. 19018–19024, 16 Jun 2000.

BIERNASKIE, J.; CORBETT, D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 14, p. 5272–5280, 2001.

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v. 43, n. 18, p. 5511–9, 11 Mei 2004.

BOISON, D.; CHEN, J.-F.; FREDHOLM, B. B. Adenosine Signalling and Function in Glial Cells. **Cell Death Differ.**, v. 17, n. 7, p. 1071–1082, 2011.

BONAN, C. D. et al. Altered ATP hydrolysis induced by pentylentetrazol kindling in rat brain synaptosomes. **Neurochemical research**, v. 25, n. 6, p. 775–9, Jun 2000.

BONAN, C. D. Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 11, n. 6, p. 739–50, Sep 2012.

BRAUN, N. et al. **Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat** *J Neurosci*, 1998.

BRAUN, N. et al. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. **Biochem. J**, v. 351, p. 639–647, 2000.

BRIEDE, J.; DUBURS, G. Protective effect of cerebrocrast on rat brain ischaemia induced by occlusion of both common carotid arteries. **Cell biochemistry and function**, v. 25, n. 2, p. 203–10, 2007.

- BURLÁ, C. et al. Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 10, p. 2949–2956, 2013.
- BURNSTOCK, G. et al. Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. **Progress in Neurobiology**, v. 95, n. 2, p. 229–274, 2011.
- BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. **Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?** *General Pharmacology*, 1985.
- CARAMELLI, P.; BARBOSA, M. T. Como diagnosticar as quatro causas mais freqüentes de demência? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24, n. Supl I, p. 7–10, 2002.
- CECHETTI, F. et al. The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 12, p. 1178–1183, 2010.
- CECHETTI, F. et al. Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Life Sciences**, v. 91, n. 1-2, p. 29–36, 2012a.
- CECHETTI, F. et al. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 1, p. 109–116, 2012b.
- CHEN, J. F.; LEE, C. FEI; CHERN, Y. Adenosine receptor neurobiology: Overview. **International Review of Neurobiology**, v. 119, p. 1–49, 2014.
- CHOY, M. et al. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16395291>>
- COGNATO, G. P. et al. Caffeine and an adenosine A_{2A} receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 2, p. 453–462, Jan 2010.
- CRAWFORD, G. D.; CORREA, L.; SALVATERRA, P. M. Interaction of monoclonal

antibodies with mammalian choline acetyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 22, p. 7031–5, Nov 1982.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 13, n. 12, p. RA214–21, Des 2007.

DE LA TORRE, J. C. **Impaired brain microcirculation may trigger Alzheimer's disease** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 1994.

DE LA TORRE, J. C. Cardiovascular risk factors promote brain hypoperfusion leading to cognitive decline and dementia. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, v. 2012, 2012.

DE SOUZA-TALARICO, J. N. et al. Dementia and Cognitive Impairment Prevalence and Associated Factors in Indigenous Populations: A Systematic Review. **Alzheimer disease and associated disorders**, 2 Feb 2016.

DEIANA, S.; PLATT, B.; RIEDEL, G. **The cholinergic system and spatial learning** **Behavioural Brain Research**, 2011.

DIAMOND, M. C. Response of the brain to enrichment. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 2, p. 211–20, Jun 2001.

ECKENSTEIN, F.; THOENEN, H. Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. **The EMBO journal**, v. 1, n. 3, p. 363–8, 1982.

FARKAS, E.; LUITEN, P. G. M.; BARI, F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. **Brain Research Reviews**, v. 54, n. 1, p. 162–180, 2007.

FRANCO, R. et al. **Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme** **Progress in Neurobiology**, 1997.

FRANKE, H. et al. Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 629–657, 2012.

FREDHOLM, B. B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and

repair. **Cell death and differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1315–23, 2007.

GEULA, C.; MESULAM, M. M. Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. **Alzheimer disease and associated disorders**, v. 9 Suppl 2, p. 23–8, 1995.

GIACOBINI, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. **Neurochemical research**, v. 28, n. 3-4, p. 515–22, Apr 2003.

GODING, J. W.; HOWARD, M. C. Ecto-enzymes of lymphoid cells. **Immunological reviews**, v. 161, p. 5–10, Feb 1998.

GORZONI, M. L.; PIRES, S. L. [Long-term care elderly residents in general hospitals]. **Revista de Saude Publica**, v. 40, n. 6, p. 1124–1130, 2006.

GUROL, M. E. Cerebral hypoperfusion and white matter disease in healthy elderly and patients with Alzheimer's disease. [s.d.].

HARUKUNI, I.; BHARDWAJ, A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 1–21, 2006.

HASKO, G. et al. Adenosine receptor signaling in the brain immune system. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 10, p. 511–516, 2005.

HOU, X. et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is involved in chronic cerebral hypoperfusion-induced white matter lesions and cognitive impairment by regulating glial cell activation and pro-inflammatory cytokines. **Neuroscience**, v. 297, n. March, p. 118–126, 2015.

IADECOLA, C. The Pathobiology of Vascular Dementia. **Neuron**, v. 80, n. 4, p. 844–866, 2013.

JELLINGER, K. A. The pathomechanisms underlying Parkinson's disease. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 14, p. 199–215, 2014.

JING, Z. et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces vascular plasticity and hemodynamics but also neuronal degeneration and cognitive impairment. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, n. 2011, p. 1–11, 2015.

JONES, B. E. **Glia, Adenosine, and SleepNeuron**, 2009.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 51, p. 33116–22, 20 Des 1996.

KASPAROVÁ, S. et al. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. **Neurochemistry international**, v. 46, n. 8, p. 601–611, 2005.

KUANG, X. et al. Postischemic administration of Z-Ligustilide ameliorates cognitive dysfunction and brain damage induced by permanent forebrain ischemia in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 88, n. 3, p. 213–21, Jan 2008.

LAMBERT, T. J.; FERNANDEZ, S. M.; FRICK, K. M. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 83, n. 3, p. 206–216, 2005.

LEGGIO, M. G. et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 163, n. 1, p. 78–90, 2005.

LIU, H.; ZHANG, J. Cerebral hypoperfusion and cognitive impairment: the pathogenic role of vascular oxidative stress. **The International journal of neuroscience**, v. 122, n. 9, p. 494–9, Sep 2012.

LIU, L. et al. Baclofen mediates neuroprotection on hippocampal CA1 pyramidal cells through the regulation of autophagy under chronic cerebral hypoperfusion. **Scientific reports**, v. 5, n. March, p. 14474, 2015.

LIU, Q. et al. White matter injury due to experimental chronic cerebral hypoperfusion is associated with C5 deposition. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e84802, 2013.

LOCOVEI, S.; WANG, J.; DAHL, G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. **FEBS Letters**, v. 580, n. 1, p. 239–244, 2006.

MACHADO, J. C.; CARAMELLI, P. Treatment of dementia: anything new? **Current opinion in psychiatry**, v. 19, n. 6, p. 575–80, 2006.

MARIA, A. et al. Recentes Avanços No Estudo O Atp Extracelular. p. 26–28, [s.d.].

MASSOULIÉ, J. et al. Old and new questions about cholinesterases. **Chemico-biological interactions**, v. 175, n. 1-3, p. 30–44, 25 Sep 2008.

MATSON, C. C. et al. The public health leadership certificate: a public health and primary care interprofessional training opportunity. **Health promotion practice**, v. 15, n. 1 Suppl, p. 64S–70S, 2014.

MENDEZ-OTERO, R. et al. Terapia celular no acidente vascular cerebral. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 55 21, p. 99–103, 2009.

MESULAM, M. et al. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. **Neurobiology of disease**, v. 9, n. 1, p. 88–93, Feb 2002a.

MESULAM, M.-M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627–39, 2002b.

MEYER, J. Qualitative research in health care: Using qualitative methods in health related action research. **British Medical Journal**, v. 320, n. 7228, p. 178–181, 2000.

MICHEAU, J.; MARIGHETTO, A. **Acetylcholine and memory: A long, complex and chaotic but still living relationship** *Behavioural Brain Research*, 2011.

MORA, F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 45–52, 2013.

MORRONE, F. et al. Abstracts from Purines 2014, an International Conference on Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases, held in Bonn, Germany, from July 23–27, 2014. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 657–854, 2014.

MULERO, J. J. et al. CD39-L4 Is a Secreted Human Apyrase, Specific for the Hydrolysis of Nucleoside Diphosphates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20064–20067, 16 Jul 1999.

MURPHY, P. C.; SILLITO, A. M. Cholinergic enhancement of direction selectivity in the visual cortex of the cat. **Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 13–20, 1991.

NIEMELÄ, J. et al. IFN-beta regulates CD73 and adenosine expression at the blood-brain barrier. **European journal of immunology**, v. 38, n. 10, p. 2718–26, Okt 2008.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697–709, Sep 2006.

NITRINI, R. et al. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. **International Psychogeriatrics International Psychogeriatric Association**, v. 21, n. 4, p. 622–630, 2009.

OBRENOVICH, M. E. et al. Insights into cerebrovascular complications and Alzheimer disease through the selective loss of GRK2 regulation: Alzheimer Review Series. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 5, p. 853–865, 2009.

ODA, Y. Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. **Pathology International**, v. 49, n. 11, p. 921–937, Nov 1999.

OHTA, H. et al. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. **Neuroscience**, v. 79, n. 4, p. 1039–1050, 1997.

OTORI, T. et al. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, n. 4, p. 266–272, Apr 2003.

PERRY, E. K. et al. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 4, n. 4, p. 273–7, [s.d.].

PICCIOTTO, M. R. et al. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. **Nature**, v. 391, n. 6663, p. 173–7, 8 Jan 1998.

PIMENTEL, V. C. et al. Hypoxic-ischemic brain injury stimulates inflammatory response and enzymatic activities in the hippocampus of neonatal rats. **Brain Research**, v. 1388, p. 134–140, 2011.

PIMENTEL-COELHO, P. M.; MICHAUD, J.-P.; RIVEST, S. Evidence for a gender-specific

protective role of innate immune receptors in a model of perinatal brain injury. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 28, p. 11556–72, 10 Jul 2013.

PLASCHKE, K. Aspects of ageing in chronic cerebral oligoemia. Mechanisms of degeneration and compensation in rat models. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 112, n. 3, p. 393–413, Mrt 2005.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIAO, A. M.; DE MENDONCA, A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. **Drug news & perspectives**, v. 16, p. 80–86, 2003.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.

ROMÁN, G. C. Vascular dementia prevention: a risk factor analysis. **Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)**, v. 20 Suppl 2, n. suppl 2, p. 91–100, 2005.

ROSEMBERG, D. B. et al. Evidence that acute taurine treatment alters extracellular AMP hydrolysis and adenosine deaminase activity in zebrafish brain membranes. **Neuroscience letters**, v. 481, n. 2, p. 105–9, 6 Sep 2010.

SABIROV, R. Z.; OKADA, Y. **ATP release via anion channels** **Purinergic Signalling**, 2005.

SAPOLSKY, R. M. Atrophy of the hippocampus in posttraumatic stress disorder: how and when? **Hippocampus**, v. 11, n. 2, p. 90–1, 2001.

SAXENA, A. K. et al. Investigation of redox status in chronic cerebral hypoperfusion-induced neurodegeneration in rats. **Applied and Translational Genomics**, v. 5, p. 30–32, 2015.

SCHETINGER, M. R. et al. Heparin modulates adenine nucleotide hydrolysis by synaptosomes from cerebral cortex. **Neurochemistry international**, v. 33, n. 3, p. 243–9, Sep 1998.

SCHETINGER, M. R. C. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and

disease conditions: new perspectives for human health. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 31, n. 2, p. 77–98, 2007.

SEBASTIÃO, A. M. et al. Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. **British journal of pharmacology**, v. 131, n. 8, p. 1629–1634, 2000.

SEELEY, W. W. Selective functional, regional, and neuronal vulnerability in frontotemporal dementia. **Current opinion in neurology**, v. 21, n. 6, p. 701–7, 2008.

SEGOVIA, G. et al. Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. **Journal of Neural Transmission**, v. 117, n. 10, p. 1123–1130, 13 Okt 2010.

SHAKED, I.; ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Stress-induced alternative splicing modulations in brain and periphery: acetylcholinesterase as a case study. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, p. 269–81, Des 2008.

SHEN, H. Y. et al. Adenosine augmentation ameliorates psychotic and cognitive endophenotypes of schizophrenia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 7, p. 2567–2577, 2012.

SHU, X. et al. Brain-derived neurotrophic factor inhibits glucose intolerance after cerebral ischemia. **Neural regeneration research**, v. 8, n. 25, p. 2370–8, 5 Sep 2013.

SINGH, L. S.; SHARMA, R. Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 204, n. 1-2, p. 127–34, Jan 2000.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294–302, Apr 2001.

SRIDHAR, G. R. et al. Serum butyrylcholinesterase in type 2 diabetes mellitus: a biochemical and bioinformatics approach. **Lipids in health and disease**, v. 4, p. 18, 2005.

UEDA, H.; FUJITA, R. Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 7, p. 950–5, Jul 2004.

VAN DER ZEE, E. A. et al. Demonstration of muscarinic acetylcholine receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain and upper brainstem. **Histochemistry**, v. 92, n. 6, p. 475–85, 1989.

VANDENBERGHE, R.; TOURNOY, J. Cognitive aging and Alzheimer's disease. **Postgraduate medical journal**, v. 81, n. 956, p. 343–52, Jun 2005.

VERKHRATSKY, A. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 1, p. 19–29, 2009.

VON LUBITZ, D. K. et al. Protection against ischemic damage by adenosine amine congener, a potent and selective adenosine A1 receptor agonist. **European journal of pharmacology**, v. 369, n. 3, p. 313–7, 26 Mrt 1999.

WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. **Brain research**, v. 790, n. 1-2, p. 318–22, 20 Apr 1998.

WEI, C. J.; LI, W.; CHEN, J. F. **Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2011.

XI, Y. et al. Neuronal damage, central cholinergic dysfunction and oxidative damage correlate with cognitive deficits in rats with chronic cerebral hypoperfusion. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 109, p. 7–19, 2014.

YANG, H.-Y. et al. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on synaptic plasticity and apoptosis in vascular dementia rats. **Behavioural brain research**, v. 281, p. 149–55, 2015a.

YANG, Y. et al. Cognitive Improvement Induced by Environment Enrichment in Chronic Cerebral Hypoperfusion Rats: a Result of Upregulated Endogenous Neuroprotection? **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 56, n. 2, p. 278–289, 2015b.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, 2008.

ZHAO, W. et al. 3-N-butylphthalide improves neuronal morphology after chronic cerebral ischemia. **Neural Regeneration Research**, v. 9, n. 7, p. 719–726, 2014a.

ZHAO, Y. et al. Chronic cerebral hypoperfusion causes decrease of O-GlcNAcylation, hyperphosphorylation of tau and behavioral deficits in mice. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. FEB, p. 1–16, 2014b.

ZHAO, Y.; GONG, C. X. From Chronic Cerebral Hypoperfusion to Alzheimer-Like Brain Pathology and Neurodegeneration. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 35, n. 1, p. 101–110, 2014.

ZHU, H. et al. An enriched environment reverses the synaptic plasticity deficit induced by chronic cerebral hypoperfusion. **Neuroscience Letters**, v. 502, n. 2, p. 71–75, 2011.

ZIMMERMANN, H. **Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides** Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2000.

ZIMMERMANN, H. **ATP and acetylcholine, equal brethren** Neurochemistry International, 2008.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 2, p. 194–204, 2011.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 2012a.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 3, p. 437–502, 4 Sep 2012b.

ZLOKOVIC, B. V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 723–38, 2011.

ANEXO A



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ECTONUCLEOTIDASES EM SINAPTOSSOMAS DE CÓRTEX CEREBRAL E HIPOCAMPO E PLAQUETAS EM MODELO DE HIPOPERFUSÃO ENCEFÁLICA CRÔNICA EXPOSTOS AO AMBIENTE ENRIQUECIDO", protocolada sob o CEUA nº 8848220615, sob a responsabilidade de **Daniela Bitencourt Rosa Leal** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 10/09/2015.

We certify that the proposal "ECTONUCLEOTIDASES IN SINAPTOSSOMAS OF THE CEREBRAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS AND PLATELETS IN CHRONIC BRAIN HYPOPERFUSION MODEL EXPOSED TO THE ENRICHED ENVIRONMENT", utilizing 64 Heterogenic rats (64 males), protocol number CEUA 8848220615, under the responsibility of **Daniela Bitencourt Rosa Leal** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 09/10/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2015** a **07/2016**

Área: **Microbiologia E Parasitologia**

Origem: **Biotório Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **2 a 2 meses**

N: **64**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 200 g**

Resumo: A hipoperfusão encefálica crônica (HEC) está associada a várias doenças cerebrovasculares, na qual ocorre a redução ou perda do fluxo arterial e o comprometimento da oferta de substratos metabólicos ao tecido nervoso. Este dano desencadeia uma cascata de eventos que conduz à morte celular e consequentemente aos déficits cognitivos e de memória. Durante a isquemia, células danificadas liberam ATP que atua tanto como um fator citotóxico quanto um mediador pró-inflamatório envolvido na regulação de vários processos fisiopatológicos. Dentre estes processos destacam-se a neurotransmissão do sistema nervoso central, as interações neurônios e glia, a resposta imune e inflamação, e a regulação do tônus vascular. O ATP e os demais nucleotídeos de adenina, ADP e AMP, têm suas concentrações pericelulares reguladas pela ação das ectonucleotidases que catalisam sua conversão até adenosina. Sendo assim, este projeto tem como propósito comparar a atividade das enzimas E-NTPDase e E-5C-NT em sinaptoossomas de córtex cerebral, hipocampo e plaquetas de ratos expostos ao ambiente enriquecido no modelo de HEC aos 7 dias (efeito agudo) e 28 dias (efeito crônico) da indução, e ainda, investigar o desempenho nos testes comportamentais e a análise histológica do tecido cerebral.

Local do experimento: Os ensaios biológicos serão realizados no Laboratório de Imunobiologia Experimental e Aplicada da UFSM localizado na sala 4229 do prédio 20.

Santa Maria, 29 de julho de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Brock Rosemberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B

MANUSCRIPT SUBMISSION

Cell Biochemistry and Function operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then visit <http://mc.manuscriptcentral.com/cbf> and navigate to the *Cell Biochemistry and Function* online submission site.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created.

All papers must be submitted via the online system.

Required information

Failure to supply the following information may result in immediate rejection.

- 1) Manuscripts must be accompanied by a Submission Letter confirming that all authors have agreed to the submission and that it has not been submitted elsewhere.
- 2) Authors are required to upload a paragraph detailing the significance of their paper in the context of current knowledge. This will be published as part of the final manuscript.
- 3) Authors are required to supply with every submitted manuscript the names and contact details of 4 possible reviewers. These should NOT be members of the Editorial Board with at least 2 currently working outside the country from which the paper is submitted. Authors should indicate which Editorial Board member is most appropriate for reviewing the submission, although the Editor-in-Chief may choose another for reasons of speed.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are .doc, .docx, .rtf, .ppt, .xls. **LaTeX** files may be submitted provided that an .eps or .pdf file is provided **in addition** to the source files. Figures may be provided in .tiff or .jpeg format.

NEW MANUSCRIPT

Non-LaTeX users. Upload your manuscript files. At this stage, further source files do not need to be uploaded.

LaTeX users. For reviewing purposes you should upload a single .pdf that you have generated from your source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box.

REVISED MANUSCRIPT

Non-LaTeX users. Editable source files must be uploaded at this stage. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

LaTeX users. When submitting your revision you must still upload a single .pdf that you have generated from your revised source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box. In addition you must upload your TeX source files. For all your source files you must use the File Designation "Supplemental Material not for review".

Previous versions of uploaded documents must be deleted. If your manuscript is accepted for publication we will use the files you upload to typeset your article within a totally digital workflow.

Electronic Enhancement/Supporting Information. Data that are (i) not amenable to presentation in a traditional print format, (ii) of interest primarily to specialists and do not require Journal page space, or (iii) particularly useful to the community in electronic (downloadable) form can be published online as supporting information hosted within Wiley Online Library.

ONLINE OPEN

OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

COPYRIGHT AND PERMISSIONS

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp.

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQshosted on [Wiley Author Services](#) and visit<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in

complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Note to NIH Grantees Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information see <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

COPE Membership

Cell Biochemistry and Function endorses the COPE (Committee on Publication Ethics) guidelines and will pursue cases of suspected research and publication misconduct (e.g. falsification, fabrication, plagiarism, inappropriate image manipulation, redundant publication). In such cases, the journal will follow the processes set out by COPE. For more information about COPE, please visit the COPE website at <http://www.publicationethics.org.uk>.

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. Submitted material will not be returned to the author.

MANUSCRIPT STYLE

The language of the journal is English. 12-point type in one of the standard fonts: Times, Helvetica, or Courier is preferred. It is not necessary to double-line space your manuscript. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

- During the submission process you must enter the full title, short title of up to 70 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address (department, institute, city, country [if the affiliation is in foreign language, country name should always be in English]; ZIP code, street address and PO Box not allowed), as well as the corresponding author's full postal address, include email address (Email, not E-mail, followed by colon; Email should not be broken, start a new line if space is not enough, no full stop at end) who will check the proofs (Do not include any e-mail addresses other than the corresponding author's).
- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)**.
- Enter an **abstract** of up to 200 words for all articles [except book reviews]. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work.
- Include a **Significance of the Study** consisting of a single paragraph of no more than 100 words. The main goal of the Significance paragraph is to explain the significance of the findings and their relevance in the context of cellular biochemistry and function to a broad readership, from basic to clinical research scientists. No references should be included. Please note that a paragraph on significance is not required for review articles.
- Include at least four and up to maximum of eight **keywords**, separated by commas, that describe your paper for indexing purposes.
- The remainder should be presented as: text - including suppliers of materials and an introduction which does not recapitulate the results and conclusions; acknowledgements; references; tables; figure captions (these last three supplied separately) and illustrations.
- **Rapid communications** should be less than 4 printed pages (approximately 1000 words excluding references) and contain only a single figure. They should have the same style as for full research articles.
- Units, abbreviations and nomenclature. In general, the IUPAC-IUB commissions convention, e.g. as used by the *Biochemical Journal* will be followed. It is preferable to use SI units, but other, more generally used units can be used, preferably with the equivalent values in SI units in parentheses.

Reference style. References should be listed at the end of the manuscript in alphabetical order according to the name of the first author and chronologically where several papers by the same author are listed. References should be cited by superior numbers. All references must be complete and accurate. Use Medline abbreviations for journal names. They can be found at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>. Online citations should include date of access. If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include it in the reference list. Where possible the DOI* for the reference should be included at the end of the reference. References should be listed in the following style:

1. Nanni G, Canepa C, Casu A. Dolichol and vitamin A content in rat liver Ito (perisinusoidal) cells. *Life Sci.* 1997;**60**:21-28.DOI: 10.1002/ls.258
2. Chayen J, Bitensky L. *Cell Biology in Medicine*. 2nd ed. New York, NY: John Wiley & Sons, Ltd; 1973.
3. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. In: Colowick SP, Kaplan ON, eds.*Methods in Enzymology*. 10th ed. San Diego, CA: Academic Press; 1984:114-121.
4. The Oncology Website. Cancer Facts & Figures 1998. <http://www.mit.com/oncology/>. Accessed April 24, 1999.

*The Digital Object Identifier (DOI) is an identification system for intellectual property in the digital environment. Developed by the International DOI Foundation on behalf of the publishing industry, its goals are to provide a framework for managing intellectual content, link customers with publishers, facilitate electronic commerce, and enable automated copyright management.

Illustrations. Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. The artwork must be sized to the text width of 75 mm one column, 156 mm two column. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings etc - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum
- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi
- Tables should be part of the main document and should be placed after the references. If the table is created in Excel, the file should be uploaded separately.
- Please set in the following order, if present:

1. Acknowledgments
2. Appendix
3. How To Cite
4. Disclosure/Conflict of Interest
5. End notes
6. References

Colour illustrations supplied electronically in either .tiff or .jpeg format will be used in the online and .pdf versions of the article at no cost to the author or which will appear on the *Wiley Online Library site*.

POST ACCEPTANCE

Further information. For accepted manuscripts the publisher will supply proofs to the corresponding author prior to publication. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimize the risk of the paper being held

over to a later issue. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only (unless otherwise stated). Please sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Reprints of your article and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.

Contact Information

Should the need arise, the Editor-in-Chief can be contacted as follows: Dr Nigel Loveridge, Orthopaedic Research, University of Cambridge Clinical School, Addenbrookes Hospital (Box 180), Cambridge CB2 2QQ, UK. Tel. +44 (0) 1223 748733; Fax: +44 (0) 1223 214094; e-mail: nl10003@cam.ac.uk

Author Resources. Manuscript now accepted for publication?

If so, visit our suite of tools and services for [authors](#) and sign up for:

- Article Tracking
- E-mail Publication Alerts
- Personalization Tools

Cite EarlyView articles. To link to an article from the author's homepage, take the DOI (digital object identifier) and append it to "http://dx.doi.org/" as per following example:

DOI 10.1002/hep.20941, becomes <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20941>.

Publishing and the Ecology of European Research (PEER)

This journal is participating in the PEER Project, an EU-funded initiative to examine the impact on scholarly journals of depositing accepted manuscripts in web-based repositories. If the corresponding author is based in an EU country, we will deposit the accepted manuscript into the central project repository (DRIVER). The article's availability will be subject to a post-publication embargo. This project has no effect on your rights or obligations under the terms of the copyright agreement pertaining to this journal.

Pre-Submission English Language Editing. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.com/journals/editcontribute.html> All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Conflict of Interest. All authors must declare financial/commercial conflicts of interest. Even if there is none, this should be stated in a separate paragraph following on from the Acknowledgements section. This is a mandatory requirement for **all** articles.

