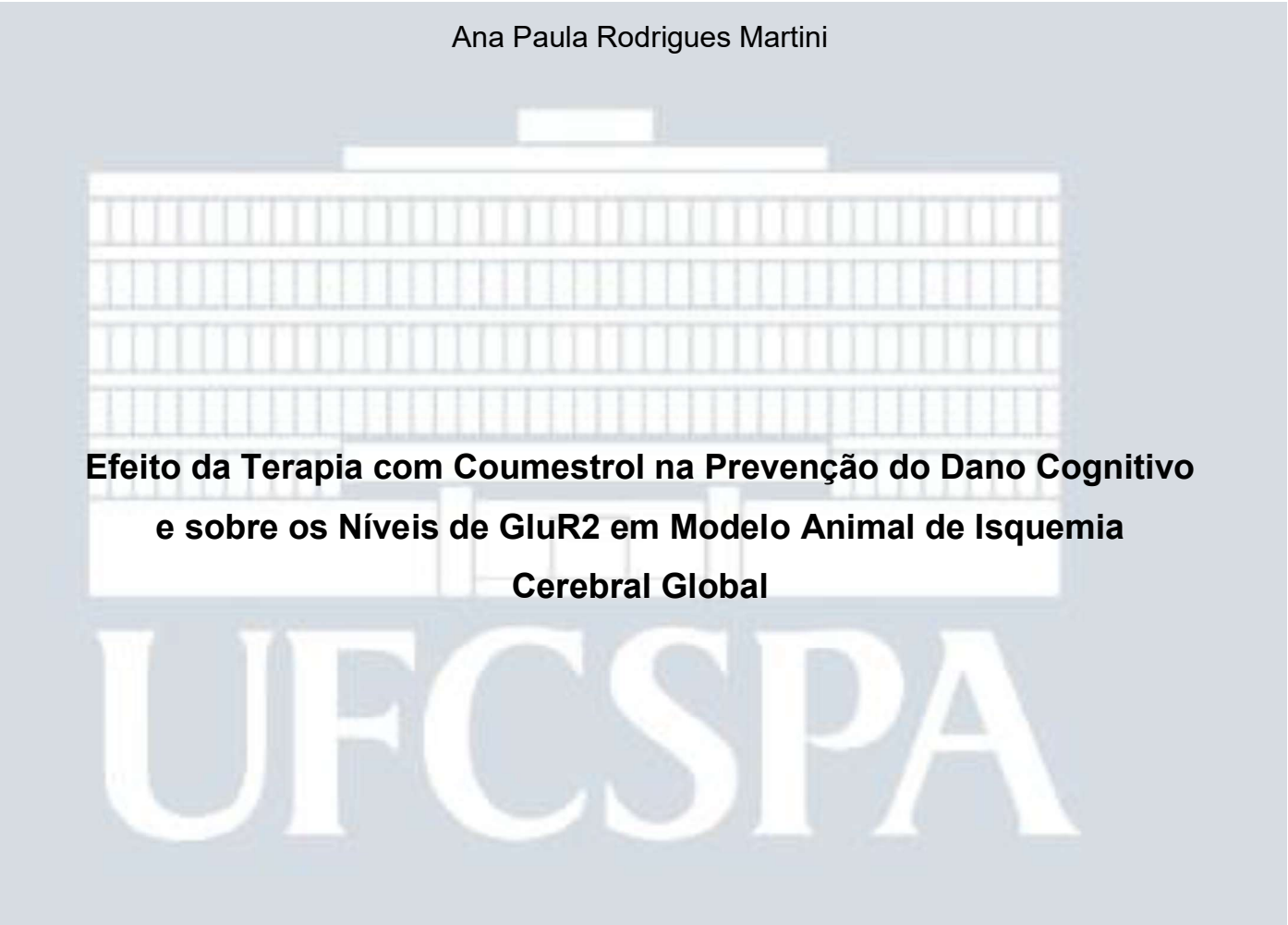


UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DE SAÚDE DE PORTO ALEGRE –
UFCSPA

CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

Ana Paula Rodrigues Martini



**Efeito da Terapia com Coumestrol na Prevenção do Dano Cognitivo
e sobre os Níveis de GluR2 em Modelo Animal de Isquemia
Cerebral Global**

Porto Alegre

2015

Ana Paula Rodrigues Martini

**Efeito da Terapia com Coumestrol na Prevenção do Dano Cognitivo
e sobre os Níveis de GluR2 em Modelo Animal de Isquemia
Cerebral Global**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dra. Aline de Souza Pagnussat

Co-orientadora: Dra. Fernanda Cechetti

Porto Alegre

2015

Dedicatória

À minha mãe Josélia Rodrigues Martini, que sempre apoiou e incentivou todas as minhas decisões profissionais e embalou meus os sonhos com amor incondicional.

“Mãe... São três letras apenas
As desse nome bendito,
também o Céu tem três letras...
E nelas cabe o infinito.”

Agradecimentos

. À professora Aline de Souza Pagnussat, pessoa que admiro imensamente em vários aspectos, uma verdadeira inspiração profissional e pessoal. Agradeço pelo voto de confiança ao aceitar me orientar e pelo carinho e paciência ao acolher todas as minhas dúvidas e inquietudes durante esta caminhada. Trabalhar sob a sua orientação neste período foi essencial no desenvolvimento das minhas habilidades enquanto acadêmica e pesquisadora. É muito gratificante poder ser instigada pelo seu conhecimento e profissionalismo que inspiram os alunos diariamente. É mais gratificante ainda poder construir o conhecimento junto a ti.

. À professora Fernanda Cechetti por aceitar ser minha coorientadora e que, juntamente à professora Aline, me ensinou os procedimentos de laboratório referentes ao modelo de isquemia cerebral global utilizado nesta pesquisa.

. Ao professor Carlos Alexandre Netto e aos colegas do laboratório de Isquemia e Neuroproteção da UFRGS por todo o suporte e ensinamentos e pelas oportunidades que tive de aprender e aperfeiçoar minhas competências junto ao grupo.

. À querida Cibeles, uma surpresa que o mestrado me proporcionou. Obrigada pelos ensinamentos, pelo companheirismo e pela forma como me auxiliou a conduzir os experimentos, além das palavras de conforto nas horas em que precisei.

. À Julia, pela dedicação e respeito que teve com esta pesquisa, auxiliando incansavelmente até o fim do experimento. Vou lembrar sempre com muita gratidão das rotinas de laboratório e biotério que fizemos juntas.

. À minha amiga Jociane, com quem compartilhei muitos artigos, trabalhos e apresentações enquanto colegas do mestrado, mas também muitos momentos de reflexão, risadas e caminhadas no Gasômetro que nos fizeram crescer juntas. Sua presença foi essencial!

. À minha querida Francielle, que esteve presente dos momentos mais felizes aos mais tristes de minha vida, que entende como uma irmã o que acontece em meu

coração e nunca mediu esforços para me ver feliz. Esteve comigo do início ao fim deste mestrado sempre torcendo pelo meu sucesso. A ti, não tenho palavras para retribuir todo este carinho e cuidado.

. Aos meus amigos, inicialmente por me auxiliarem a passar por esta fase de adaptações sempre dispostos a me fazer companhia e também pela compreensão em vários momentos dos quais não pude estar presente. Nossos encontros podem demorar a acontecer, mas vale a pena cada segundo que estou com vocês!

. À minha família, em especial ao meu pai Paulo e meus irmãos André e Paulo Roberto, que mesmo longe se fazem sempre presentes. Eu sou uma pessoa muito mais feliz porque tenho vocês comigo. Sou grata por todo o amor, carinho e incentivo que encontro em vocês e principalmente por compreenderem as minhas ausências nos momentos em que precisei reservar para cumprir com este dever. Meu lar está onde vocês estão.

. Aos meus demais familiares, que sempre me acolheram com muito carinho tanto em Santa Maria, onde iniciei minha caminhada acadêmica, quanto em Porto Alegre. Então, aos meus tios Sérgio, Maria da Graça, Vera e Jorge, meus profundos agradecimentos por estarem sempre presentes em minha vida e proporcionarem os carinhosos momentos em família que tanto aprecio.

. À minha amada mãe devo mais que agradecimentos, pois foi a pessoa que me proporcionou o acesso ao conhecimento e orientou minhas escolhas, acolhendo minhas decisões com apoio incondicional. Indiscutivelmente, todas as minhas conquistas acadêmicas dedico a ela que sempre me incentivou e ensinou o valor da educação e a importância do estudo desde cedo. Nunca esquecerei seus ensinamentos, sua ausência física me trás muita saudade, porém, carrego no coração todas os momentos especiais de nossa vida juntas!

. À UFCSPA, instituição que sinto muito orgulho em poder representar que conjuntamente à UFRGS me proporcionaram a realização deste trabalho e à CAPES pela bolsa concedida durante este período.

*“Demore o tempo que for para decidir o que você quer da vida e, depois que decidir,
não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te dissuadir.”*

Friedrich Nietzsche

Resumo

Introdução: A isquemia causa morte neuronal por excitotoxicidade, o GluR2 presente no receptor AMPA glutamatérgico, expresso no hipocampo, modula a permeabilidade ao Ca^{2+} . O estradiol promove a neuroproteção por meio dos $\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$ e, moléculas como o coumestrol possuem estrutura similar ao estradiol, e potencial efeito neuroprotetor, porém seu mecanismo de ação permanece não elucidado. Este estudo objetivou examinar o efeito agudo do coumestrol e a sua influência sob os níveis de GluR2 no hipocampo de camundongos machos após a isquemia cerebral. **Métodos:** Estudo experimental com camundongos *swiss* submetidos à isquemia cerebral global (20 min) ou cirurgia sham na qual receberam uma dose de veículo (DMSO) ou coumestrol (20 $\mu\text{g/kg}$) uma hora antes da cirurgia. Foi realizada a quantificação de GluR2 por Western Blot e o teste comportamental Water Maze. **Resultados:** Houve redução dos níveis de GluR2 no grupo isquemia veículo 12, 24 e 48 horas após a reperfusão ($p < 0.001$). Ainda, houve diferença significativa na expressão de GluR2 entre os grupos isquemia veículo e o isquemia coumestrol ($p < 0.001$) e também entre os grupos sham e o isquemia coumestrol ($p < 0.001$) após 48 horas. No Water Maze, houve diferença significativa entre os grupos sham e os grupos isquemia ($p < 0.001$). Ainda, o coumestrol mostrou-se capaz em prevenir o prejuízo da memória induzida pela isquemia ($p < 0.001$). **Conclusão:** Estes resultados indicam que o coumestrol preveniu o dano cognitivo e a redução da expressão de GluR2 no hipocampo sugerindo um efeito neuroprotetor.

Palavras-chave: Isquemia Encefálica, Fitoestrogenos, Hipocampo, Receptores AMPA, Memória.

Abstract

Background: Ischemia causes neuronal death by excitotoxicity, GluR2 present in the glutamatergic AMPA receptor, expressed in the hippocampus, modulates the permeability to Ca^{2+} . Estradiol promotes neuroprotection through $\text{ER}\alpha$ and $\text{ER}\beta$ and molecules like coumestrol has a similar structure to estradiol, and potential neuroprotective effect, but its mechanism of action remains unclear. This study aims to examine the role of coumestrol in hippocampus GluR2 levels of male mice post cerebral ischemia. **Methods:** Experimental model used swiss mice were subjected to global cerebral ischemia (20 min) or sham surgery, which received a single infusion of vehicle (DMSO), or coumestrol (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 1 hour before ischemia. Western Blot was performed to quantify GluR2 levels and Morris Water Maze behavioral test was conducted. **Results:** Occurred a significant effect of ischemia on hippocampal levels of GluR2 at all times of reperfusion 12 h, 24h and 48h ($p < 0.001$). *Post hoc* analysis revealed a significant difference between ischemia DMSO and ischemia coumestrol group at all-time intervals ($p < 0.001$). There was also a significant difference between sham groups and ischemia coumestrol group at 48 h after ischemia ($p < 0.001$). As expected, in Morris water maze there was a significant difference between the sham and ischemia group given vehicle ($p < 0.001$). The coumestrol was effective in preventing memory impairment induced by global ischemia ($p < 0.001$). **Conclusion:** These results indicate that coumestrol suggest a protective effect against GluR2 levels reduction and cognitive impairment associated with ischemia.

Keywords: Brain Ischemia, Phytoestrogens, Hippocampus, AMPA Receptors, Memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG.1. Representação do perfil temporal dos mecanismos de lesão e reparo após o AVC isquêmico.

FIG.2. Representação da morte celular por necrose e por apoptose

FIG.3. Representação da zona central isquêmica, da zona de penumbra isquêmica e da circulação colateral no encéfalo após a oclusão de um vaso.

FIG.4. Representação esquemática dos eventos fisiopatológicos que ocorrem na cascata isquêmica.

FIG.5. Eventos vasculares, perivasculares e parenquimais conduzidos pela isquemia e reperfusão.

FIG.6. Representação esquemática da principal via de reciclagem glutamato-glutamina que ocorre no neurônio e no astrócito.

FIG.7. Representação esquemática das sinapses tri-partite (terminais pré-sinápticos e pós-sinápticos dos neurônios glutamatérgicos e astrócito circundante).

FIG.8. Representação esquemática da fisiopatologia da excitotoxicidade glutamatérgica.

FIG.9. Permeabilidade ao cálcio dependente da composição das subunidades relativa aos receptores AMPA.

FIG.10. Resumo dos mecanismos que envolvem a neuroproteção pelo estrogênio.

FIG.11. Representação das semelhanças estruturais do estrogênio com outros compostos, coumestrol, genistein e daidzein.

FIG.12. Diferenças químicas e estruturais entre as moléculas de coumestrol e estradiol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2VO – Oclusão de Dois Vasos

4VO - Oclusão de Quatro Vasos

AMPA - Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol Propiônico

ATP – Trifosfato de Adenosina

AVC - Acidente Vascular Cerebral

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BHE - Barreira Hemato-Encefálica

CA1 - Corno de Amonis 1

CA3 - Corno de Amonis 3

Ca²⁺ - Cálcio

DCNT - Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DCV - Doenças Cardiovasculares

EAAT - Transportadores de Aminoácidos Excitatórios

ER α – Receptor de estrogênio Alfa

ER β – Receptor de Estrogênio Beta

ERK - Quinases Reguladas por Sinal Extracelular

ERO- Espécie Reativa de Oxigênio

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

FSC - Fluxo Sanguíneo Cerebral

GNF - Fator Neurotífico Derivado da Linhagem de Células Gliais

ICAM - molécula de adesão intercelular-1

IGF-1 - Fatores de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1

iGluRs - Receptores de Glutamato Ionotrópicos

IL-1 β - Interleucina 1 β

IP3 - Inositol-1,4,5-Trifosfato

KA - Cainato

MMP-9 - Metaloproteinases da Matriz 9

mGluR - Receptores de Glutamato Metabotrópicos

Na⁺ - Sódio

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase.

NMDA - N-metil-D-aspartato

nNos - Óxido Nítrico Sintetase neuronal

NO – Óxido Nítrico

PI3K - Fosfatidilinositol 3-Quinases

PSGL-1 glicoproteína ligante de Pselectina 1

RE- Retículo Endoplasmático

rt-PA - ativador tecidual de plasminogênio recombinante

Zn⁺² – Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	15
2.2 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA CEREBRAL	18
2.2.1 Mecanismos da Cascata Isquêmica Cerebral	23
2.2.2 O Sistema Glutamatérgico	30
2.2.3 Excitotoxicidade Glutamatérgica.....	32
2.2.4 Implicações da expressão proteica do GluR2 – “ <i>The GluR2 Hypothesis</i> ” ..	35
2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ISQUEMIA CEREBRAL	36
2.4 AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA E APRENDIZADO EM ANIMAIS	38
2.5 NEUROPROTEÇÃO FARMACOLÓGICA: FITOESTRÓGENOS E COUMESTROL	40
3. REFERÊNCIAS	48
4. ARTIGO.....	66
5. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	91
ANEXO A – Comprovante de aprovação do projeto pelo Comissão de Ética no Uso de Animais.....	93
ANEXO B - Normas de formatação do periódico Neuroscience Letters ...	94

1. INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento, as pessoas passaram a ser acometidas cada vez mais pelas doenças crônicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). O Acidente Vascular Cerebral (AVC) tornou-se a quarta maior causa de morte e principal causa de incapacidade no mundo (ROGER, 2011), já no Brasil, a doença lidera as estatísticas tanto em mortalidade e incapacidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). As evidências apontam que 1 a cada 6 sujeitos terão pelo menos um AVC ao longo da vida (SESHADRI et al., 2006). Cerca de 80% dos AVCs são isquêmicos e resultam de uma oclusão por trombos ou êmbolos de uma artéria cerebral (MOHR et al., 1978), com isso ocorre a redução do fluxo sanguíneo cerebral com rápida depleção de trifosfato de adenosina (ATP) ocasionado a despolarização da membrana celular, excitotoxicidade glutamatérgica, influxo de Ca^{2+} e morte neuronal (LEROUET et al., 2002). A reperfusão dos vasos e a reoxigenação promove o restabelecimento do tecido (RODRIGO et al., 2005), porém os danos causados no centro da lesão são irreversíveis, com isso, as propostas de tratamento visam a recuperação da área de penumbra (VAN DER WERP et al., 2007).

Os neurônios são expostos a quantidades pequenas de glutamato, o qual é recaptado e reciclado naturalmente, porém, durante a isquemia, a liberação massiva de glutamato provoca maior estimulação dos receptores no terminal pós sináptico (NISHIZAWA, 2001), levando à falência dos mecanismos de recaptção e à excitotoxicidade glutamatérgica (MELDRUM et al., 1985). Os receptores glutamatérgicos AMPA podem expressar a subunidade GluR2 que os torna completamente impermeáveis ao Ca^{2+} (PELLEGRINI-GIAMPIETRO, 2003). As células piramidais do hipocampo expressam mRNA para GluR2 em abundância (TANAKA et al., 2000), mas após a isquemia, pode ocorrer uma diminuição da expressão de GluR2, tornando o receptor AMPA permeável ao Ca^{2+} , e permitindo o influxo do íon (PELLEGRINI-GIAMPIETRO et al., 1992). Este fenômeno explica a hipótese do GluR2, a qual relaciona a morte das células piramidais CA1 com a redução da expressão de GluR2 após a isquemia (TANAKA et al., 2000).

A anatomia e fisiologia vascular cerebral dos roedores são semelhantes a dos humanos, tornando esses animais os mais comumente usados nos estudos sobre isquemia (MHAIRI MACRAE, 1992). O modelo de oclusão bilateral das artérias carótidas (2VO) mimetiza a condição patológica do AVC (JIWA et al., 2010), a fim de estudar os mecanismos da lesão e as abordagens de prevenção, tratamento e neuroproteção (ALONSO DE LECINAÑA et al., 2005). No 2VO, as artérias carótidas são ocluídas com cliques cirúrgicos por um tempo determinado gerando a lesão isquêmica, que é revertida com a retirada dos cliques, promovendo a reperfusão dos vasos (OZ et al., 2014; SINGH e CHOPRA, 2013). A vulnerabilidade seletiva determina quais os tecidos cerebrais irão sofrer mais rapidamente os danos provocados pela isquemia, sendo a região CA1 do hipocampo mais amplamente reconhecida por essa característica (PULSINELLI, 1985). A isquemia pode causar déficits de memória espacial e aprendizagem, dependendo da localização e severidade do insulto (LI et al., 2013). O labirinto aquático de Morris é utilizado para avaliar a aprendizagem espacial relacionada ao hipocampo (MORRIS, 1984). Pode-se avaliar a memória de trabalho e memória de referência, sendo esta última requisitada para relembrar informações consolidadas (CECHETTI et al., 2010), já na memória de trabalho a informação é mantida por um determinado tempo, até que seja útil e então é descartada (IZQUIERDO, 2002).

O tratamento com fármacos visa à descoberta de agentes neuroprotetores capazes de restabelecer a zona de penumbra resultante do infarto isquêmico (MARKUS et al., 2004). O estradiol é capaz de agir por meio da ligação com os receptores ER α e ER β sinalizando vias de neuroproteção (ALKAYED et al., 2000; DUBAL et al., 1998). Os fitoestrógenos possuem semelhanças estruturais com o estrogênio e são classificados em isoflavonas, coumestans e lignanas (BELCHER e ZSARNOVSZKY, 2001). O coumestrol é um coumestano descoberto inicialmente em brotos de alfafa e atualmente reconhecido em diversas fontes alimentares (FRANKE et al., 1995; PRICE e FENWICK, 1985). Sua interação com os receptores de estrogênio é muito forte quando comparado com o estradiol (WHITTEN et al., 2002), sugerindo seu potencial efeito neuroprotetor através da redução do dano tecidual na área CA1 do hipocampo em roedores após o insulto isquêmico (CASTRO et al., 2012) e da atuação contra a inibição de atividade da Na⁺/K⁺-ATPase no mesmo contexto (CASTRO et al., 2014). Além da sua atividade estrogênica, o coumestrol atua como

um agente antioxidante capaz de remover os radicais livres e prevenir os danos oxidativos (MITCHELL et al., 1998).

Até o presente momento, os efeitos promovidos pelo coumestrol e sua interação com os receptores de glutamato são desconhecidos, porém, se imagina que o estradiol seja capaz de interferir na atividade dos receptores AMPA prevenindo a redução da expressão da subunidade de GluR2 após a isquemia através da modulação da permeabilidade do cálcio. O coumestrol, por ter uma atividade semelhante ao estrogênio, é um agente a ser estudado pelo seu potencial efeito neuroprotetor. Uma vez que as vias de ação pelas quais o coumestrol é capaz de promover a neuroproteção e atenuar e/ou evitar os processos envolvidos na cascata isquêmica, ainda não estão bem elucidadas na literatura, o presente estudo foi realizado a fim de examinar o possível papel da coumestrol: (a) nos níveis de expressão de GluR2 no hipocampo de ratos machos em diferentes tempos de reperfusão; (b) na prevenção dos déficits de memória induzidos pela isquemia cerebral global.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

Com o aumento da expectativa média de vida e o envelhecimento da população mundial, se torna cada vez mais evidente a incidência de doenças neurodegenerativas. No Brasil, as Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) passaram a ser predominantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005) destacando-se as Doenças Cardiovasculares (DCV), como as principais causadoras de óbitos em indivíduos de ambos os sexos (BARRETO et al., 2007). Entre estas se encontra o AVC, que a nível mundial, ocupa o quarto lugar em mortalidade e é considerada a principal causa de incapacidade (ROGER, 2011) liderando as estatísticas de casos de morte e dependência no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). De acordo com Lotufo et al (2005), os óbitos por AVC ultrapassam os registros de óbitos por doença cardíaca coronariana, sendo que a incidência é maior após os 65 anos, havendo aumento do risco com a idade, que dobra a cada década após os 55 anos (RODGERS, 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1989), o AVC é definido como o desenvolvimento rápido de sinais clínicos de perturbações focais ou globais da função cerebral com sintomas que perduram por um período superior a 24 horas ou conduzem a morte, sem outra causa aparente que a vascular. O AVC pode ser de origem isquêmica, ou seja, ocorre a falta de aporte sanguíneo em uma determinada região do encéfalo, ou de origem hemorrágica, quando ocorre uma ruptura de um vaso encefálico ocasionando extravasamento de sangue no tecido circundante. O evento isquêmico pode ser classificado de acordo com a sua topografia como global ou focal. A redução significativa de suprimento sanguíneo e oxigênio capaz de acarretar danos teciduais em todo o encéfalo é conhecida como isquemia global. Já, na isquemia focal, esta redução do aporte sanguíneo ocorre em territórios cerebrais específicos dependendo da artéria ocluída (DUGAN e CHOI, 1994; GINSBERG, 1997; IADECOLA, 1999). Os sintomas mais comumente reconhecidos do início de um AVC, que levam o paciente a procurar a emergência, são a fraqueza ou dormência unilateral e a dificuldade na fala (LECOUTURIER et al., 2010).

O encéfalo é quase exclusivamente dependente do fluxo sanguíneo contínuo e adequado capaz de fornecer oxigênio e glicose ao tecido. Uma vez que o encéfalo não possui estoques de energia, a redução do fluxo sanguíneo pode rapidamente ocasionar importante falha energética (MERGENTHALER et al., 2004) afetando gravemente a função cerebral, e ocasionar alterações bioquímicas e moleculares que posteriormente virão a manifestar-se como sequela neurológica (RODRIGO et al., 2005). O bloqueio do fluxo sanguíneo caracteriza a isquemia (ZEMKE et al., 2004), e alguns minutos após o início da mesma, ocorrem danos aos tecidos no centro da lesão isquêmica, onde o fluxo de sangue cerebral é reduzido em até 90% (BROUNS e DEYN, 2009). Nessa região central, a morte celular se desenvolve rapidamente como consequência da falha energética e perda aguda de gradientes iônicos associado com despolarização permanente e anóxia (HOSSMANN, 1994; DIRNAGL e IADECOLA, 1999).

Quando a isquemia é de caráter perene, não existe a possibilidade de reverter essa condição, em função dos danos irreversíveis provocados nos vasos. Já na isquemia transitória, existe retorno do fluxo sanguíneo ao leito vascular, podendo os danos celulares serem reversíveis dependendo de alguns fatores, como duração e gravidade do evento isquêmico (FAROOQUI e HORROCKS, 1994; SCHMIDT-KASTNER e FREUNDI, 1991). Mais de 80% dos AVCs são em consequência de uma oclusão permanente ou prolongada, que tem como causa uma trombose ou embolia podendo ocorrer em uma artéria cerebral principal ou secundária (MOHR et al., 1978).

O comprometimento neurológico inicia na fase aguda podendo persistir na maioria dos sobreviventes de AVC (MELLON et al., 2015). O desenvolvimento do dano tecidual após um insulto isquêmico ocorre a longo prazo, evoluindo dentro de horas ou dias (Fig.1), sendo dependente tanto da intensidade e duração da redução do fluxo sanguíneo, quanto dos mecanismos independentes do fluxo, especialmente nas regiões cerebrais peri-infartadas (HOSSMANN, 2006; VAN DER WERP et al., 2007). Algumas horas depois, o infarto se expande para dentro da área de penumbra. Nesta fase, o dano celular é desencadeado principalmente por excitotoxicidade, distúrbios mitocondriais, produção de espécies reativas de oxigênio e morte celular programada (LO et al., 2005). A situação após um insulto isquêmico acarreta na produção e acúmulo de substâncias tóxicas. A resolução requer restauração do fluxo

sanguíneo (reperfusão) e a subsequente recuperação dos níveis normais de oxigênio (reoxigenação) (RODRIGO et al., 2005).

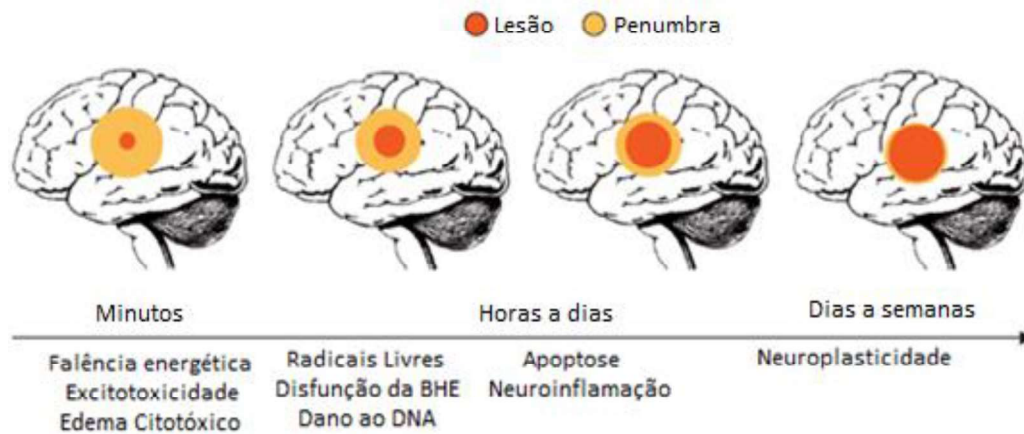


FIG.1. Representação do perfil temporal dos mecanismos de lesão e reparo após o AVC isquêmico. A oclusão de um vaso sanguíneo cerebral é caracterizada, na fase aguda, por excitotoxicidade, falência da homeostase iônica, edema citotóxico e formação de radicais livres. As intervenções terapêuticas que visam o bloqueio desses eventos precoces devem ser administradas dentro de 2 a 3 horas após o início da isquemia para que se possa obter benefícios. O dano ao tecido da zona de penumbra ocorre principalmente por apoptose e neuroinflamação e continua por várias horas a dias, contribuindo significativamente para a evolução da lesão cerebral. A Neuroplasticidade sustenta a recuperação espontânea de algumas funções neurológicas observadas em pacientes várias semanas ou meses após o AVC isquêmico. BHE: Barreira Hematoencefálica. Adaptado de CANDELARIO-JALIL, 2009.

Quanto maior o tempo para normalizar os parâmetros sanguíneos durante o período de reperfusion, maiores serão os danos na parede dos vasos, a resposta inflamatória cerebral e o dano ao tecido (SCOTT et al., 2000). A recuperação neurológica e funcional acontece principalmente nos primeiros seis meses após o AVC (JØRGENSEN et al., 1995). Cinco milhões de sobreviventes se tornam incapacitados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011) apresentando complicações motoras (50-83%), cognitivas (50%), distúrbios de linguagem (23-36%) e distúrbios psicológicos (20%) (PAUL et al., 2007). O comprometimento cognitivo é uma consequência comum que pode afetar até 35% dos sobreviventes de forma variada (TATEMACHI et al., 1997) e pode persistir em 32 % dos casos até 3 anos após a isquemia (PATEL et al., 2003). Estas deficiências neurológicas podem aparecer no

indivíduo sob vários aspectos como o déficit de atenção, memória e linguagem (KASE et al., 1998). O dano cognitivo torna o indivíduo dependente para a realização das atividades de vida diária (AVDs) como vestir, comer e ir ao banheiro, até mesmo em trabalhos domésticos e interações sociais (ZINN et al., 2004). Deve-se levar em consideração o distúrbio cognitivo como um preditor da recuperação do paciente, uma vez que a presença da disfunção afeta diretamente o processo de reabilitação (ZINN et al., 2004), sendo um influenciador dos resultados do tratamento, caso as técnicas utilizadas nesse processo necessitem de habilidades cognitivas, tais como a evocação e execução de instruções (HERSHKOVITZ et al., 2007).

O déficit cognitivo pode estar relacionado com o comprometimento gradual dos neurônios piramidais do hipocampo, situação frequentemente observada em situações de hipoperfusão encefálica crônica, associada ou não ao envelhecimento, e que pode levar a quadros de demência progressiva (FARKAS et al., 2007). Tanto as deficiências cognitivas quanto as físicas têm impactos significativos não só para os sobreviventes, mas também sobre as famílias e os cuidadores (LANGA et al., 2001).

Os esforços em pesquisar novos tratamentos giram em torno da recuperação da área de penumbra isquêmica, uma vez que os danos na zona central são irreversíveis (VAN DER WORP et al., 2007). Essa área não está condenada à morte celular, porém apresenta um risco em potencial ao longo do período pós-lesão e em função disso, neste período, abre-se uma janela terapêutica importante, que é alvo de vários estudos (WOODRUFF et al., 2011; MARKUS et al., 2004). Neste sentido, muitos pesquisadores têm como foco a investigação das vias e mecanismos de morte e sobrevivência celular, bem como a identificação de agentes que possam ser utilizados na prevenção e na recuperação desses danos (DAWSON e DAWSON, 2004).

2.2 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA CEREBRAL

Para estudar os processos celulares básicos que ocorrem na isquemia cerebral é necessária a utilização de modelos animais que mimetizam esta situação, e desta forma também é possível desenvolver hipóteses terapêuticas a cerca da doença.

Neste sentido, o modelo experimental de isquemia cerebral global transitória é capaz de reproduzir um cenário fisiopatológico semelhante ao que ocorre em situações de parada cardíaca e ressuscitação em humanos (XU et al., 2010). O encéfalo é um órgão que, apesar de representar apenas 2% do peso corporal, necessita de uma demanda de energia muito alta para seu bom funcionamento, sendo que em repouso consome em torno de 20% da energia total disponível. Qualquer diminuição no aporte de oxigênio e glicose afeta a manutenção do potencial elétrico e dos gradientes iônicos e, eventualmente, as funções celulares (KANEKAR et al., 2012).

As reservas energéticas intracelulares cerebrais são limitadas, tornando o órgão dependente do fornecimento de nutrientes provenientes do aporte sanguíneo constante. Por este motivo, as alterações do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) se tornam extremamente danosas ao tecido (JACKMAN e IADECOLA, 2013). As atividades celulares básicas consomem aproximadamente 25% da energia disponível, já para a efetivação dos processos de sinalização celular é necessária a utilização dos 75% restantes (ATTWELL e LAUGHLIN, 2001). Uma oclusão vascular causada por um trombo ou êmbolo pode acarretar na diminuição do FSC a menos de 10ml/100g de tecido, e logo se inicia uma depleção de oxigênio e glicose, e conseqüentemente, há diminuição acentuada de ATP alguns minutos após o início da isquemia. A partir da falência energética se inicia uma cascata de eventos isquêmicos, que compreendem a disfunção da bomba de sódio potássio e, a perda do potencial de membrana. Isso implica em despolarização celular e liberação acentuada do neurotransmissor glutamato no meio extracelular, ocasionando influxo de Ca^{2+} na célula pós sináptica. Outros processos ainda envolvem formação de radicais livres, disfunção da barreira hematoencefálica (BHE), inflamação e morte celular (DURUKAN e TATLISUMAK, 2007).

A morte celular ocorre por dois processos que são a necrose e a apoptose. Morfológicamente, a necrose é caracterizada pelo edema inicial que ocorre na célula, seguido pela ruptura das membranas plasmáticas, do núcleo e das organelas, culminando em um “encolhimento celular” (do inglês *cell shrinkage*), condensação e desintegração dessas estruturas, levando à extrusão dos detritos celulares para o meio extracelular, sendo estes os desencadeadores dos processos inflamatórios (MANJO e JORIS, 1995). Já a apoptose é uma forma controlada de morte celular, que permite a eliminação das células com um efeito mínimo no tecido circundante. Primeiro ocorre a compactação e marginalização da cromatina nuclear seguido pelo

“*cell shrinkage*” e condensação, porém a integridade das organelas segue preservada. Por fim, ocorre a divisão nuclear e citoplasmática para formar fragmentos ligados à membrana, conhecidos como corpos apoptóticos. Estes, sob condições adequadas, são fagocitados por macrófagos (Fig. 2), portanto, o conteúdo não chega a extravasar para o meio extracelular evitando maiores danos (KERR et al., 1972).

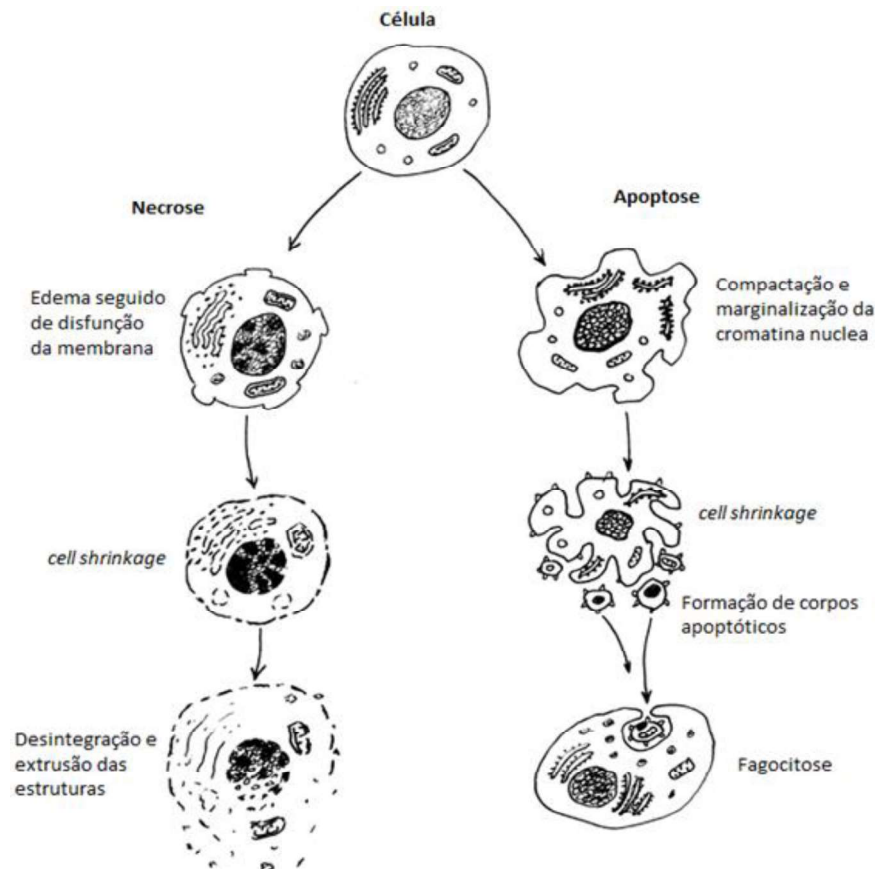


FIG. 2. Representação da morte celular por necrose e por apoptose apontando as diferenças que ocorrem entre os processos celulares. Adaptado de VAN DER MEER et al., 2010.

A zona central isquêmica é onde o FSC reduz drasticamente em até 90%, ocorrendo danos celulares irreversíveis por necrose. As células da zona isquêmica central morrem mais rapidamente, pois sofrem processos de lipólise, proteólise, desagregação microtubular, falência energética e desregulação homeostática (BROUNS e DEYN, 2009). A necrose ocorre de uma forma não controlada e desregulada podendo resultar em danos para as células adjacentes por meio da liberação do conteúdo celular (BROUNS e DEYN, 2009).

A região ao redor da zona central isquêmica é a zona de penumbra, nessa região o fluxo sanguíneo não é tão diminuído proporcionando menos prejuízos celulares, sendo que o potencial de ação celular é perdido, mas o ATP gerado é

suficiente para manter o potencial de membrana em repouso (LO et al., 2003), sendo mais comum ocorrer a morte celular por apoptose nessa área (SMITH, 2004). A penumbra isquêmica não é funcional, as células mantêm a integridade estrutural, porém se encontram funcionalmente inativas. As evidências indicam que, se o fluxo sanguíneo não é restaurado dentro de algumas horas, a zona de penumbra torna-se parte da zona central do infarto (LO et al., 2003; LO, 2008). O destino da penumbra isquêmica é, em grande parte, dependente da eficiência da circulação colateral (Fig. 3), que desempenha um papel fundamental na manutenção da perfusão após oclusão vascular (JACKMAN e IADECOLA, 2015).

As regiões cerebrais possuem diferentes limiares para a ocorrência da isquemia, por exemplo, a substância branca tende a ser mais resistente do que a cinzenta. Além disso, determinadas populações de neurônios são seletivamente mais vulneráveis à isquemia, como é o caso das células da região CA1 do hipocampo, que é a região mais relatada na literatura por essa característica. A vulnerabilidade seletiva determina quais os tecidos cerebrais irão sofrer mais rapidamente os danos provocados pela isquemia. De uma forma ordenada, as áreas mais propensas são: o hipocampo (CA1 e CA4 possuem maior vulnerabilidade que CA3 e células granulares), o cerebelo (células de Purkinje mais propensas que as células estreladas, células em cesta, células granulosas e células de Golgi), o estriado (neurônios pequenos e médios) e por fim o córtex cerebral (camadas 3, 5, e 6 são mais vulneráveis que as camadas 2 e 4) (PULSINELLI, 1985).

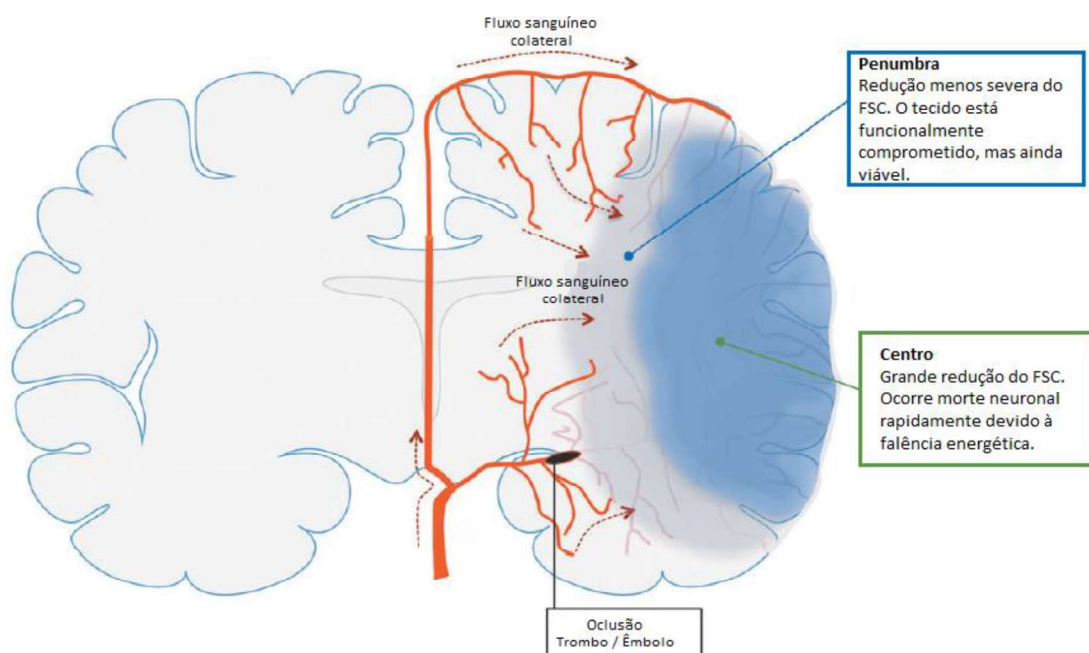


FIG.3. Representação da zona central isquêmica, da zona de penumbra isquêmica e da circulação colateral no encéfalo após a oclusão de um vaso. Na zona central ocorre a diminuição do FSC mais severa, resultando rapidamente em morte neuronal. A zona de penumbra isquêmica recebe fluxo sanguíneo suficiente para as células permanecerem vivas, porém não funcionais, tornando-se dependentes da eficiência da circulação colateral. FSC: fluxo sanguíneo cerebral. Adaptado de JACKMAN e IADECOLA, 2015.

A cascata isquêmica normalmente se prolonga por horas, podendo durar dias, mesmo após a restauração da circulação sanguínea. Embora a reperfusão do tecido cerebral isquêmico seja crucial para o reestabelecimento da função normal, paradoxalmente, pode resultar em danos secundários. Este período é chamado de isquemia / reperfusão (I / R) (LAKHAN et al., 2009). Com a restauração do FSC ocorre a reperfusão dos vasos e a concomitante reoxigenação dos tecidos, que pode reduzir o tamanho do infarto, salvando as células da zona de penumbra e com isso melhorando o resultado clínico em pacientes com AVC (SCHALLER e GRAF 2004). Quanto mais cedo for a reperfusão, mais efetivo se torna o tratamento e também o resultado que a combinação de agentes trombolíticos e neuroprotetores poderá proporcionar na recuperação da função neurológica. Se a perfusão cerebral não for restaurada, os eventos lesivos da cascata isquêmica continuarão acontecendo (CANDELARIO-JALIL, 2009). No entanto, a reperfusão tardia pode acarretar uma destruição progressiva e irreversível das células neuronais danificadas, levando à disfunção do tecido ou à necrose. Este fenômeno é conhecido como “*reperfusion injury*”, ou seja, lesão causada pela reperfusão (SCHALLER e GRAF 2004). Os mecanismos fisiopatológicos que, em conjunto, caracterizam a lesão causada pela reperfusão continuam em estudo e ainda não estão totalmente elucidados, no entanto, os mediadores de estresse oxidativo como os radicais livres são sugeridos como possíveis contribuintes neste contexto (PACHER et al., 2007).

Do ponto de vista clínico, nenhuma terapia está atualmente disponível para limitar a lesão causada pela reperfusão tardia, os estudos enfatizam a necessidade de uma melhor compreensão dos seus mecanismos patológicos subjacentes para elaborar potenciais estratégias terapêuticas (PACHER et al., 2007). O único tratamento aprovado para utilização no tratamento do AVC agudo é a Alteplase, uma enzima ativadora do plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA), destinada a dissolver o coágulo de fibrina dentro de uma janela de tempo de até 3 horas, contadas a partir do início do insulto isquêmico. Mesmo assim, as estatísticas mostram que 6%

dos pacientes podem desenvolver hemorragia intracraniana sintomática em função deste fármaco (KINCSES et al., 2001). Essa terapia aumenta o risco de hemorragia em aproximadamente 10 vezes, principalmente pela ativação das metaloproteinases de matriz 9 (MMP-9) mediada por tPA, que faz com que ocorra a ruptura da BHE permitindo que o sangue entre em contato com o tecido nervoso cerebral (SUMII e LO, 2002). Por outro lado, se evidencia que a utilização do rt-PA no tratamento dos sintomas neurológicos traz benefícios e até mesmo resolução completa do quadro, assim como a contribuição na recuperação funcional dos pacientes (STEMER e LYDEN, 2010). Quanto menor o intervalo de tempo entre o início dos sintomas e a infusão da medicação, maior será a chance de um bom prognóstico (DEL ZOPPO et al., 2010).

2.2.1 Mecanismos da Cascata Isquêmica Cerebral

Com a diminuição do aporte sanguíneo cerebral, se inicia uma sequência de eventos fisiopatológicos interdependentes entre si, que desencadeiam diversas reações no tecido nervoso pelos mais variados processos podendo levar à morte celular. Essas reações caracterizam a cascata isquêmica, que em suma incluem (1) a rápida depleção dos estoques de ATP, (2) a glicólise anaeróbica, acidose láctica e despolarização da membrana, (3) a excitotoxicidade glutamatérgica, (4) o influxo de Ca^{2+} , de sódio (Na^+) e água para as células, resultando em edema celular, (5) a ativação de enzimas estimuladas pelo Ca^{2+} , (6) disfunção mitocondrial e produção de radicais livres, (7) a ativação do sistema imune, (8) o aumento da expressão de determinados genes e (9) a morte neuronal (RODRIGO et al., 2005; TURNER et al., 2013).

O tecido cerebral tem um consumo relativamente elevado de oxigênio e glicose, se tornando quase que exclusivamente dependente da fosforilação oxidativa para a produção de energia (BROUNS e DEYN, 2009). A glicose, que chega aos tecidos pelo sangue, é o principal substrato utilizado pelo encéfalo na produção de energia, sendo transportada através da BHE e da membrana celular e logo convertida em piruvato no citosol por meio da via glicolítica anaeróbica. Por sua vez, o piruvato é transportado dentro da mitocôndria e convertido em acetil-CoA para fazer parte do ciclo do ácido tricarboxílico e enfim, por meio da fosforilação oxidativa, se obtém 30 ATPs de uma molécula de glicose (RICH, 2003).

A hipoperfusão cerebral severa restringe o fornecimento de substratos essenciais, e com isso, as células começam a sofrer os processos relacionados à falência energética. Com a redução da oferta de oxigênio, a célula é induzida à glicólise anaeróbica, responsável pelo acúmulo de lactato e aumento da acidose intracelular, podendo ainda desencadear outros mecanismos responsáveis pela produção de radicais livres (NICOLI et al., 2003).

A falência energética causa a disfunção das bombas que fazem o transporte de íons pela membrana celular, entre elas a de Na^+/K^+ -ATPase e a de Ca^{2+} -ATPase, gerando um desequilíbrio do gradiente iônico. O potencial de membrana celular é perdido e, sem conseguir permanecer em repouso, os neurônios e células da glia despolarizam, os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes são ativados, induzindo a liberação de grandes quantidades de aminoácidos excitotóxicos (em especial o glutamato) no espaço extracelular dos neurônios pré-sinápticos. A alteração da homeostase iônica compromete a liberação e captação dos neurotransmissores na fenda sináptica. O glutamato no meio extracelular promove a ativação de receptores ionotrópicos presentes na membrana celular pós-sináptica, como os N metil-D-aspartato (NMDA), Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol Propiônico (AMPA), cainato (KA) e demais receptores metabotrópicos. Esta ativação dos receptores gera a abertura dos canais de Ca^{2+} e conduz a um influxo de Ca^{2+} (DIMAGL et al., 1999) na célula, além de influxo de sódio e cloro, que conjuntamente com a água iniciam um edema citotóxico (Fig. 4) nos neurônios (DEB et al., 2010).

Com a falência da bomba de Na^+/K^+ -ATPase ocorre dissipação de sódio no gradiente resultando em reversão da troca dos íons $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, gerando ainda mais influxo de Ca^{2+} (Carini et al., 1994). Estes neurônios também despolarizam, causando mais influxo de Ca^{2+} e mais liberação de glutamato, o que leva à amplificação local do insulto isquêmico inicial (BROUNS e DEYN, 2009).

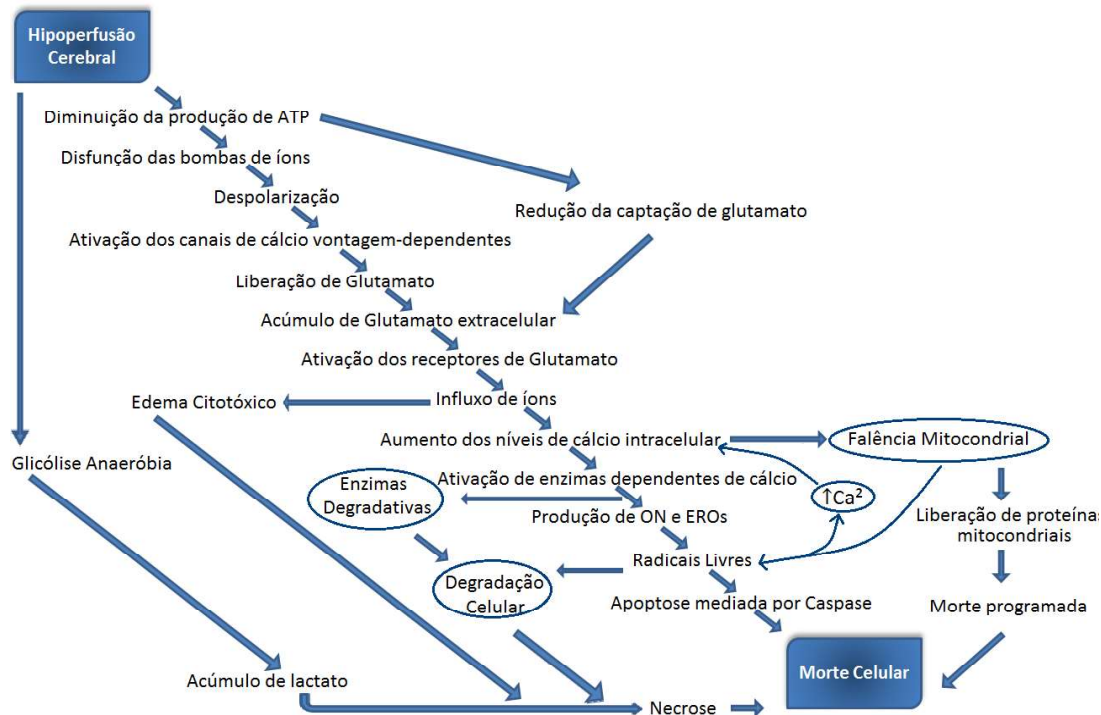


FIG. 4. Representação esquemática dos eventos fisiopatológicos que ocorrem na cascata isquêmica. ATP, adenosina trifosfato; NO, óxido nítrico; EROs, espécies reativas de oxigênio; Ca^{2+} , cálcio. Adaptado de BROUNS e DEYN, 2009.

O Ca^{2+} desempenha um papel único na fisiopatologia isquêmica, uma vez que provoca vários eventos nocivos pela ativação de uma grande variedade de enzimas dependentes de Ca^{2+} , incluindo a proteína quinase C, a fosfolipase A2, a fosfolipase C, a ciclooxigenase, o óxido nítrico sintase, a calpaina e várias proteases e endonucleases. Como resultado da ativação destes elementos, inicia-se a formação de produtos citotóxicos como a produção de radicais livres e leucotrienos, ocorre o dano mitocondrial irreversível, a inflamação e morte celular (MCILVOY, 2005). A calpaina e a óxido nítrico sintetase neuronal (Nnos) são duas enzimas dependentes de Ca^{2+} que ativam vias celulares de morte programada (FUJIKAWA, 2015). A ativação de fosfolipases e proteases pelo Ca^{2+} resulta em degradação da membrana e proteínas respectivamente, danificando a integridade celular e sobrevivência neuronal. A ativação das endonucleases acarreta a clivagem do DNA, conduzindo a outras alterações e potencialmente à morte celular (TURNER et al., 2013).

O influxo do Ca^{2+} promove o dano mitocondrial, o que agrava ainda mais a falência energética. A mitocôndria possui o mecanismo de sequestro de Ca^{2+} que leva ao aumento da concentração do Ca^{2+} na organela, causando a sua despolarização e consequente edema. Ainda, o dano pode ocorrer pela abertura do poro de transição

mitocondrial, estimulado por altas concentrações de Ca^{2+} , radicais livres e pela atividade da calpaína, o que permite a liberação de íons mitocondriais e citocromos no citoplasma, principalmente o Citocromo C, que pode dar início ao processo de morte celular por meio da ativação de caspases, que é um importante sistema enzimático apoptótico. A produção de radicais livres pela mitocôndria é um processo tóxico tanto para a organela quanto para a célula de uma forma geral, principalmente no momento da reperfusão (SMITH, 2004).

O glutamato também atua sobre os receptores metabotrópicos que sinalizam através da ativação da proteína G ligada à segundos mensageiros. Desta forma, um dos efeitos é a ativação da fosfolipase C para gerar inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) que, por sua vez, se liga ao receptor de IP3 no retículo endoplasmático (RE) causando a liberação do Ca^{2+} de dentro do RE no citosol (BODALIA et al., 2013). Além desse mecanismo, a proteína G também promove a ativação da fosfolipase A2 que gera ácido araquidônico, outro elemento que pode contribuir para a liberação do Ca^{2+} do RE. Na isquemia transitória de duração curta a moderada, os níveis de Ca^{2+} citosólico ou mitocondrial retornam ao normal tanto nas áreas vulneráveis como nas áreas mais resistentes. No entanto, após uma isquemia mais severa, os níveis de Ca^{2+} intracelular podem continuar elevados (NEUMAR, 2000).

Os radicais livres são moléculas altamente reativas com um ou mais elétrons que se apresentam de forma ímpar. Normalmente, os neurônios são expostos a um nível basal de estresse oxidativo mediado pelos radicais livres tanto de fonte endógena quanto de fonte exógena. Os principais radicais livres liberados durante a isquemia / reperfusão são o óxido nítrico (NO) e o superóxido, que podem reagir com o DNA, as proteínas e lipídios, causando danos e disfunções (FLOYD, 1997). O superóxido é um radical livre altamente reagente, e precursor da maioria das espécies reativas de oxigênio (EROs) (FUNAKOSHI et al., 2006). Em situações normais, os radicais livres são controlados por mecanismos protetores endógenos como as enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) e os removedores (do inglês *scavengers*) de radicais livres (glutathione, α -tocoferol, β -caroteno) (LOVE, 1999).

O superóxido é produzido na mitocôndria pelo metabolismo do oxigênio, por meio da cadeia de transporte de elétrons. O superóxido também pode ser gerado pelo metabolismo do ácido araquidônico por meio das vias de ciclooxigenase e lipooxigenase, que ocorre nos neurônios após a isquemia. O superóxido ainda pode

ser gerado pela xantina oxidase (LO et al., 2003). Os neurônios que contêm nNOS possuem uma vasta arborização e podem produzir NO suficiente para afetar uma grande população de neurônios circundantes (NEURMAR, 2000). Além disso, a membrana plasmática pode ter um envolvimento na produção de EROs pelo sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase após a isquemia. Esta enzima transporta elétrons através das membranas biológicas com a finalidade de reduzir o oxigênio molecular a superóxido (FUNAKOSHI et al., 2006).

Em suma, no contexto da isquemia cerebral existem várias fontes de radicais livres, incluindo o metabolismo oxidativo da mitocôndria, o metabolismo do ácido araquidônico, a ação da NADPH oxidase, a ação da NO sintase e ainda a xantina oxidase (CANDELARIO-JALIL, 2009). Os radicais livres podem causar peroxidação lipídica, danos à membrana, desregulação de processos celulares e até mutação no genoma. Na verdade, as EROs podem danificar qualquer componente celular, servindo como um importante sinalizador de moléculas que iniciam a inflamação e apoptose (DIMAGL et al., 1999).

A isquemia cerebral desencadeia cascatas inflamatórias no parênquima cerebral, que podem amplificar o dano tecidual pelos mais diversos mecanismos. Após alguns minutos do início da oclusão se iniciam mudanças na tensão e na produção de EROs que desencadeiam uma cascata de coagulação e a produção de mediadores inflamatórios como o fator de ativação plaquetária, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 1 β (IL-1 β). A liberação das citocinas inflamatórias IL-1 β e o TNF- α pelos neurônios e células da glia iniciam a produção de moléculas de adesão (selectinas, integrinas, molécula de adesão intercelular 1) na vasculatura. A molécula de adesão selectina P é deslocada até a superfície da membrana de plaquetas e células endoteliais (YILMAZ e GRANGER, 2010) e rapidamente são gerados sinais inflamatórios. Após a expressão de moléculas de adesão, os neutrófilos do sangue começam a migrar para o parênquima cerebral, seguido por macrófagos e monócitos. Considerando que a obstrução microvascular por neutrófilos, fibrinas e plaquetas pode piorar o grau de isquemia, a produção de mediadores tóxicos pelas células inflamatórias ativadas e neurônios lesionados (as citocinas, o óxido nítrico, o superóxido e prostanóides) podem aumentar o dano tecidual (EMERICH et al., 2002), resultando em rompimento da BHE e a formação de edema vasogênico (HAN e YENARI, 2003).

O estresse oxidativo das células endoteliais reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico, que é um potente vasodilatador e um inibidor da agregação de plaquetas e adesão leucocitária (YILMAZ e GRANGER, 2010). Além disso, o estresse oxidativo e os mediadores inflamatórios também alteram a permeabilidade da BHE. As proteases são expressas e liberadas pelos leucócitos, enquanto ocorre “*downregulation*” nas proteínas de junção que vedam as células endoteliais adjacentes, facilitando o extravasamento de proteínas e células através da via paracelular (ENGELHARDT e SOROKIN, 2009). No espaço perivascular, a isquemia e reperfusão ativa macrófagos e mastócitos. A degranulação dos mastócitos liberam mediadores vasoativos, como histaminas, proteases e fator de necrose tumoral, enquanto os macrófagos ativados liberam citocinas pró-inflamatórias (LINDSBERG ET AL., 2010). Esses mediadores inflamatórios contribuem com a expressão endotelial de moléculas de adesão e com o dano da BHE, que promove a infiltração de leucócitos (Fig.5) (neutrófilos, linfócitos e monócitos) (KONSMAN ET AL, 2007).

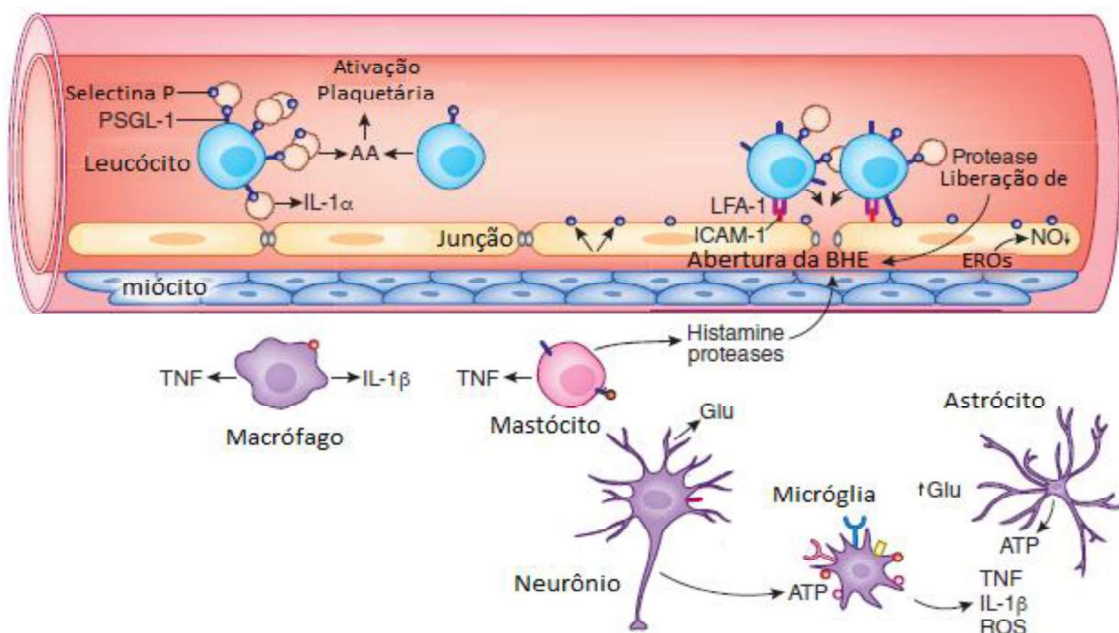


FIG.5. Eventos vasculares, perivascular e parenquimais conduzidos pela isquemia e reperfusão. A isquemia e reperfusão iniciam a coagulação sanguínea dentro do vaso junto à agregação plaquetária e liberação de citocina IL - 1 α . O deslocamento da selectina P na superfície das plaquetas e células endoteliais iniciam a agregação leucocitária. Os complementos são ativados e metabólitos do ácido araquidônico são liberados. Na parede vascular, a *upregulation* da selectina P nas células endoteliais proporciona uma plataforma de ligação com o leucócito por meio da interação com as glicoproteínas expressadas nos leucócitos como a PSGL-1 (*glicoproteína ligante de Pselectina* 1). A adesão é obtida

após a expressão endotelial de ICAM (*molécula de adesão* intercelular-1) interagindo com as integrinas (LFA-1) do leucócito. A perda de NO promove vasoconstrição e aumenta a agregação plaquetária e leucocitária. A ativação de metaloproteases pode levar à disfunção da BHE e proteólise da matriz, facilitando o extravasamento leucocitário. No espaço perivascular ocorrem reações que fazem os mastócitos degranularem e liberarem histaminas e proteases, contribuindo com o rompimento da BHE. As citocinas (TNF, IL-1 β) são produzidas pelos mastócitos e macrófagos perivasculares fornecendo mais sinais para a migração de leucócitos através da parede do vaso. No parênquima cerebral, as células lesadas liberam ATP, que atuam como sinais pró-inflamatórios conduzindo a produção de mais citocinas. Ocorre a disfunção da interação do neurônio e da microglia e aumento do glutamato (Glu) extracelular. Adaptado de IADECOLA e ANRATHER, 2011.

Os dois maiores sistemas de proteases que modulam a matriz neurovascular são o ativador de plasminogênio e as metaloproteinases de matriz. O aumento da secreção de citocinas e proteases, como as metaloproteinases, leva à ruptura adicional da matriz extracelular e da BHE, causando hemorragia e lesão tecidual (LO et al., 2003; DURUKAN e TATLISUMAK, 2007). A BHE tem uma função tanto física quanto metabólica essencial à sobrevivência, e dependente da interação endotelial com os astrócitos e a matriz neurovascular. A interrupção desta matriz leva à ruptura da sinalização entre as células que mantêm a homeostase neurovascular.

A perturbação da integridade das vias de transporte da BHE durante a após a isquemia pode significar alterações na permeabilidade da mesma e consequentemente a exacerbação do edema vasogênico. A permeabilidade é controlada por complexos de proteínas que possuem junções oclusivas (do inglês "*tight junction*"), as quais ficam localizadas entre as células endoteliais, atuando para limitar a difusão paracelular (SANCHEZ-COVARRUBIAS et al., 2014). A produção de EROs, e subsequente estresse oxidativo, altera a expressão e organização molecular das proteínas "*tight junction*", levando ao aumento do vazamento do soluto paracelular (LOCHHEAD et al., 2010).

Em resumo, os danos causados ao endotélio vascular, a toxicidade causada pelas moléculas inflamatórias, os radicais livres, e em especial, a destruição da lâmina basal pelas metaloproteinases de matriz são as potenciais causas de disfunção da BHE que iniciam o edema vasogênico, o influxo de substâncias tóxicas, a inflamação e até as complicações hemorrágicas (DURUKAN e TATLISUMAK, 2007). A resposta inflamatória induz a formação de cicatriz em torno do tecido lesado, sendo que o componente fibrótico é produzido principalmente por células residentes, em geral

astrócitos e também por fibroblastos invasores que produzem colágeno e fibronectina. Por um lado, esses agentes também permitem a reparação da BHE, porém essa formação cicatricial se torna uma barreira física da regeneração tecidual (KAWANO et al., 2012).

2.2.2 O Sistema Glutamatérgico

O ácido glutâmico é um aminoácido não essencial, ou seja, o metabolismo é capaz de produzi-lo a partir de outros metabólitos, podendo ser sintetizado a partir da glutamina ou do α -cetoglutarato por transaminação (SCHOUSBOE e WAAGEPETERSEN, 2005). Os ânions carboxilato e os sais de ácido glutâmico são conhecidos como glutamato (NENG-WEI et al., 2012), um dos principais neurotransmissores excitatórios no sistema nervoso central (SNC) que controla várias funções sinápticas e celulares, aprendizagem e memória (WANG e QIN, 2010). O nível de glutamato no encéfalo dos mamíferos é 1000 vezes maior que outros importantes neurotransmissores, como a dopamina ou serotonina (KOSTANDY, 2012). A maioria das células do encéfalo utiliza o glutamato como neurotransmissor para realizar as sinapses podendo este também servir de fonte energética na ausência de glicose (OKUBO et al., 2010). Embora o glutamato tenha funções fisiológicas importantes no SNC, sugere-se que também faça parte do processos fisiopatológicos de várias doenças, tais como a epilepsia, as desordens neurodegenerativas e nos processos de morte neuronal por isquemia no AVC (KHANNA, 2015).

Apenas as células que possuem o receptor de glutamato em sua superfície são sensíveis à ação deste neurotransmissor, que liga-se às proteínas receptoras, e ativa-as para exercer sua função sinalizadora (NENG-WEI et al., 2012). Os receptores de glutamato estão expressos na membrana plasmática de uma ampla variedade de neurônios e células gliais. Em condições fisiológicas, a liberação e a absorção do neurotransmissor glutamato ocorre de uma maneira fortemente controlada dentro dos limites de uma sinapse tripartite que é composta pelo neurônio pré-sináptico, neurônio pós-sináptico e astrócitos (KHANNA, 2015).

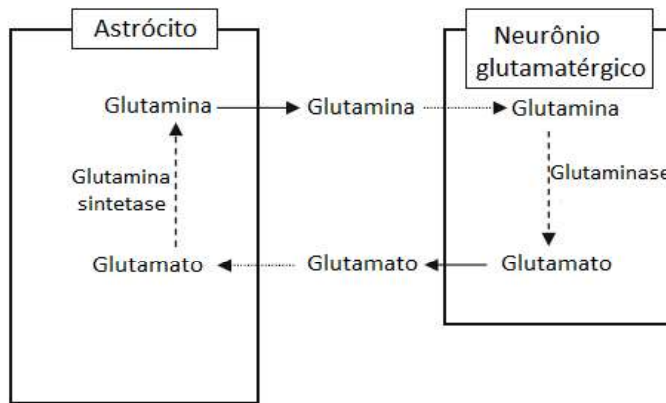


FIG.6. Representação esquemática da principal via de reciclagem glutamato-glutamina que ocorre no neurônio e no astrócito. A glutamina é transportada até o neurônio e convertida em glutamato pela glutaminase, o glutamato ao ser liberado é recaptado pelo astrócito e convertido em glutamina pela glutamina sintetase. Adaptado de KOSTANDY, 2012.

Após ser liberado pelas terminações pré-sinápticas, o glutamato é transportado aos astrócitos, onde é convertido em glutamina por meio da ação da glutamina sintetase. A glutamina é então estocada nas células gliais (em sua forma inativa) até que seja requisitada pelos neurônios glutamatérgicos. Ela é, então, transformada em glutamato, no neurônio pré-sináptico, por meio da ação da glutaminase (uma enzima mitocondrial) (Fig.6) (OKUBO et al., 2010).

A liberação de glutamato pelas vesículas pré-sinápticas do neurônio glutamatérgico ocorre por exocitose através dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente, ou seja, é desencadeada uma despolarização das sinaptossomas, os canais de Ca^{2+} se abrem e com a entrada de íon Ca^{2+} ocorre a estimulação da liberação vesicular, lançando o glutamato na fenda sináptica (NICHOLLS e ATTWELL 1990). Depois da atuação do neurotransmissor sobre os receptores dos neurônios pós-sinápticos, o glutamato restante na fenda sináptica é removido da fenda por uma família de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). Os EAAT1, EAAT2 são transportadores presentes nas membranas das células gliais e os EAAT3, EAAT4 e EAAT5 nos neurônios (Fig.7). O EAAT2 é amplamente reconhecido como o principal transportador, capaz de remover até 90% do glutamato residual da fenda (DAMBOLT, 2001).

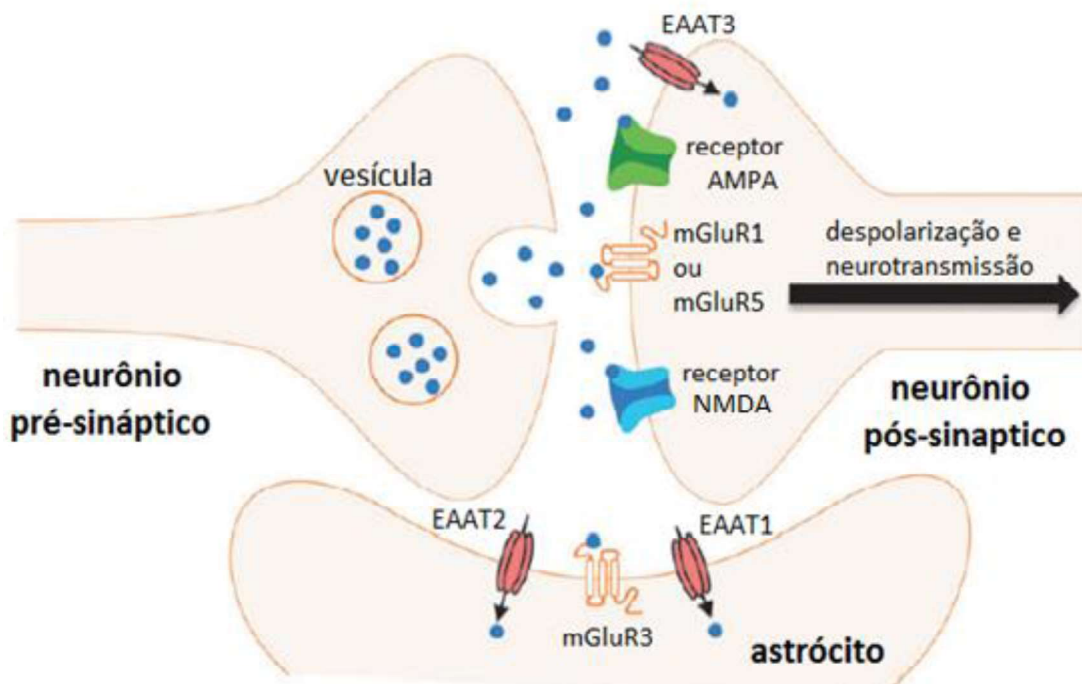


FIG.7. Representação esquemática das sinapses tri-partite (terminais pré-sinápticos e pós-sinápticos dos neurônios glutamatérgicos e astrócito circundante). A despolarização faz com que o terminal pré-sináptico libere as vesículas contendo glutamato na fenda sináptica para ser captado pelos receptores de glutamato ionotrópicos (AMPA, NMDA) e metabotrópicos nos neurônios pós-sinápticos (mGluR1 e mGluR5) e nos astrócitos (mGluR3), a fim de dar continuidade à neurotransmissão. O glutamato restante é captado pelos transportadores de aminoácidos excitatórios do astrócito (EAAT2 e EAAT1) e dos neurônios (EAAT3) e estocado para sua reutilização. Adaptado de KHANNA, 2015.

2.2.3 Excitotoxicidade Glutamatérgica

Em condições fisiológicas, os neurônios são expostos a quantidades pequenas e transitórias de glutamato, que é reciclado pelos eficientes mecanismos de recapitação. Durante a isquemia os neurônios pós-sinápticos são submetidos a estimulação glutamatérgica excessiva devido à elevação do glutamato no espaço extracelular, ocorrendo a superestimulação dos seus receptores (NISHIZAWA, 2001). Os principais receptores responsáveis pela entrada de Ca^{2+} na célula são os NMDA (CHOI, 1987). Ainda, a expressão dos transportadores de glutamato EAAT1 e EAAT2 nos astrócitos é rapidamente reduzida, iniciando um acúmulo de substrato no espaço extracelular (KETHEESWARANATHAN et al., 2011).

As condições isquêmicas, somadas à falta de ATP, desencadeiam o colapso do gradiente eletroquímico de Na^+/K^+ , e como resultado, os transportadores de

glutamato operarão em uma direção inversa, sendo este o processo sugerido como o principal mecanismo responsável pelo acúmulo de glutamato (ROSSI et al., 2000). Como consequência, ocorre a estimulação excitotóxica dos receptores de glutamato (Fig.8) resultando em despolarizações crônicas e manutenção continuada do influxo de Ca^{2+} (KHANNA, 2015). A este conjunto de ações que levam ao dano e até mesmo à morte celular chamamos de excitotoxicidade, ocorrendo principalmente como consequência de uma forte e prolongada ativação de receptores pós-sinápticos de glutamato (MELDRUM et al., 1985).

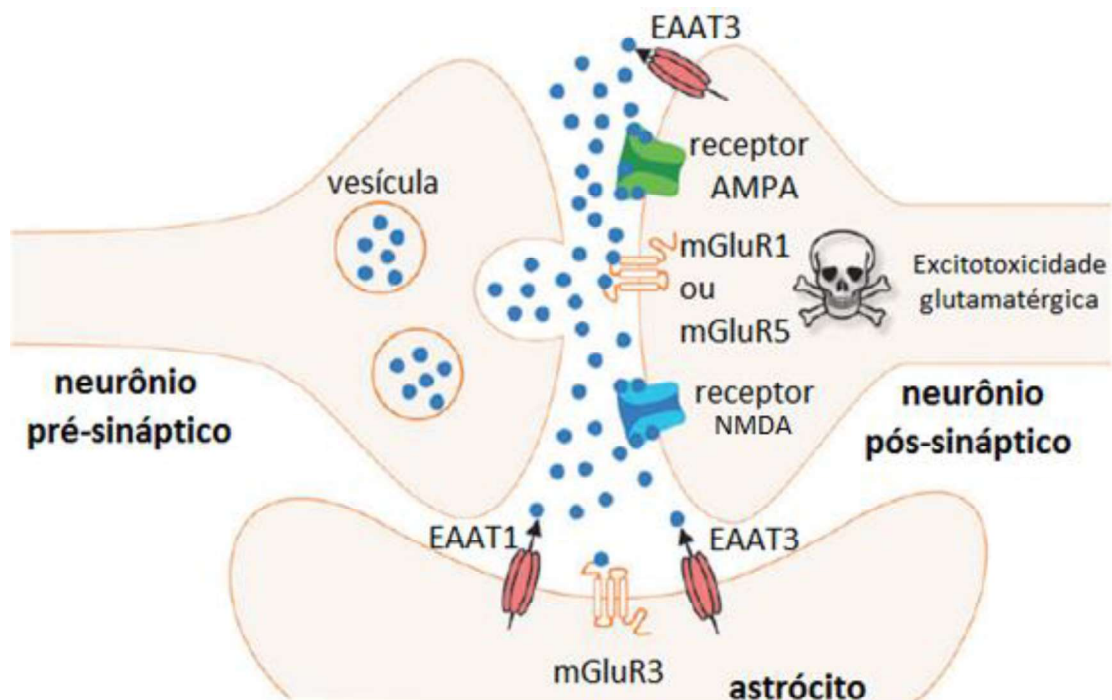


FIG.8. Representação esquemática da fisiopatologia da excitotoxicidade glutamatérgica. A disfunção energética inicia a falha dos mecanismos dos transportadores de glutamato na fenda sináptica, resultando em acúmulo de glutamato, despolarizações consecutivas, influxo de Ca^{2+} e morte celular. Adaptado de KHANNA, 2015.

O glutamato age por duas principais classes de receptores, os receptores de glutamato ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs compreendem os receptores NMDA, AMPA e KA, já os mGluRs são compostos por 8 subtipos (MEHTHA et al., 2013; LAU e TYMIANSKI, 2010). Os mGluRs são moléculas ligadas a sistemas de segundos mensageiros por meio da proteína G, modulando diversas atividades celulares. Atualmente, se conhece oito diferentes tipos de mGluR, que vão de mGluR1-8, sendo classificados em três grupos (grupos I, II e III) com base na homologia e os seus efeitos intracelulares (LAU e TYMIANSKI, 2010). O Grupo I

compreende os mGluR1 e mGluR5 e estão ligados à ativação de fosfolipase C, cujos efeitos incluem a produção de trifosfato de inositol e posterior mobilização de Ca^{2+} intracelular. No Grupo II têm-se os mGluR2 e mGluR3 que modulam a atividade da sinalização da adenilato ciclase, uma vez que a redução desta pode acarretar na inibição dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes. Esses receptores são encontrados tanto nos terminais pré e pós-sinápticos quanto nas células gliais. No Grupo III estão os mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8, que possuem funções similares ao Grupo II (OZAWA et al., 1998).

Os iGluRs são canais iônicos transmembranares constituídos por um complexo de diferentes subunidades que, em diferentes combinações, ao serem ativados, se tornam permeáveis aos íons Na^+ , Ca^{2+} e K^+ . Os receptores NMDA tem uma vasta participação em vários processos como a aprendizagem e memória e são formados pela combinação de três subunidades diferentes que são NR1, NR2 e NR3. Os receptores NMDA são altamente permeáveis ao Ca^{2+} e ao serem ativados permitem grande influxo deste íon para a célula. A despolarização da membrana faz com que o receptor NMDA libere o magnésio que bloqueia o canal quando está em potencial de repouso, permitindo a passagem do Ca^{2+} através do poro (SPANDOU et al., 2007).

Os receptores KA são compostos de subunidades GluR5-7 (baixa afinidade) e KA1-2 (alta afinidade) e suas propriedades são semelhantes às do receptor AMPA, que permite o fluxo dos íons diretamente após a liberação do glutamato, embora sejam, em sua maioria, impermeáveis ao Ca^{2+} (LAU e TYMIANSKI, 2010). Os receptores AMPA tem menor afinidade pelo glutamato e participam da neurotransmissão rápida na maioria das sinapses excitatórias no SNC, sendo mais permeáveis ao sódio e potássio que ao Ca^{2+} (OZAWA et al., 1998). Estes receptores são constituídos por uma combinação de quatro subunidades conhecidas como GluR1-4 derivados de um único gene, porém com diferentes permeabilidades ao Ca^{2+} .

Cada subunidade de GluR ocorre em duas isoformas distintas que são a “flip” e a “flop”, variando em sua distribuição pelas regiões do encéfalo. A forma “flip” predomina na área C3 do hipocampo enquanto a “flop” é mais expressada na área CA1 do hipocampo e no neocórtex (SOMMER et al., 1990). Os receptores que expressam as subunidades GluR1 e GluR3 conduzem melhor o Ca^{2+} , já o GluR2 é completamente impermeável (Fig. 9), fazendo com que a sua presença no receptor module o influxo de Ca^{2+} e Zn^{2+} (PELLEGRINI-GIAMPIETRO, 2003). Isto se deve ao fato da subunidade GluR2 possuir uma arginina (R) no domínio transmembrana 2 em

vez de uma glutamina (Q) (BURNASHEV et al, 1992). Os principais neurônios excitatórios como as células piramidais do hipocampo e neocortex e as células granulosas do giro dentado expressam mRNA para GluR2 em abundância e demonstram baixa permeabilidade ao Ca^{2+} (TANAKA et al, 2000).

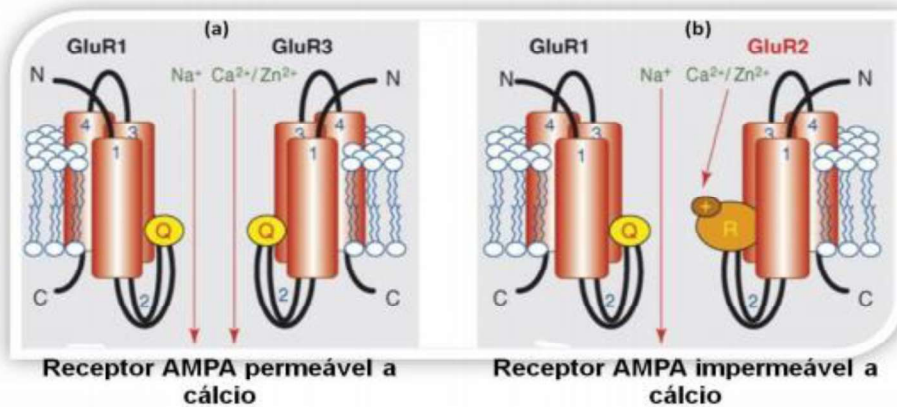


FIG.9. Permeabilidade ao cálcio dependente da composição das subunidades relativa aos receptores AMPA. A ausência da subunidade GluR2 permite a permeabilidade ao cálcio (a), contanto, a presença do GluR2 no receptor o limita o influxo de cálcio e zinco (b). Adaptado de LIU e ZUKIN, 2007.

2.2.4 Implicações da expressão proteica do GluR2 – “*The GluR2 Hypothesis*”

No SNC, cerca de 100% do RNA mensageiro que codifica o GluR2 é editado no local Q / R correspondente ao resíduo 607, onde o códon para glutamina (Q607) é convertido no códon de arginina (R) (JONAS e BURNASHEV et al., 1995). As subunidades de GluR2 editadas formam canais impermeáveis ao Ca^{2+} , enquanto que as subunidades que ainda não foram editadas permitem a entrada do íon (GEIGER et al., 1995). O mRNA do GluR2 é expresso de forma abundante nos principais neurônio excitatórios hipocampusais, neocorticais, nas células piramidais e nas células granulares do giro dentado, apresentando baixa permeabilidade ao Ca^{2+} nos receptores AMPA. Desta forma, qualquer alteração na expressão de GluR2 pode gerar consequências fisiológicas significativas (TANAKA et al., 2000).

A “*upregulation*” ou “*downregulation*” do GluR2 contribui para a fisiopatologia da isquemia de diferentes formas. Por exemplo: após a isquemia, ocorre a diminuição da expressão da subunidade GluR2 impermeável ao Ca^{2+} nos receptores AMPA, tornando este receptor permeável ao íon e provocando o influxo de Ca^{2+} e possíveis efeitos deletérios (PELLEGRINI-GIAMPIETRO et al., 1992). A presença do GluR2

reduz a permeabilidade do Ca^{2+} nos canais AMPA, as alterações nas propriedades funcionais deste receptor parecem ser uma consequência direta da alteração na expressão do gene. A supressão do mRNA do GluR2 é detectável nos neurônios vulneráveis 12 horas após a isquemia e continua diminuindo em 30% dos níveis controles nas 24 horas seguintes, indicando que a “*downregulation*” do mRNA do GluR2 está diretamente relacionada ao dano neuronal (TANAKA, et al 2000). Um estudo mostra que isquemia transitória reduz os níveis de mRNA para GluR2 nos neurônios da área CA1 do hipocampo, sugerindo a “Hipótese do GluR2”. Esta hipótese afirma que a expressão reduzida de GluR2 permite a entrada de Ca^{2+} através dos canais do receptor AMPA, induzindo a morte dos neurônios piramidais da área CA1, e relaciona diretamente a lesão celular provocada pela isquemia com a diminuição da expressão de GluR2 (GORTER et al, 1997). Os receptores AMPA que possuem GluR2 também são impermeáveis ao Zn^{2+} . Na ausência do GluR2, o Zn^{2+} passa para o meio intracelular, contribuindo na degeneração. Existem evidências de que o influxo de Zn^{2+} pode ser um componente nos processos que levam à morte celular após a isquemia cerebral transitória (KOH et al, 1996).

2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ISQUEMIA CEREBRAL

Os modelos experimentais aplicados em animais foram desenvolvidos a fim de simular a condição patológica que ocorre nos seres humanos podendo assim, os pesquisadores, desenvolverem seus estudos sobre os mecanismos causadores da lesão cerebral, conseguindo lesões homogêneas e reprodutíveis, com variabilidade mínima a fim de maximizar a confiabilidade dos dados, e assim, raciocinar sobre novas abordagens de prevenção, tratamento e neuroproteção cerebral (ALONSO DE LECINAÑA et al., 2005). Ainda que os estudos iniciais sobre o AVC tenham utilizado outras espécies mais complexas, atualmente, o panorama científico da maioria das experiências se realiza em animais pequenos, tais como o rato e o camundongo, por serem animais de baixo custo e maior aceitação do ponto de vista ético, em comparação aos animais de maior porte. Além do mais, os roedores possuem sua anatomia e fisiologia vascular cerebral semelhante à dos humanos, tornando esses animais os mais comumente usados nos estudos sobre isquemia (MHAIRI MACRAE, 1992).

Tendo em vista que os modelos animais de isquemia são fundamentais para a compreensão dos mecanismos que implicam na lesão cerebral (BACIGALUPPI et al., 2010), foram desenvolvidos vários deles ao longo do tempo, reproduzindo tanto a isquemia transitória como a permanente, podendo ser esta focal ou global (GROTTA, 1995). É possível ainda, desta forma, variar os mecanismos fisiopatológicos desencadeados, bem como o tamanho da lesão isquêmica e suas repercussões. Os modelos de isquemia permanente possibilitam estudar a lesão cerebral sem o efeito da reperfusão. Já, nos modelos de isquemia transitória, que é o que ocorre na maioria dos seres humanos que sofreram um AVC, é permitido avaliar o efeito da reperfusão no território cerebral afetado (GURSOY-OZDEMIR et al., 2004). Não existe um modelo de isquemia considerado ideal, pois até mesmo as condições do ser humano que sofre o AVC são variáveis. O primeiro aspecto a se considerar para a eleição do modelo experimental empregado em uma pesquisa deve responder ao seguinte questionamento sobre o quanto este modelo é relevante na investigação do problema clínico em questão (LI e FISHER, 2001).

Dentre os modelos existentes, pode-se citar a oclusão de quatro vasos (4VO), que combina a oclusão permanente das artérias vertebrais por eletrocauterização com a oclusão reversível das artérias carótidas, ocasionando isquemia bilateral com reperfusão vascular (PULSINELLI e BRIERLEY, 1979). Esse procedimento deve resultar em perda completa do reflexo de endireitamento do animal, apresentando uma taxa de sucesso de aproximadamente de 50% a 75%.

A isquemia global pode ser induzida também pelo modelo de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns, chamado de modelo de oclusão de 2 vasos (2VO) (SHIBATA et al., 2004; YOSHIZAKI et al., 2008), pode ser permanente ocasionando a hipoperfusão ou transitório, caracterizando o período de reperfusão. Este modelo ocasiona a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral, e é uma alternativa frequentemente utilizada ao modelo de 4VO (JIWA et al., 2010). A hipoperfusão cerebral resulta em processos neurodegenerativos e comprometimento cognitivo (CECHETTI et al., 2010; CECHETTI et al., 2012) podendo se observar uma lesão seletiva na região CA1 do hipocampo, caudado, putâmen e neocortex (SMITH et al., 1984), mas sem ocasionar dano encefálico severo, tampouco comprometimento motor subsequente. O modelo convencional de 2VO, no qual a oclusão permanente das

carótidas é realizada ao mesmo tempo (FARKAS et al., 2007), apresenta uma abrupta redução do fluxo sanguíneo cerebral, ocasionando uma taxa de mortalidade em torno de 50% (FARKAS et al., 2005) dos animais, quando comparado a outros métodos de lesão isquêmica frequentemente utilizados. Neste sentido, a utilização do modelo de 2VO modificado se faz necessário, visto que neste procedimento realiza-se a oclusão das artérias carótidas com um intervalo de uma semana entre cada artéria, promovendo-se a hipoperfusão de forma gradual. O déficit cognitivo é semelhante ao encontrado no protocolo original, entretanto, a taxa de sobrevivência é significativamente superior, em torno de 92% (CECHETTI et al., 2010; CECHETTI et al., 2012).

2.4 AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA E APRENDIZADO EM ANIMAIS

A memória se constitui da aquisição, formação, conservação e evocação de informações e, de acordo com a função, pode se conceituar alguns tipos de memórias que são a memória de trabalho e a de curta duração que são breves, e a memória de longo prazo, responsável pela retenção de informações. Desta forma, se explica a importância da memória no processo de aprendizagem (IZQUIERDO, 2002). A nível neurofisiológico, as memórias se concretizam por meio da liberação de neurotransmissores entre os neurônios em determinadas regiões do encéfalo (IZQUIERDO, 2003), produzindo alterações estruturais no sistema nervoso a partir do aprendizado de novas informações e o seu armazenamento (DALMAZ e NETTO, 2004).

O hipocampo é uma estrutura relacionada com a aprendizagem e memória espacial e altamente suscetível à isquemia, logo, uma semana após a indução da isquemia pelo modelo 2VO, é possível observar os danos cognitivos característicos à neurodegeneração (OHTAKI et al., 2006). A integridade do hipocampo é necessária para aquisição e recuperação de informações espaciais, bem como para a consolidação e armazenamento destas e, em conjunto às áreas do córtex com as quais se conecta, é capaz de consolidar as memórias de curta e longa duração (UNSWORTH e ENGLE, 2007). A memória de trabalho é uma memória imediata, classificada também como de curto prazo, responsável por absorver as informações de acordo como estas vão surgindo (IZQUIERDO, 2006). A informação é mantida por

apenas alguns segundos ou minutos, logo, não é retida. A memória de trabalho regula informações pelo córtex frontal e suas conexões com outras estruturas. De certa forma, não é uma memória propriamente dita, pois a informação é mantida por um determinado tempo, até que seja útil e então é descartada (IZQUIERDO, 2002). É um sistema capaz de regular e manipular as informações temporariamente durante a execução de tarefas cognitivas complexas (ALLOWAY, 2006), logo, a disfunção desta memória está relacionada a dificuldades específicas na aprendizagem (MAEHLER e SCHUCHARDT, 2009)

A memória de curta duração é desenvolvida no hipocampo e no córtex entorrinal perdurando por no máximo seis horas, podendo ou não se tornar permanente (IZQUIERDO et al., 1998). Caracteriza-se pela transição da informação mantendo-a disponível enquanto for necessária até que possa se formar a memória de longa duração, que pode durar meses ou anos. Ambas as memórias necessitam das mesmas estruturas, mas agem por meios de mecanismos diferentes (MONCADA e VIOLA, 2007).

A memória de referência é uma memória de longa duração e está relacionada com a atividade cerebral responsável por lembrar informações já consolidadas como lugares e posições espaciais (CECHETTI et al., 2010). As associações aprendidas neste contexto podem ser utilizadas a qualquer momento e independem dos aspectos temporais (OLTON, 1990).

Os danos ao hipocampo causam déficit na aprendizagem espacial que diz respeito à memória para localização e às relações espaciais (BLUE et al., 2013). Um dos testes amplamente aceitos para avaliar a habilidade de aprendizagem espacial relacionada ao hipocampo é o Labirinto Aquático de Morris (MORRIS, 1984), sendo este composto por pistas viso-espaciais e motivação aversiva pelo fato da tarefa ser realizada na água. A integridade hipocampal está intimamente atrelada com o desempenho dos roedores nesta tarefa (JIWA, et al., 2010). A função do hipocampo na aprendizagem espacial parece depender de suas ligações com o córtices entorrinal e perirrinal e a lesão nessas áreas mostra dificuldade na performance no Labirinto Aquático de Morris (LIU e BILKEY, 1998; ROOF et al., 1993). O prejuízo da aquisição de habilidades parece estar relacionado com a lesão no córtex pré-frontal de roedores (MORGENSEN et al., 1995). Ainda, parece haver a participação do hipocampo, do córtex frontal e medial na formação da memória espacial e de trabalho. Várias evidências apontam o déficit de memória de referência e de trabalho em ratos após

isquemia, conforme avaliados pelo Labirinto Aquático de Morris (ANASTÁCIO et al., 2014; CECHETTI et al., 2012).

2.5 NEUROPROTEÇÃO FARMACOLÓGICA: FITOESTRÓGENOS E COUMESTROL

As intervenções neuroprotetoras, em casos de AVC, tem o propósito de agir nos mecanismos intracelulares da cascata isquêmica, visando a restauração da zona de penumbra (MARKUS et al., 2004). Ao longo dos anos várias formas de neuroproteção farmacológica vêm sendo pesquisadas, com o intuito de evitar ou diminuir a extensão do dano provocado no processo isquêmico no encéfalo. Nesta perspectiva, temos agentes antitrombóticos, antiplaquetários, bloqueadores dos canais de Ca^{2+} , quelantes de Ca^{2+} , removedores de radicais livres, antioxidantes, antagonistas GABA, antagonistas competitivos e não competitivos NMDA, antagonistas AMPA, antagonistas locais de glicina, antagonistas locais de poliaminas, fatores de crescimento, bloqueadores de inflamação, bloqueadores de canais de sódio e potássio, inibidores de óxido nítrico, antagonistas serotonérgicos, antagonista de opióides, sulfato de magnésio, ácido úrico, dapsona, cromoglicato, estatinas, ciclosporina A, (AURIEL e BORNSTEIN, 2010; KAUR et al., 2013) terapia hormonal estrogênica (ALKAYED et al., 2000; DUBAL et al., 1998), terapia fitoestrogênica (CASTRO et al., 2012; WANG ET AL., 2013; ANASTÁCIO et al., 2014; CASTRO et al., 2014;), entre outros.

De acordo com os estudos pré-clínicos, mais de 100 agentes neuroprotetores tem demonstrado efeitos positivos para o tratamento da isquemia focal, mas nenhum tem provado ser benéfico para os estudos clínicos, sugerindo que as pesquisas na área devem continuar, pois estas contribuem para a formação de uma base sólida para fins de compreensão dos mecanismos biológicos fundamentais da lesão isquêmica (DURUKAN e TATLISUMAK, 2007).

Os estrógenos são hormônios que possuem vários efeitos no metabolismo e manutenção das funções reprodutoras, regulam processos fisiológicos e patológicos do corpo e também influenciam no sistema imune bem como no SNC (WARNER e GUSTAFSSON, 2014). O estradiol tem sido particularmente bem estudado numa variedade de modelos animais e *in vitro* de lesão. Seus efeitos tem sido demonstrados

como neuroprotetores, promovendo sobrevivência às células que passam pelo processo isquêmico (ALKAYED et al., 2000; DUBAL et al., 1998), e reduzindo os danos de memória associados à isquemia global (WAPPLER et al., 2010). Além disso, é responsável por aumentar a densidade dos espinhos dendríticos e o número de sinapses (SATO et al., 2007) e sustentar a conectividade sináptica pela ativação do receptor NMDA (SRIVASTAVA et al., 2008). O estrogênio e seus agonistas modulam as vias de sinalização celular por meio da ligação com os receptores de estrogênio (Fig. 10), conhecidos com ER α e ER β (CHAKRABARTI et al., 2014). Cada isoforma do receptor de estrogênio regula um conjunto específico de efeitos fisiológicos ou comportamentais uma vez que se encontram distribuídos no encéfalo em diferentes regiões (SHUGHRUE et al., 1997). A neuroproteção pelo estradiol envolve interações com os ER associados à membrana e com os ERs intracelulares para ativar as vias de sinalização celular e promover a sobrevivência neuronal (LEBESGUE et al., 2009).

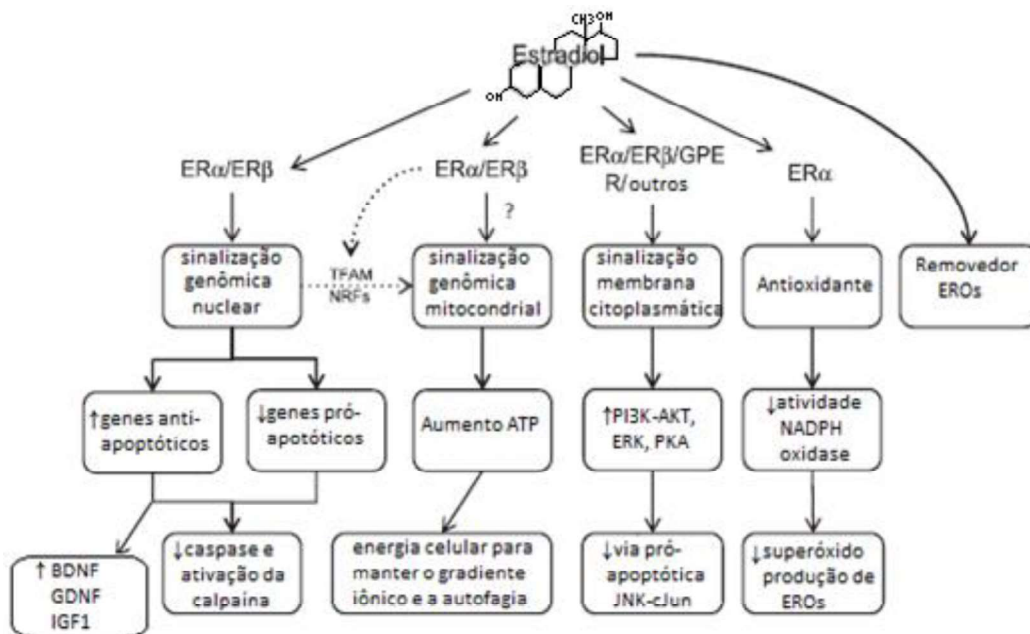


FIG. 10. Resumo dos mecanismos que envolvem a neuroproteção pelo estrogênio. As ações do estrogênio na mitocôndria são mediados, em parte, pelo aumento na transcrição nuclear do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) e dos fatores respiratórios nucleares (NRF). BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; GDNF: fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais; IGF: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; ATP: trifosfato de adenosina; PI3K/Akt: fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; PKA: proteína quinase A; JNK-cJun: quinase c-Jun N-terminal; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; EROs: espécies reativas de oxigênio; ER α : receptor de estrogênio α ; ER β : receptor de estrogênio β . Adaptado de SCHREIHOFFER e MA, 2013.

Vários estudos demonstraram que o estradiol, bem como outros hormônios esteróides pode, em minutos ou segundos, influenciar a fisiologia celular em vários tipos de células de tecidos reprodutivos ou não reprodutivos, por meio da ativação de uma diversificada gama de mecanismos de sinalização intracelular (FALKENSTEIN et al., 2000), que envolvem (1) a sinalização genômica, (2) a sinalização não- genômica, (3) ações antioxidantes e (4) de regulação bioenergética mitocondrial (SCOTT et al., 2012). Em relação à sinalização genômica, o estradiol é uma molécula lipofílica que se difunde através da membrana da célula e liga-se ao ER no citosol. E então, ocorre o deslocamento do complexo Estradiol-ER para o núcleo, a fim de regular a transcrição dos genes (FIOCCHETTI et al., 2012), induzindo a expressão de genes neuroprotetores como as proteínas anti-apoptóticas que atuam na inibição das caspases, regulam o deslocamento do citocromo C, previnem a fragmentação do DNA e aumentam a secreção de fatores neurotróficos como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF) e os receptores de fatores de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (CHOI et al., 2004; RAU et al., 2003; AMANTEA et al., 2005).

A neuroproteção também pode ser mediada por meio da sinalização não genômica. Os receptores de estrogênio presentes em estruturas extranucleares desenvolvem funções mediando rápidos efeitos de sinalização do estrogênio em neurônios pela regulação das vias de sinalização das quinases, da sinalização do Ca^{2+} e da ativação / inativação de proteínas celulares importantes (WU e CHEN, 2011). A sinalização não-genômica pelo estradiol pode também envolver o núcleo, exercendo uma regulação genômica. Os mecanismos que direcionam os receptores de estrogênio para a membrana e/ ou outras regiões extranucleares não são inteiramente elucidados (SCOTT et al., 2012). Uma das vias não genômicas mais estudadas implica no funcionamento do estradiol que ao se ligar no receptor de estrogênio extranuclear rapidamente promove ativação e fosforilação das *quinases* reguladas por sinal extracelular (ERK) e a via fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) – Akt nos neurônios (SANTEN et al., 2010). Uma vez ativada, a ERK pode fosforilar/regular mais de 100 alvos, incluindo a transcrição de fatores, proteínas do citoesqueleto e quinases nucleares (RAMOS, 2008). A ativação da ERK está relacionada com a regulação de várias funções celulares importantes como a sobrevivência, o metabolismo e a proliferação. A Akt, que também pode ser reconhecida como quinase B, é uma

proteína que promove a sobrevivência celular inibindo a via de sinalização pró-apoptótica JNK-cjun (RAMOS, 2008; WANG, 2006). A via JNK é conhecida por fosforilar várias proteínas celulares sendo muito relacionada à apoptose, podendo se deslocar até o núcleo para ativar c-jun, iniciando uma “*upregulation*” dos genes pró-morte (DHANDAPANI et al., 2005).

Muitos compostos com estruturas moleculares diversas podem se ligar ao ERs, não apenas compostos sintéticos, mas também poluentes ambientais, tais como hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, ésteres de ftalato, xenormônios e muitos pesticidas (BOLGER et al., 1998), bem como os fitoestrógenos que possuem estrutura semelhante ao E2 (Fig.11) (BELCHER e ZSARNOVSZKY , 2001). Os fitoestrógenos são compostos derivados de plantas que possuem propriedades estrogênicas quando utilizados por seres humanos e animais (OOSTENBRINK et al., 2000). Podem ser divididos em três classes que são as isoflavonas, os coumestans e as lignanas, sendo todos compostos difenólicos com semelhanças estruturais com o estrogênio e os anti-estrogênios naturais e artificiais. Em graus variados, os fitoestrógenos atuam como agonistas ou antagonistas das ações normais do estradiol, a isoflavona de soja, por exemplo, é amplamente aceita como um componente alimentar seguro e benéfico, sendo ainda uma alternativa natural às terapias de reposição hormonal a base de estrogênio (BELCHER e ZSARNOVSZKY , 2001).

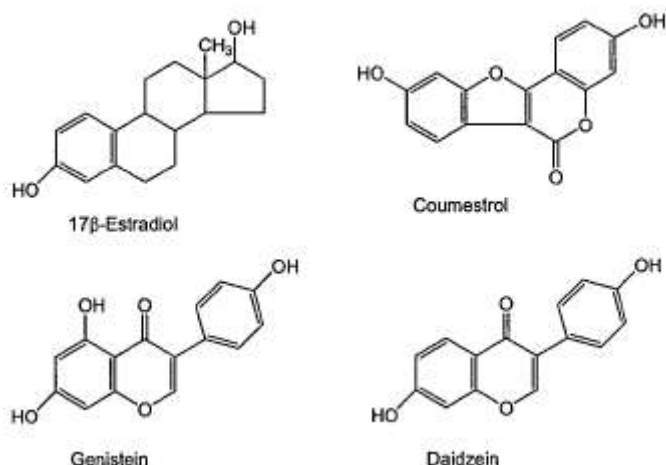


FIG.11. Representação das semelhanças estruturais do estrogênio com outros compostos, coumestrol, genistein e daidzein. Adaptado de BELCHER e ZSARNOVSZKY, 2001.

A ligação de certos fitoestrógenos com os ERs pode prover benefícios terapêuticos nas mais diversas doenças neurodegenerativas, tendo um papel essencial na melhora da memória e cognição (DONG et al., 2013; WANG et al., 2013). Além da sua ligação ao ER, eles exercem também uma potente atividade antioxidante. Com o envelhecimento, altos níveis de oxidação e inflamação contribuem para o declínio da plasticidade sináptica (BODHINATHAN et al., 2010), podendo estes fatores serem combatidos pelas característica antioxidante capaz de promover a função cognitiva. Doses fisiologicamente atingíveis de isoflavonas podem mimetizar alguns dos efeitos neuroprotetores de estrogénios (STAHL et al., 1998). Ainda, o uso do resveratrol, por exemplo, é capaz de promover a redução da morte neuronal hipocampal e prevenção dos déficits de memória espacial causado por hipoperfusão sanguínea em ratos, evitando prejuízo cognitivo e promovendo neuroproteção cerebral (ANASTÁCIO et al., 2014).

O coumestrol é um coumestano encontrado em altas concentrações nos brotos de alfafa e algumas variedades de trevos, mas também está presente em concentrações mais baixas em sementes de girassol, sementes de feijão lima, sementes de feijão pinto, em ervilhas redondas e na soja (FRANKE et al., 1995; PRICE e FENWICK, 1985). Conhecido também por ser um potente isoflavonóide que possui forte afinidade por ambos ER α e ER β quando comparado com o 17 β -estradiol (WHITTEN et al., 2002). Em concentrações que variam de 10 a 1000 nM, o coumestrol possui maior afinidade pelo Er β do que pelo Er α (KUIPER ET AL., 1998). Estudos posteriores mostraram que a reação do coumestrol com o ER β é sete vezes mais forte em relação ao Er α (BENASSAYAG et al., 2002). A estrutura química do coumestrol (Fig.12) é semelhante à do estradiol em relação aos dois grupos hidroxil (OH) presentes nos compostos (KURZER e XU, 1997), o que, a princípio, encorajou pesquisadores a desenvolverem estudos com a hipótese sobre os seus possíveis efeitos neuroprotetores.

A ingesta de coumestrol por ratas ovariectomizadas resultou em aumento dos níveis de mRNA para ER β no encéfalo quando comparado à exposição apenas do estradiol e, desde então, têm-se sugerido que o coumestrol pode atuar como um antagonista utilizando o ER β (PATISAUL et al., 1999), promovendo inclusive a inibição da inflamação causada pela microglia a partir de mecanismos desencadeados pela ligação do complexo coumestrol-Er β . Este mesmo mecanismo não foi observado pelo

uso do estradiol, sugerindo que, mesmo que estes compostos sejam semelhantes, possuem diferenças estruturais e químicas relevantes que influenciam a resposta com seus ligantes (SAIJO et al., 2011). O estradiol possui um anel D saturado com cinco átomos de carbono e uma 17 β -hidroxila, enquanto no coumestrol, o anel correspondente é insaturado possuindo seis carbonos e uma hidroxila substituinte. Ainda, entre esses dois compostos, existem diferenças entre os anéis B e C (Fig.12). Mesmo assim, os dois possuem afinidade pela ligação com o mesmo receptor (CHANDSAWANGBHUWANA e BAKER, 2014).

Os efeitos do coumestrol *in vitro* em astrócitos de camundongos recém-nascidos sugerem sua ação na inibição da inflamação causada por níveis neurotóxicos de peptídeo β -amiloide e lipopolissacarídeo, reconhecendo-o como um agente neuroprotetor seguro em dosagens determinadas (10^{-9} M) (LIU et al., 2011). Além da sua atividade estrogênica, o coumestrol atua como um agente antioxidante devido à sua capacidade de doação de elétrons dos grupos hidroxila presentes nos anéis A e B, removendo assim os radicais livres e prevenindo os danos oxidativos. Os coumestans podem inibir as reações de peroxidação dezesseis vezes mais que o α -tocoferol, um antioxidante natural presente nas membranas (MITCHELL et al., 1998). Ainda, esta atividade antioxidante também foi demonstrada a partir do conteúdo de coumestrol presente no extrato de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L) (GEORGETTI et al., 2003).

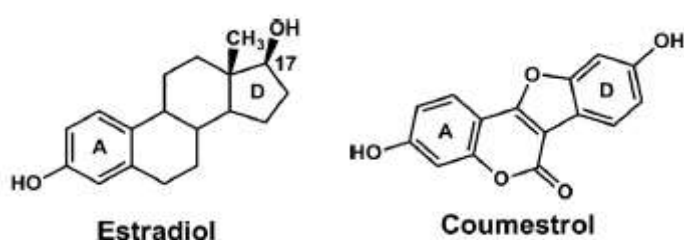


FIG. 12. Diferenças químicas e estruturais entre as moléculas de coumestrol e estradiol. Adaptado de CHANDSAWANGBHUWANA e BAKER, 2014.

A aplicação de coumestrol logo após a isquemia é capaz de proteger os neurônios na área CA1 do hipocampo de ratos, indicando que este composto pode agir em algum mecanismo da cascata de eventos isquêmicos que iniciam a morte celular (CASTRO et al., 2012). A utilização do coumestrol quando comparado ao estradiol, junto a um antagonista do receptor de estrogênio, mostra que o estradiol

teve a ação neuroprotetora completamente anulada. Em contrapartida, a ação neuroprotetora do coumestrol foi parcialmente bloqueada, demonstrando que a ligação parcial do coumestrol ao receptor sugere uma via alternativa de neuroproteção nas células da região CA1. Porém, os mecanismos utilizados pelo coumestrol na efetivação da neuroproteção permanecem não elucidados, podendo estes estar ocorrendo tanto pela ligação clássica do composto com o receptor quanto por ações que não utilizam o receptor (CASTRO et al., 2012). A aplicação de coumestrol após a isquemia revela o efeito neuroprotetor contra a diminuição da atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ em hipocampo de ratos, mostrando que a administração do coumestrol é capaz de resgatar o efeito deletério durante a reperfusão. A $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ é responsável por estabelecer o gradiente eletroquímico dos íons Na^+ e K^+ através da membrana plasmática de vários tipos de células. Esta é a primeira evidência de um efeito neuroprotetor do coumestrol contra a inibição de atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ em um modelo de isquemia cerebral. De acordo com estas informações, sugere-se um possível envolvimento do coumestrol na preservação da integridade da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ a partir dos seus mecanismos antioxidantes (CASTRO et al., 2014).

O estrogênio é um importante modulador das funções cerebrais, atuando na diferenciação celular durante o desenvolvimento (SIMPKINS et al., 1994). Além de influenciar na manutenção da função reprodutiva feminina, também é responsável por diversos processos fisiológicos e patológicos em uma variedade de tecidos e sistemas como o cardiovascular, imunitário e nervoso (GUSTAFSSON, 2003). Os hormônios sexuais femininos também são sugeridos pela sua importância em exercer um efeito benéfico em várias doenças como a esquizofrenia, a depressão, a síndrome pré-menstrual, a depressão pós-parto, a síndrome de Tourette (CYR et al., 2000a; CYR et al., 2000b; DI PAOLO, 1994) e a doença de Alzheimer (HENDERSON, 1997; LIU et al., 2013). O declínio dos níveis de estrogênio em mulheres após a menopausa tem sido proposto como uma possível explicação para o aumento do risco de AVC, uma vez que a probabilidade de ocorrência da doença cardiovascular é maior após este período (KANDEL, 1976).

Em razão de este tema ser alvo de pesquisas recentes e, de existir poucas contribuições na literatura, pouco se sabe sobre as vias de ação utilizadas pelo coumestrol capazes de promover a neuroproteção e atenuar e/ou evitar os processos envolvidos na cascata isquêmica. Da mesma forma, este estudo é o primeiro a

explorar a sua relação com o sistema glutamatérgico e a influência sobre a expressão da subunidade GluR2 dos receptores AMPA em neurônios do hipocampo. Evidencia-se que a disfunção da atividade do GluR2 parece estar associada com distúrbios neurológicos como a isquemia cerebral, a esclerose lateral amiotrófica, a epilepsia e a dor (CULL-CANDY et al., 2006). Alguns relatos mostram que a presença do estradiol não é capaz de promover o aumento da expressão de GluR2 em células de várias regiões do encéfalo (DIANO et al., 1997; GU et al., 1999; JOVER et al., 2002). Por outro lado, é bem conhecida a ação moduladora do estrogênio na actividades do sistema glutamatérgico nas células hipocampais (CYR et al., 2000b) podendo influenciar a expressão dos receptores AMPA através de mecanismos genômicos sugerindo uma relação causal entre o hormônio e o receptor glutamatérgico (LE SAUX et al., 2006). Desta forma, sugere-se que o coumestrol seja um potencial agente neuroprotetor a ser estudado no contexto da isquemia cerebral em razão da sua característica antioxidante e da similaridade ao estrogênio, podendo ou não agir pelos mesmos receptores, desencadeando efeitos semelhantes. A partir do que foi exposto, o presente estudo foi realizado para examinar o possível papel da coumestrol na influência dos níveis de expressão GluR2 no hipocampo de ratos machos contra danos neuronais induzidos pela isquemia cerebral global. Ainda, se objetivou a comparação dos efeitos da administração de coumestrol nos níveis de proteína GluR2 em diferentes tempos de reperfusão. Além disso, investigamos se a administração coumestrol poderia prevenir os défices de memória induzidos pela isquemia cerebral global.

3. REFERÊNCIAS

Alkayed, N. J. et al. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. **Stroke**, v. 31, n. 1, p. 161-8, Jan 2000. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625733> >.

Alonso de Leciñana, M. et al. New goals in ischemic stroke therapy: the experimental approach--harmonizing science with practice. **Cerebrovasc Dis**, v. 20 Suppl 2, p. 159-68, 2005. ISSN 1015-9770. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327267> >.

Alloway, T.P. How does working memory work in the classroom? Educational Research and Reviews 1(4): 134-139, 2006. Disponível em: <http://isites.harvard.edu/fs/docs/icb.topic951140.files/howDoesWMworkInClassroom-alloway2006.pdf>

Amantea, D. et al. From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. **Pharmacol Res**, v. 52, n. 2, p. 119-32, Aug 2005. ISSN 1043-6618. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15967377> >.

Anastácio, J. R. et al. Resveratrol treatment has neuroprotective effects and prevents cognitive impairment after chronic cerebral hypoperfusion. **Neurol Res**, v. 36, n. 7, p. 627-33, Jul 2014. ISSN 1743-1328. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24620966> >.

Attwell, D.; Laughlin, S. B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 21, n. 10, p. 1133-45, Oct 2001. ISSN 0271-678X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598490> >.

Auriel, E.; Bornstein, N. M. Neuroprotection in acute ischemic stroke--current status. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 9, p. 2200-2, Sep 2010. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716132> >.

Bacigaluppi, M.; Comi, G.; Hermann, D. M. Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. **Open Neurol J**, v. 4, p. 34-8, 2010. ISSN 1874-205X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721320> >.

Barbas, H.; García-Cabezas, M.; Zikopoulos, B. Frontal-thalamic circuits associated with language. **Brain Lang**, v. 126, n. 1, p. 49-61, Jul 2013. ISSN 1090-2155. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211411> >.

Barreto, M.L., Carmo, E.H. Padrões de adoecimento e de morte da população brasileira: os renovados desafios para o Sistema Único de Saúde. **Cienc Saúde Coletiva**, v. 12, suppl., p. 1179-90, Nov 2007. ISSN 1413-8123. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232007000700003 >.

Belcher, S. M.; Zsarnovszky, A. Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 299, n. 2, p. 408-14, Nov 2001. ISSN 0022-3565. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602649>>.

Benassayag, C.; Perrot-Appianat, M.; Ferre, F. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 777, n. 1-2, p. 233-48, Sep 2002. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270216>>.

Blue, S. N.; Kazama, A. M.; Bachevalier, J. Development of memory for spatial locations and object/place associations in infant rhesus macaques with and without neonatal hippocampal lesions. **J Int Neuropsychol Soc**, v. 19, n. 10, p. 1053-64, Nov 2013. ISSN 1469-7661. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23880255>>.

Bodhinathan, K.; Kumar, A.; Foster, T. C. Intracellular redox state alters NMDA receptor response during aging through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. **J Neurosci**, v. 30, n. 5, p. 1914-24, Feb 2010. ISSN 1529-2401. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130200>>.

Bolger, R. et al. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. **Environ Health Perspect**, v. 106, n. 9, p. 551-7, Sep 1998. ISSN 0091-6765. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721254>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não-transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde brasileiro. Brasília: **Organização Pan-Americana da Saúde**/Organização Mundial da Saúde, 2005. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/DCNT.pdf>>. Acesso em 17 maio.2015

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Diretrizes de Atenção à Reabilitação da Pessoa com Acidente Vascular Cerebral. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2013. Disponível em: <http://www.pessoacomdeficiencia.gov.br/app/sites/default/files/arquivos/%5Bfield_generico_imagens-filefield-description%5D_132.pdf>. Acesso em: 17 maio. 2015.

Brouns, R.; De Deyn, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 111, n. 6, p. 483-95, Jul 2009. ISSN 1872-6968. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19446389>>.

Burnashev, N. et al. Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. **Science**, v. 257, n. 5075, p. 1415-9, Sep 1992. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1382314>>.

Canal Castro, C. et al. Coumestrol has neuroprotective effects before and after global cerebral ischemia in female rats. **Brain Res**, v. 1474, p. 82-90, Sep 2012. ISSN 1872-6240. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22824334>>.

Carini, R. et al. Evidence for a sodium-dependent calcium influx in isolated rat hepatocytes undergoing ATP depletion. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 202, n. 1, p. 360-6, Jul 1994. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8037733>>.

Castro, C. C. et al. Coumestrol treatment prevents Na⁺, K⁺ -ATPase inhibition and affords histological neuroprotection to male rats receiving cerebral global ischemia. **Neurol Res**, v. 36, n. 3, p. 198-206, Mar 2014. ISSN 1743-1328. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24512013>>.

Cechetti, F. et al. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. **Brain Res Bull**, v. 87, n. 1, p. 109-16, Jan 2012. ISSN 1873-2747. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22040859>>.

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**, v. 43, n. 12, p. 1178-83, Dec 2010. ISSN 1414-431X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085899>>.

Chakrabarti, S.; Morton, J. S.; Davidge, S. T. Mechanisms of estrogen effects on the endothelium: an overview. **Can J Cardiol**, v. 30, n. 7, p. 705-12, Jul 2014. ISSN 1916-7075. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252499>>.

Chandsawangbhuwana, C.; Baker, M. E. 3D models of human ER α and ER β complexed with coumestrol. **Steroids**, v. 80, p. 37-43, Feb 2014. ISSN 1878-5867. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24315835>>.

Choi, D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **J Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 369-79, Feb 1987. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2880938>>.

Choi, Y. C. et al. 17 Beta-estradiol prevents focal cerebral ischemic damages via activation of Akt and CREB in association with reduced PTEN phosphorylation in rats. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 18, n. 5, p. 547-57, Oct 2004. ISSN 0767-3981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15482376>>.

Cull-Candy, S.; Kelly, L.; Farrant, M. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. **Curr Opin Neurobiol**, v. 16, n. 3, p. 288-97, Jun 2006. ISSN 0959-4388. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713244>>.

Cyr, M.; Ghribi, O.; Di Paolo, T. Regional and selective effects of oestradiol and progesterone on NMDA and AMPA receptors in the rat brain. **J Neuroendocrinol**, v. 12, n. 5, p. 445-52, May 2000a. ISSN 0953-8194. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792584>>.

Cyr, M. et al. Drugs with estrogen-like potency and brain activity: potential therapeutic application for the CNS. **Curr Pharm Des**, v. 6, n. 12, p. 1287-312, Aug 2000b. ISSN 1381-6128. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903393>>.

Dalmaz, C.; Netto, C.A. A memória. *Ciência e Cultura*, v.56, n.1, p 30-31. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252004000100023&script=sci_arttext. Acesso em 12 de julho de 2015.

Danbolt, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369436> >.

Dawson, V. L.; Dawson, T. M. Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. **J Bioenerg Biomembr**, v. 36, n. 4, p. 287-94, Aug 2004. ISSN 0145-479X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377859> >.

DeFelipe, J.; Alonso-Nanclares, L.; Arellano, J. I. Microstructure of the neocortex: comparative aspects. **J Neurocytol**, v. 31, n. 3-5, p. 299-316, 2002 Mar-Jun 2002a. ISSN 0300-4864. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12815249> >.

DeFelipe, J.; Alonso-Nanclares, L.; Arellano, J. I. Microstructure of the neocortex: comparative aspects. **J Neurocytol**, v. 31, n. 3-5, p. 299-316, 2002 Mar-Jun 2002b. ISSN 0300-4864. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12815249> >.

Del Zoppo, G. J. et al. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 40, n. 8, p. 2945-8, Aug 2009. ISSN 1524-4628. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478221> >.

Dhandapani, K. M. et al. Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2749-59, Jun 2005. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15746252> >.

Di Paolo, T. Modulation of brain dopamine transmission by sex steroids. **Rev Neurosci**, v. 5, n. 1, p. 27-41, 1994 Jan-Mar 1994. ISSN 0334-1763. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8019704> >.

Diano, S.; Naftolin, F.; Horvath, T. L. Gonadal steroids target AMPA glutamate receptor-containing neurons in the rat hypothalamus, septum and amygdala: a morphological and biochemical study. **Endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 778-89, Feb 1997. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9003015> >.

Dirnagl, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 391-7, Sep 1999a. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441299> >.

Dirnagl, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 391-7, Sep 1999b. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441299> >.

Dirnagl, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 391-7, Sep 1999c. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441299> >.

Dong, Y. et al. Phytoestrogen α -zearalanol ameliorates memory impairment and neuronal DNA oxidation in ovariectomized mice. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 68, n. 9, p. 1255-62, Sep 2013. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141843> >.

Dubal, D. B. et al. Estradiol protects against ischemic injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 18, n. 11, p. 1253-8, Nov 1998. ISSN 0271-678X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809515> >.

Dugan, L. L.; Choi, D. W. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. **Ann Neurol**, v. 35 Suppl, p. S17-21, 1994. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8185290> >.

Durukan, A.; Tatlisumak, T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 87, n. 1, p. 179-97, May 2007. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521716> >.

Emerich, D. F.; Dean, R. L.; Bartus, R. T. The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? **Exp Neurol**, v. 173, n. 1, p. 168-81, Jan 2002. ISSN 0014-4886. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11771949> >.

Engelhardt, B.; Sorokin, L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. **Semin Immunopathol**, v. 31, n. 4, p. 497-511, Nov 2009. ISSN 1863-2300. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19779720> >.

Falkenstein, E. et al. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 4, p. 513-56, Dec 2000. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121509> >.

Farkas, E.; Luiten, P. G.; Bari, F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. **Brain Res Rev**, v. 54, n. 1, p. 162-80, Apr 2007. ISSN 0165-0173. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296232> >.

Farkas, E. et al. Post-ischemic administration of diazoxide attenuates long-term microglial activation in the rat brain after permanent carotid artery occlusion. **Neurosci Lett**, v. 387, n. 3, p. 168-72, Oct 2005. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16026930> >.

Farooqui, A. A.; Horrocks, L. A. Excitotoxicity and neurological disorders: involvement of membrane phospholipids. **Int Rev Neurobiol**, v. 36, p. 267-323, 1994. ISSN 0074-7742. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7822118> >.

Fiocchetti, M.; Ascenzi, P.; Marino, M. Neuroprotective effects of 17 β -estradiol rely on estrogen receptor membrane initiated signals. **Front Physiol**, v. 3, p. 73, 2012. ISSN 1664-042X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493583>>.

Floyd, R.A. Production of free radicals. In: Welch KMA, Kaplan LR, Reis J, et al, eds. *Primer on Cerebrovascular Disease*. San Diego, CA, Academic Press, p.165-169, 1997

Franke, A. A. et al. Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 208, n. 1, p. 18-26, Jan 1995. ISSN 0037-9727. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7892289>>.

Funakoshi, T. et al. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 346, n. 3, p. 904-10, Aug 2006. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16780796>>.

Geiger, J. R. et al. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. **Neuron**, v. 15, n. 1, p. 193-204, Jul 1995. ISSN 0896-6273. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619522>>.

Georgetti, S. R. et al. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. **AAPS PharmSci**, v. 5, n. 2, p. E20, 2003. ISSN 1522-1059. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12866943>>.

Ginsberg, M. D. The new language of cerebral ischemia. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 18, n. 8, p. 1435-45, Sep 1997. ISSN 0195-6108. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9296184>>.

Gordon, J. A. Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony. **Curr Opin Neurobiol**, v. 21, n. 3, p. 486-91, Jun 2011. ISSN 1873-6882. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470846>>.

Gorter, J. A. et al. Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. **J Neurosci**, v. 17, n. 16, p. 6179-88, Aug 1997. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9236229>>.

Grotta, J. Why do all drugs work in animals but none in stroke patients? 2. Neuroprotective therapy. **J Intern Med**, v. 237, n. 1, p. 89-94, Jan 1995. ISSN 0954-6820. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7830036>>.

Gu, G.; Varoqueaux, F.; Simerly, R. B. Hormonal regulation of glutamate receptor gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. **J Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 3213-22, Apr 1999. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10191334>>.

Gustafsson, J. A. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen

signalling. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 9, p. 479-85, Sep 2003. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967773> >.

Götz, M.; Bolz, J. Formation and preservation of cortical layers in slice cultures. **J Neurobiol**, v. 23, n. 7, p. 783-802, Sep 1992. ISSN 0022-3034. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1431845> >.

Gürsoy-Ozdemir, Y.; Can, A.; Dalkara, T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 35, n. 6, p. 1449-53, Jun 2004. ISSN 1524-4628. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073398> >.

Han, H. S.; Yenari, M. A. Cellular targets of brain inflammation in stroke. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 4, n. 5, p. 522-9, May 2003. ISSN 1472-4472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12833644> >.

Henderson, V. W. Estrogen, cognition, and a woman's risk of Alzheimer's disease. **Am J Med**, v. 103, n. 3A, p. 11S-18S, Sep 1997. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9344402> >.

HersHKovitz, A.; Brill, S. The association between patients' cognitive status and rehabilitation outcome in a geriatric day hospital. **Disabil Rehabil**, v. 29, n. 4, p. 333-7, Feb 2007. ISSN 0963-8288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17364783> >.

Hossmann, K. A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. **Ann Neurol**, v. 36, n. 4, p. 557-65, Oct 1994. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7944288> >.

Hossmann, K. A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. **Cell Mol Neurobiol**, v. 26, n. 7-8, p. 1057-83, 2006 Oct-Nov 2006. ISSN 0272-4340. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710759> >.

Hu, N. W.; Ondrejčák, T.; Rowan, M. J. Glutamate receptors in preclinical research on Alzheimer's disease: update on recent advances. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 4, p. 855-62, Feb 2012. ISSN 1873-5177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21536064> >.

Iadecola, C.; Anrather, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nat Med**, v. 17, n. 7, p. 796-808, Jul 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738161> >.

Iadecola, C. Mechanisms of cerebral ischemic damage. In: WALZ, W. ed., Cerebral ischemia: Molecular and cellular pathophysiology. Humana, Totowa, NJ, p. 3 – 36, 1999.

Izquierdo, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635-6, Jun 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9641675> >.

Izquierdo, I. Memória. Porto Alegre: Artmed; 2002.

Izquierdo, I. Questões sobre memória. São Leopoldo/RS: Editora Unisinos; 2003

Izquierdo, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci**, v. 29, n. 9, p. 496-505, Sep 2006. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16872686> >.

Jiang, X. et al. The organization of two new cortical interneuronal circuits. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 2, p. 210-8, Feb 2013. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313910> >.

Jiwa, N. S.; Garrard, P.; Hainsworth, A. H. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review. **J Neurochem**, v. 115, n. 4, p. 814-28, Nov 2010. ISSN 1471-4159. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731763> >.

Jonas, P.; Burnashev, N. Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. **Neuron**, v. 15, n. 5, p. 987-90, Nov 1995. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576666> >.

Jover, T. et al. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. **J Neurosci**, v. 22, n. 6, p. 2115-24, Mar 2002. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896151> >.

Jørgensen, H. S. et al. Recovery of walking function in stroke patients: the Copenhagen Stroke Study. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 76, n. 1, p. 27-32, Jan 1995. ISSN 0003-9993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7811170> >.

Kannel, W. B. et al. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. **Ann Intern Med**, v. 85, n. 4, p. 447-52, Oct 1976. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/970770> >.

Kanekar, S. G.; Zacharia, T.; Roller, R. Imaging of stroke: Part 2, Pathophysiology at the molecular and cellular levels and corresponding imaging changes. **AJR Am J Roentgenol**, v. 198, n. 1, p. 63-74, Jan 2012. ISSN 1546-3141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194480> >.

Kase, C. S. et al. Intellectual decline after stroke: the Framingham Study. **Stroke**, v. 29, n. 4, p. 805-12, Apr 1998. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9550515> >.

Kaur, H.; Prakash, A.; Medhi, B. Drug therapy in stroke: from preclinical to clinical studies. **Pharmacology**, v. 92, n. 5-6, p. 324-34, 2013. ISSN 1423-0313. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356194> >.

Kawano, H. et al. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. **Cell Tissue Res**, v. 349, n. 1, p. 169-80, Jul 2012. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22362507> >.

Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027> >.

Ketheeswaranathan, P. et al. Changes in glutamate transporter expression in mouse forebrain areas following focal ischemia. **Brain Res**, v. 1418, p. 93-103, Oct 2011. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21911209> >.

Kincses, Z. T.; Vecsei, L. Pharmacological therapy in Parkinson's disease: focus on neuroprotection. **CNS Neurosci Ther**, v. 17, n. 5, p. 345-67, Oct 2011. ISSN 1755-5949. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20438581> >.

Koh, J. Y. et al. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. **Science**, v. 272, n. 5264, p. 1013-6, May 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8638123> >.

Konsman, J. P.; Drukarch, B.; Van Dam, A. M. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. **Clin Sci (Lond)**, v. 112, n. 1, p. 1-25, Jan 2007. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17132137> >.

Kostandy, B. B. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. **Neurol Sci**, v. 33, n. 2, p. 223-37, Apr 2012. ISSN 1590-3478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22044990> >.

Kuiper, G. G. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252-63, Oct 1998. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751507> >.

Kurzer, M. S.; Xu, X. Dietary phytoestrogens. **Annu Rev Nutr**, v. 17, p. 353-81, 1997a. ISSN 0199-9885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9240932> >.

Langa, K. M. et al. National estimates of the quantity and cost of informal caregiving for the elderly with dementia. **J Gen Intern Med**, v. 16, n. 11, p. 770-8, Nov 2001. ISSN 0884-8734. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722692> >.

Le Saux, M.; Estrada-Camarena, E.; Di Paolo, T. Selective estrogen receptor-alpha but not -beta agonist treatment modulates brain alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. **J Neurosci Res**, v. 84, n. 5, p. 1076-84, Oct 2006. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16937413> >.

Lebesgue, D. et al. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. **Steroids**, v. 74, n. 7, p. 555-61, Jul 2009. ISSN 0039-128X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428444>>.

Lecouturier, J. et al. Response to symptoms of stroke in the UK: a systematic review. **BMC Health Serv Res**, v. 10, p. 157, 2010. ISSN 1472-6963. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20529351>>.

Li, F.; Fisher, M. Animal modeling for developing stroke therapy. In: Fisher M, editor. **Stroke therapy**. Woburn, MA: Butterworth-Heinemann, p. 83–96, 2001.

Li, L. N. Water soluble active componentes of salvia miltiorrhiza and related plants. *J Chin Pharm Sci*, v.6, n.2, p. 57–63, 1997.

Li, W. et al. Transient focal cerebral ischemia induces long-term cognitive function deficit in an experimental ischemic stroke model. **Neurobiol Dis**, v. 59, p. 18-25, Nov 2013. ISSN 1095-953X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845275>>.

Lindsberg, P. J.; Strbian, D.; Karjalainen-Lindsberg, M. L. Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 30, n. 4, p. 689-702, Apr 2010. ISSN 1559-7016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20087366>>.

Liu, M. H. et al. The protective effects of coumestrol against amyloid- β peptide- and lipopolysaccharide-induced toxicity on mice astrocytes. **Neurol Res**, v. 33, n. 6, p. 663-72, Jul 2011. ISSN 1743-1328. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708076>>.

Liu, P.; Bilkey, D. K. Perirhinal cortex contributions to performance in the Morris water maze. **Behav Neurosci**, v. 112, n. 2, p. 304-15, Apr 1998. ISSN 0735-7044. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588480>>.

Liu, S. et al. Metabolic alteration of neuroactive steroids and protective effect of progesterone in Alzheimer's disease-like rats. **Neural Regen Res**, v. 8, n. 30, p. 2800-10, Oct 2013. ISSN 1673-5374. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25206601>>.

Liu, S. J.; Zukin, R. S. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 3, p. 126-34, Mar 2007. ISSN 0166-2236. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17275103>>.

Lo, E. H. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. **Nat Med**, v. 14, n. 5, p. 497-500, May 2008. ISSN 1546-170X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18463660>>.

Lo, E. H.; Dalkara, T.; Moskowitz, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 5, p. 399-415, May 2003. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728267> >.

Lochhead, J. J. et al. Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 30, n. 9, p. 1625-36, Sep 2010. ISSN 1559-7016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20234382> >.

Lotufo, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Med J**, v. 123, n. 1, p. 3-4, Jan 2005. ISSN 1516-3180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821807> >.

Love, S. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain Pathol**, v. 9, n. 1, p. 119-31, Jan 1999. ISSN 1015-6305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989455> >.

Maehler, C.; Schuchardt, K. Working memory functioning in children with learning disabilities: does intelligence make a difference? **J Intellect Disabil Res**, v. 53, n. 1, p. 3-10, Jan 2009. ISSN 1365-2788. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19093981> >.

Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am J Pathol**, v. 146, n. 1, p. 3-15, Jan 1995. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7856735> >.

Markus, R. et al. Hypoxic tissue in ischaemic stroke: persistence and clinical consequences of spontaneous survival. **Brain**, v. 127, n. Pt 6, p. 1427-36, Jun 2004. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15130953> >.

McIlvoy, L. H. The effect of hypothermia and hyperthermia on acute brain injury. **AACN Clin Issues**, v. 16, n. 4, p. 488-500, 2005 Oct-Dec 2005. ISSN 1079-0713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269894> >.

Meldrum, B. et al. Ischaemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry. **Br J Anaesth**, v. 57, n. 1, p. 44-6, Jan 1985. ISSN 0007-0912. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3966963> >.

Mellon, L. et al. Cognitive impairment six months after ischaemic stroke: a profile from the ASPIRE-S study. **BMC Neurol**, v. 15, p. 31, 2015. ISSN 1471-2377. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25879880> >.

Mergenthaler, P.; Dirnagl, U.; Meisel, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 3-4, p. 151-67, Dec 2004. ISSN 0885-7490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554412> >.

Mhairi Macrae, I. New models of focal cerebral ischaemia. **Br J Clin Pharmacol**, v. 34, n. 4, p. 302-8, Oct 1992. ISSN 0306-5251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1457262> >.

Mitchell, J. H. et al. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. **Arch Biochem Biophys**, v. 360, n. 1, p. 142-8, Dec 1998. ISSN 0003-9861. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826439> >.

Mogensen, J. et al. Prefrontal cortical mediation of rats' place learning in a modified water maze. **Brain Res Bull**, v. 38, n. 5, p. 425-34, 1995. ISSN 0361-9230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665265> >.

Mohr, J. P. et al. The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry. **Neurology**, v. 28, n. 8, p. 754-62, Aug 1978. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/567291> >.

Moncada, D.; Viola, H. Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. **J Neurosci**, v. 27, n. 28, p. 7476-81, Jul 2007. ISSN 1529-2401. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626208> >.

Morrison, J. H.; Hof, P. R. Life and death of neurons in the aging brain. **Science**, v. 278, n. 5337, p. 412-9, Oct 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334292> >.

Nicholls, D.; Attwell, D. The release and uptake of excitatory amino acids. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 11, p. 462-8, Nov 1990. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1980041> >.

Nicoli, F. et al. Metabolic counterpart of decreased apparent diffusion coefficient during hyperacute ischemic stroke: a brain proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. **Stroke**, v. 34, n. 7, p. e82-7, Jul 2003. ISSN 1524-4628. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12817104> >.

Nishizawa, Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. **Life Sci**, v. 69, n. 4, p. 369-81, Jun 2001. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459428> >.

Ohtaki, H. et al. Progressive expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis after chronic ischemic hypoperfusion in rat. **Acta Neurochir Suppl**, v. 96, p. 283-7, 2006. ISSN 0065-1419. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16671472> >.

Olton, D.S. Hippocampal Function and Memory for Temporal Context. In R.L. Isaacson and K.A. Pribran (Eds.), *The Hippocampus*. Vol 4, New York: Plenum Press, pp.281-298, 1986. Olton, D.S. Mnemonic Functions of the Hippocampus: Past, Present and Future. In Larry R. Squire and Elke Lindenlaub (Eds.), 1990. *The Biology of Memory: Symposium Bernried, Germany October 15th-19th, 1989*. Stuttgart: Schattauer Verlag, pp.427-443.

Oostenbrink, B. C. et al. Simulations of the estrogen receptor ligand-binding domain: affinity of natural ligands and xenoestrogens. **J Med Chem**, v. 43, n. 24, p. 4594-605, Nov 2000. ISSN 0022-2623. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101351>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Classificação Internacional de deficiências, incapacidades e desvantagens. Secretariado nacional de reabilitação. **Ministério do emprego e da segurança social**. Lisboa: OMS, 1989.

Oz, M. et al. 3',4'-Dihydroxyflavonol attenuates spatial learning and memory impairments in global cerebral ischemia. **Nutr Neurosci**, Oct 2014. ISSN 1476-8305. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25290491>>.

Ozawa, S.; Kamiya, H.; Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 54, n. 5, p. 581-618, Apr 1998. ISSN 0301-0082. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9550192>>.

Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237348>>.

Patel, M. et al. Natural history of cognitive impairment after stroke and factors associated with its recovery. **Clin Rehabil**, v. 17, n. 2, p. 158-66, Mar 2003. ISSN 0269-2155. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12625656>>.

Patisaul, H. B.; Whitten, P. L.; Young, L. J. Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17beta-estradiol and the phytoestrogen, coumestrol. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 67, n. 1, p. 165-71, Apr 1999. ISSN 0169-328X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10101243>>.

Paul, S. L.; Srikanth, V. K.; Thrift, A. G. The large and growing burden of stroke. **Curr Drug Targets**, v. 8, n. 7, p. 786-93, Jul 2007. ISSN 1873-5592. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17630931>>.

Pellegrini-Giampietro, D. E. An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 1, p. 9-11, Jan 2003. ISSN 0166-2236. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495855>>.

Pellegrini-Giampietro, D. E. et al. Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 21, p. 10499-503, Nov 1992. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1438239>>.

Pendlebury, S. T.; Rothwell, P. M. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 11, p. 1006-18, Nov 2009. ISSN 1474-4465. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782001>>.

Price, K. R.; Fenwick, G. R. Naturally occurring oestrogens in foods--a review. **Food Addit Contam**, v. 2, n. 2, p. 73-106, 1985 Apr-Jun 1985. ISSN 0265-203X. Disponível

em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4018320> >.

Pulsinelli, W. A. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. **Prog Brain Res**, v. 63, p. 29-37, 1985a. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2872695> >.

Pulsinelli, W. A. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. **Prog Brain Res**, v. 63, p. 29-37, 1985b. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2872695> >.

Pulsinelli, W. A.; Brierley, J. B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. **Stroke**, v. 10, n. 3, p. 267-72, 1979 May-Jun 1979. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37614> >.

Pulsinelli, W. A.; Brierley, J. B.; Plum, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann Neurol**, v. 11, n. 5, p. 491-8, May 1982. ISSN 0364-5134. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7103425> >.

Ramos, J. W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 12, p. 2707-19, 2008. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562239> >.

Rau, S. W. et al. Estradiol attenuates programmed cell death after stroke-like injury. **J Neurosci**, v. 23, n. 36, p. 11420-6, Dec 2003. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673006> >.

Rich, P. R. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. **Biochem Soc Trans**, v. 31, n. Pt 6, p. 1095-105, Dec 2003. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14641005> >.

Rodgers, H. et al. Risk factors for first-ever stroke in older people in the north East of England: a population-based study. **Stroke**, v. 35, n. 1, p. 7-11, Jan 2004. ISSN 1524-4628. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657457> >.

Rodrigo, J. et al. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 1, p. 26-50, Jul 2005. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925277> >.

Roger, V. L. et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, n. 4, p. e18-e209, Feb 2011. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160056> >.

Roof, R. L. et al. Gender-specific impairment on Morris water maze task after entorhinal cortex lesion. **Behav Brain Res**, v. 57, n. 1, p. 47-51, Oct 1993. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8292254> >.

Rossi, D. J.; Oshima, T.; Attwell, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. **Nature**, v. 403, n. 6767, p. 316-21, Jan 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10659851> >.

Sanchez-Covarrubias, L. et al. Transporters at CNS barrier sites: obstacles or opportunities for drug delivery? **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 10, p. 1422-49, 2014. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23789948> >.

Santen, R. J. et al. Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 7 Suppl 1, p. s1-s66, Jul 2010. ISSN 1945-7197. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20566620> >.

Sato, K. et al. beta-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. **Brain Res**, v. 1150, p. 108-20, May 2007. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433270> >.

Schaller, B.; Graf, R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 24, n. 4, p. 351-71, Apr 2004. ISSN 0271-678X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087705> >.

Schmidt-Kastner, R.; Freund, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, v. 40, n. 3, p. 599-636, 1991. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1676492> >.

Schousboe, A.; Waagepetersen, H. S. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. **Neurotox Res**, v. 8, n. 3-4, p. 221-5, Nov 2005. ISSN 1029-8428. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16371316> >.

Schreihöfer, D. A.; Ma, Y. Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: who, what, where, and when? **Brain Res**, v. 1514, p. 107-22, Jun 2013. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500634> >.

Scott, E. et al. Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. **Front Neuroendocrinol**, v. 33, n. 1, p. 85-104, Jan 2012. ISSN 1095-6808. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079780> >.

Scott, J. F.; Gray, C. S. Cerebral and systemic pathophysiological responses to acute stroke. **Age Ageing**, v. 29, n. 3, p. 197-202, May 2000. ISSN 0002-0729. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10855898> >.

Seshadri, S. et al. The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. **Stroke**, v. 37, n. 2, p. 345-50, Feb 2006. ISSN 1524-4628. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397184> >.

Shibata, M. et al. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. **Stroke**, v. 35, n. 11, p. 2598-603, Nov 2004. ISSN 1524-4628. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472111> >.

Shughrue, P. J.; Lane, M. V.; Merchenthaler, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. **J Comp Neurol**, v. 388, n. 4, p. 507-25, Dec 1997a. ISSN 0021-9967. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9388012> >.

Simpkins, J. W.; Singh, M.; Bishop, J. The potential role for estrogen replacement therapy in the treatment of the cognitive decline and neurodegeneration associated with Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 15 Suppl 2, p. S195-7, 1994. ISSN 0197-4580. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7700453> >.

Singh, D. P.; Chopra, K. Verapamil augments the neuroprotectant action of berberine in rat model of transient global cerebral ischemia. **Eur J Pharmacol**, v. 720, n. 1-3, p. 98-106, Nov 2013. ISSN 1879-0712. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24177287> >.

Smith, M. L. et al. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. **Acta Neurol Scand**, v. 69, n. 6, p. 385-401, Jun 1984. ISSN 0001-6314. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6464670> >.

Sommer, B. et al. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. **Science**, v. 249, n. 4976, p. 1580-5, Sep 1990. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1699275> >.

Sonnenwald, U.; Westergaard, N.; Schousboe, A. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. **Glia**, v. 21, n. 1, p. 56-63, Sep 1997. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298847> >.

Spandou, E. et al. Neuroprotective effect of long-term MgSO₄ administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to the severity of brain damage. **Reprod Sci**, v. 14, n. 7, p. 667-77, Oct 2007. ISSN 1933-7205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000228> >.

Squire, L. R.; Zola-Morgan, S. Memory: brain systems and behavior. **Trends Neurosci**, v. 11, n. 4, p. 170-5, Apr 1988. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2469186> >.

Srivastava, D. P. et al. Rapid enhancement of two-step wiring plasticity by estrogen and NMDA receptor activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 38, p. 14650-5, Sep 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18801922> >.

Stahl, S.; Chun, T. Y.; Gray, W. G. Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 152, n. 1, p. 41-8, Sep 1998. ISSN 0041-008X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9772198> >.

Stemer, A.; Lyden, P. Evolution of the thrombolytic treatment window for acute ischemic stroke. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 10, n. 1, p. 29-33, Jan 2010. ISSN 1534-6293. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425223> >.

Sumii, T.; Lo, E. H. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. **Stroke**, v. 33, n. 3, p. 831-6, Mar 2002. ISSN 1524-4628. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872911> >.

Tanaka, H. et al. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. **Brain Res**, v. 886, n. 1-2, p. 190-207, Dec 2000. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119696> >.

Tatemichi, T. K. et al. Cognitive impairment after stroke: frequency, patterns, and relationship to functional abilities. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 57, n. 2, p. 202-7, Feb 1994. ISSN 0022-3050. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8126506> >.

Turner, R. C. et al. The science of cerebral ischemia and the quest for neuroprotection: navigating past failure to future success. **J Neurosurg**, v. 118, n. 5, p. 1072-85, May 2013. ISSN 1933-0693. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23331000> >.

Unsworth, N.; Engle, R. W. On the division of short-term and working memory: an examination of simple and complex span and their relation to higher order abilities. **Psychol Bull**, v. 133, n. 6, p. 1038-66, Nov 2007. ISSN 0033-2909. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967093> >.

van der Meer, F. J. et al. Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers Med Sci**, v. 25, n. 2, p. 259-67, Mar 2010. ISSN 1435-604X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19756838> >.

van der Worp, H. B.; van Gijn, J. Clinical practice. Acute ischemic stroke. **N Engl J Med**, v. 357, n. 6, p. 572-9, Aug 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17687132> >.

Wang, R. et al. Genistein attenuates ischemic oxidative damage and behavioral deficits via eNOS/Nrf2/HO-1 signaling. **Hippocampus**, v. 23, n. 7, p. 634-47, Jul 2013. ISSN 1098-1063. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536494> >.

Wang, Y.; Qin, Z. H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis**, v. 15, n. 11, p. 1382-402, Nov 2010. ISSN 1573-675X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213199> >.

Wang, R. et al. Inhibition of MLK3-MKK4/7-JNK1/2 pathway by Akt1 in exogenous estrogen-induced neuroprotection against transient global cerebral ischemia by a non-genomic mechanism in male rats. **J Neurochem**, v. 99, n. 6, p. 1543-54, Dec 2006. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17064355> >.

Wappler, E. A. et al. Neuroprotective effects of estrogen treatment on ischemia-induced behavioural deficits in ovariectomized gerbils at different ages. **Behav Brain Res**, v. 209, n. 1, p. 42-8, May 2010. ISSN 1872-7549. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085782> >.

Warner, M.; Gustafsson, J. A. Estrogen receptor β and Liver X receptor β : biology and therapeutic potential in CNS diseases. **Mol Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 18-22, Feb 2015. ISSN 1476-5578. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662928> >.

Whitten, P. L.; Patisaul, H. B.; Young, L. J. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. **Neurotoxicol Teratol**, v. 24, n. 1, p. 47-54, 2002 Jan-Feb 2002. ISSN 0892-0362. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836071> >.

Woodruff, T. M. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Mol Neurodegener**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011. ISSN 1750-1326. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266064> >.

World Health Organization. The international agenda for stroke. **1st Global Conference on Healthy Lifestyles and Noncommunicable Diseases Control**. Moscow: WHO, 2011.

World Health Organization. Global burden of stroke. Available at http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_15_burden_stroke.pdf [acessado em 19 maio 2015]

Wu, T. W.; Chen, S.; Brinton, R. D. Membrane estrogen receptors mediate calcium signaling and MAP kinase activation in individual hippocampal neurons. **Brain Res**, v. 1379, p. 34-43, Mar 2011. ISSN 1872-6240. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241678> >.

Yilmaz, G.; Granger, D. N. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. **Neuromolecular Med**, v. 12, n. 2, p. 193-204, Jun 2010. ISSN 1559-1174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19579016> >.

Yoshizaki, K. et al. Chronic cerebral hypoperfusion induced by right unilateral common carotid artery occlusion causes delayed white matter lesions and cognitive impairment in adult mice. **Exp Neurol**, v. 210, n. 2, p. 585-91, Apr 2008. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18222425> >.

Zemke, D. et al. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 6, p. 895-904, Dec 2004. ISSN 0161-813X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15474608> >.

Zinn, S. et al. The effect of poststroke cognitive impairment on rehabilitation process and functional outcome. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 85, n. 7, p. 1084-90, Jul 2004. ISSN 0003-9993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241754> >.

4. ARTIGO

Coumestrol protects from excitotoxicity and ischemia-induced reduction of GluR2 content and memory impairment

Ana Paula Martini^b, Cibele Canal Castro ^a, George Umanah^c, Aline S. Pagnussat^{a,d}, Rafael Roesler ^e, Carlos Alexandre Netto^a, Valina L. Dawson ^{c,f}

^a Department of Biochemistry, Institute for Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brazil

^c Solomon H. Snyder Department of Neuroscience, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

^d Department of Physiotherapy. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brazil

^e Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^f Neuroregeneration and Stem Cell Programs, Institute for Cell Engineering, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

Corresponding author:

Aline de Souza Pagnussat, Ph.D

Departamento de Fisioterapia

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Rua Sarmiento Leite, 245

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: + 55-51-3303 8776

Email: alinespagnussat@gmail.com

Abstract

Transient global cerebral ischemia leads to a selective, delayed death of pyramidal neurons in the hippocampal CA1 area. Excessive glutamate release triggers excitotoxicity and subsequent neuronal death. Regulation of the glutamatergic α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) GluR2 subunit content plays a role on these processes. Cerebral global ischemia induces down-regulation of GluR2 mRNA and increases AMPA-induced Ca^{+2} influx in the hippocampus. Here, we investigated the neuroprotective mechanisms of the phytoestrogen coumestrol against ischemia-like induced excitotoxicity in male mice, as well as on memory deficits induced by global ischemia. Global ischemia was induced in swiss male mice by 20 min of bilateral common carotid artery occlusion, and resulted in a significant decrease of GluR2 mRNA expression in the hippocampus at 12, 24, and 48 h after reperfusion. Administration of either coumestrol or estradiol abolished this effect. In addition, coumestrol prevented spatial memory deficits promoted by the ischemic insult. Together, these findings suggest a role for coumestrol as a neuroprotective agent against neuronal damage and cognitive impairment associated with ischemia.

Keywords: Brain Ischemia, Phytoestrogens, Hippocampus, AMPA Receptors, Memory.

Highlights

We compared the coumestrol effects in the mice hippocampus post ischemia.

We examined the GluR2 levels content in AMPA receptors.

We assessed the mice cognitive behavior with the Morris Water Maze.

The coumestrol showed effective maintenance of GluR2 levels.

The coumestrol appears to improve performance in the water maze task.

1. Introduction

Stroke is the fourth most common cause of death and leading disability in world [1]. Approximately 80 % strokes result in an occlusion by thrombus or embolus in a cerebral artery causing ischemia [2]. Transient bilateral carotid common artery occlusion can reproduce the ischemia and reperfusion mimics the stroke pathological condition [3]. Energetic failure causes membrane cell depolarization, excitotoxicity, Ca^{2+} influx and neuronal death [4]. Global cerebral ischemia induces selective neuronal loss especially CA1 pyramidal neurons in dorsal hippocampus and cortical projection neurons in layer 3 [5, 6, 7]. Glutamate, the major excitatory neurotransmitter in the brain known to be a major player in the pathophysiology of neuronal injury [8, 9]. Excitotoxicity occurs by the excessive glutamate release, which has a prominent role in many disorders of the nervous system, including trauma and ischemia [10].

The glutamatergic AMPA receptors are made up of combinations of four subunits, GluR1-4 [11], and implicated in glutamate excitotoxicity [12, 13, 14]. The GluR2 mRNA is expressed abundantly in hippocampal excitatory neuron, providing low permeability to Ca^{2+} in AMPA receptors. Thus, any alteration in GluR2 expression can produce significant physiological effects [15]. Several recent reports have demonstrated that cerebral global ischemia reduces GluR2 mRNA and protein levels in CA1 hippocampal neurons [16, 17]. This observation led to the “GluR2 hypothesis”, which postulates that reduced GluR2 expression allows Ca^{2+} entry through AMPARs channels, which, in turn, induces CA1 pyramidal cell death [13, 15, 18].

Generally, treatment with drugs aimed to find out neuroprotective agents capable for restoring the resulting penumbra of an ischemic event [19]. Estradiol, derived from endogenous or exogenous sources, displays enhancing effects on neuronal plasticity and behavior related to cognition and mood [20, 21]. In addition, estradiol is widely reported by neuroprotective actions in models of ischemic brain injury, neurodegeneration, and aging [22, 23, 24]. In hippocampal neurons, estradiol acts as a neuroprotective agent *in vitro* [24, 25] and *in vivo* [26, 27], and estrogen receptors activation (ERs – α and β) with estradiol or specific agonists has been implicated in learning and memory [28, 29]. Phytoestrogens are estrogen-like molecules found in many plants binding ERs. Some phytoestrogens exhibit estrogen agonist-like activities [30, 31], and the ER binding can provide therapeutic benefits in

several neurodegenerative diseases, constituting an essential role in improved memory and cognition [33, 27, 32].

Recently, the coumestan phytoestrogen coumestrol has gained place because its binding affinities for both ER- α and ER- β that are comparable to those of 17- β -estradiol [27, 34]. Recent studies from our laboratory revealed the neuroprotective actions of coumestrol in female and male rats, suggesting that this compound could be a tangible therapeutic strategy against global ischemia injury interacting the activity of Na / K –ATPase [27,35], but there are not reports about the coumestrol interaction with glutamate receptors.

The present study was undertaken to examine the possible role of coumestrol at the level of GluR2 expression in hippocampus of male mice against neuronal damage induced by global ischemia. We compared the effects of coumestrol administration in different times of reperfusion on the GluR2 protein levels at the same time points. Also, we investigated if coumestrol administration could prevent the memory deficits induced by global ischemia. Our hypothesis was that coumestrol could be neuroprotective against excitotoxic-related brain damage processes such those associated with global ischemia

2. Materials and methods

2.1. Animals

All procedures using mice followed the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the guidelines of the Committee on Care and use of Experimental Animal Resources, and were approved by the committee of Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in each experiment.

For all experiments, we obtained 8-12 weeks old swiss male mice from the Central Animal House of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. Animals were maintained on a 12;12h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) colony room with food and water *ad libitum*, and kept in standard cages (48 x 26 cm²) with five animals per cage.

2.2. Experimental design and drug treatments

Two different groups of animals were used (n = 86) one for biochemistry (4 per group) and another for behavioral assessments (9-11 per group). Animals were randomly assigned to four different experimental groups: sham DMSO, ischemia DMSO, sham coumestrol and ischemia coumestrol. One hour before surgery, mice received intraperitoneal injections of 20 mg/kg of coumestrol (Sigma) (diluted in 100% dimethylsulfoxide, DMSO; Sigma) or vehicle (100% DMSO). The dose of 20 mg/kg was selected on the basis of previous reports, which demonstrated similar properties and actions of estradiol and coumestrol in the central nervous system [32]. Transient global ischemia was induced as described below. Sham animals underwent to the same surgical procedures, except for the carotid occlusion. Four days after surgery, mice underwent behavioral assessment (Fig.1). Taking into account, this is the required time for producing cell death in global ischemia models [5,6].

2.3. Surgical procedure

For the transient cerebral ischemia procedure, swiss male mice weighing between 20 and 28 g were used. The animals were anesthetized with halothane (2-3% for induction, 1-1.5% for maintenance). Transient global cerebral ischemia was induced by performing bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) using a curved bulldog artery clamp, for 20 minutes, and followed by reperfusion. Mice were kept on 37.5°C pad until they recovered from anesthesia. The incision was sutured using a silk 5-0 suture (Ethicon, USA). Following complete recovery from anesthesia, animals were returned to their cages and were housed. At 12, 24, and 48 h following BCCAO, mice for all experimental groups were sacrificed under decapitation and brain tissue was collected for biochemical analysis. The entire surgical procedure was performed except BCCAO in sham-operated mice.

2.4. Whole tissue extracts

At each time point (12, 24 or 48 hours after BCCAO), mice were quickly decapitated, and hippocampi were immediately dissected out and homogenized for 30 s in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and 1X protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN). Protein concentrations were determined by the BCA assay (Pierce, Rockford, IL). Protein samples were then resuspended in loading buffer (2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 0.003% bromophenol blue, and 5% 2-mercaptoethanol), incubated 15 min at 65°C, resolved on a SDS-PAGE gel, and subjected to western blot analysis.

2.5. SDS-PAGE and Western blot analysis

Protein extracts were size-separated through denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). For all blots, equal amounts of protein for each sample (50 µg) were loaded onto 10% polyacrylamide gels and run at 100 V using a Hoeffer model SE 600 electrophoresis unit. The proteins were then electro-transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) in tris-glycine-methanol buffer for 2 hours at 0.3 A. The membrane was blocked for 1 hr at room temperature in PBS-T pH 7.5 (PBS 0.1% Tween-20) containing 5% nonfat dry milk. The

membrane was then incubated overnight at 4 °C with different primary antibodies in blocking solution: mouse anti-GLUR-2 1:1000 (NeuroMab, Davis, CA) and mouse anti- β -actin 1:5000 (Sigma). The membrane was washed with blocking buffer 3 × 10 min and incubated for 1 hr at room temperature with the secondary goat anti-mouse 1:10000 (NeuroMab, Davis, CA). After that, membranes were washed 3 × 10 min with PBS-T, and then processed for chemiluminescence analysis using the Super Signal West Pico detection kit (Pierce). The films were scanned and band intensity was analyzed using Image J software (developed at the US National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>).

2.6. Reference memory protocol - Morris Water Maze

The effect of coumestrol on spatial learning and memory in mice was determined using the Morris Water Maze test [36] 4 days later ischemia or sham procedures. The reference memory task was done in a circular pool (110 cm diameter) in a water temperature of 21°C ± 1°C. Sham and ischemic mice were trained daily in a 4 trial water maze task for 3 consecutive days. Each trial last up to 60 s and was followed by 15 s of rest in a hidden black platform. During training, mice learned to escape from the water by finding a hidden platform submerged about 1cm below the water surface in a predetermined location. If the animal failed to find the platform in 60 s, it was manually placed on the platform and allowed to rest for 15 s. Each trial was separated by at least 12 min to avoid hypothermia and facilitate memory acquisition. The room where the maze apparatus was situated was supplied with visual stimuli hanging on the walls in order to provide spatial cues. A probe test without the platform was performed on the fourth day. Latency to find the platform during probe trial was measured as an indicator of learning.

2.9. Statistics

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Behavioral results and data from Western blot experiments were analyzed with two-way ANOVAs followed by Duncan *post-hoc* tests. All comparisons were performed using the SPSS software. In all cases, differences were considered significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Coumestrol affords neuroprotection against global cerebral ischemia-induced decreased GluR2 content in hippocampus

We first investigated the expression of the AMPA receptor subunit GluR2 content in mice treated with coumestrol that underwent ischemia. Results are shown in Fig. 2. Male mice received an acute intraperitoneal injection of coumestrol 1 h before induction of BCAA0, and hippocampi were removed after 12 h, 24 h and 48 h of reperfusion for further western blot analysis. Two-way ANOVA did not show differences between sham DMSO and sham coumestrol groups, but revealed a significant effect of ischemia on hippocampal levels of GluR2 at all times of reperfusion when compared to sham animals: 12h, $F(5,23)=65.23$; 24h, $F(5,23)=2.93$; 48h, $F(5,23)=41.47$ (all $ps < 0.05$). Further *post hoc* analysis revealed a significant difference between ischemia DMSO and ischemia coumestrol group at all-time intervals ($p < 0.05$). There was also a significant difference between sham control groups and ischemia coumestrol group at 48 h after ischemia ($p < 0.05$). These results indicate that coumestrol prevented the subsequent reduction in expression of GluR2 in hippocampus, suggesting a protective effect against GluR2 reduction associated with ischemia.

3.2 Coumestrol ameliorates memory deficits associated with ischemia

In order to verify whether coumestrol could prevent memory deficits induced by global ischemia, a maze task was used to evaluate spatial memory retention. Briefly, male mice were treated 1 hour before ischemia with a single dose of 20 mg/kg of coumestrol, and 4 days later were submitted to the Morris Water Maze (MWM) task. There was a significant difference between the sham and ischemia groups given DMSO, indicating that the memory retention on the probe day was impaired in the ischemic animals in comparison with control values $F(1,34)=20.84$ ($p < 0.05$) (Fig 3). No differences were observed between the sham groups. Coumestrol was effective in preventing memory impairment induced by global ischemia $F(1,34)=19.71$ ($p < 0.05$), indicating a possible involvement of coumestrol in improving spatial learning and memory in mice subjected to global ischemia.

4. Discussion

Transient global cerebral ischemia occurs in humans as a cardiac arrest consequence and, also could be induced experimentally in animals [37]. The reduced blood flow causes important energetic failure [38] leading to biochemical and molecular changes causing subsequently neurological disabilities [39] as attention deficit, memory and language impairment [40] related to the gradual hippocampus damage [41]. Animal models allow to study about the pathophysiology conditions which occur in humans in order to develop prevention, treatment and protection approaches [42].

Estradiol functions are widely discussed particularly by the neuroprotector potential. It is known to promote the neuronal survival after ischemia [43] and prevent the memory deficit associated [37]. Studies have been conducted with estrogen antagonist molecules, such as phytoestrogens, in order to examine its ability to attenuate neuronal death and cognitive impairment after brain injury [32,35,44]. There is structural similarity between estradiol and coumestrol compounds [45] furthermore, coumestrol has been demonstrated as a potent isoflavonoid with a strong affinity for both ER α and ER β when compared with 17 β – estradiol [34].

The present study investigated the potential coumestrol effect to prevent neuronal loss and memory deficits in male mice promoting neuroprotection against excitotoxic-related brain damage processes associated with global cerebral ischemia. We report that 20 min of transient global ischemia induced a marked decrease of GluR2 protein content in the mouse hippocampus, and pretreatment 1 hour before surgery with coumestrol attenuated this effect. Also, coumestrol prevented ischemia-induced loss of spatial memory assessed by water maze analysis.

For over two decades, it has been known that excessive glutamate release activates ionotropic glutamate receptors, causing calcium entry, excitotoxicity, and neuronal death in selective brain [46, 47, 48]. In addition, it has not been clarified why neurons in some regions of the brain, including hippocampal CA1 pyramidal neurons, are particularly vulnerable to glutamate-mediated excitotoxicity [13, 48, 49]. Experimental cerebral ischemia triggers suppression of GluR2 gene expression and subunit abundance, and enhances AMPAR-

mediated Ca^{+2} influx in vulnerable CA1 pyramidal neurons before cell death [15, 50, 51]. Thus, because AMPARs lacking the GluR2 subunit contribute to delayed CA1 pyramidal cell death after ischemia, the identification of therapeutic agents capable of regulating GluR2 levels is required.

Our results are in agreement with previous reports showing that induction of global cerebral ischemia reduced hippocampal GluR2 protein levels leading to expression of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors, Ca^{2+} influx, and excitotoxicity at CA1 synapses [15, 52, 53, 54]. The coumestrol actions reported here provide some possible mechanistic basis for neuroprotective effects against glutamate-mediated excitotoxicity in cerebral ischemia because prevented the subsequent reduction of GluR2 expression in hippocampus all times of reperfusion. Its well known the estrogen modulates the glutamatergic system activities in hippocampal cells [55] may influence the expression of AMPA receptors by genomic mechanisms suggesting a causal relationship between the hormone and the glutamatergic receptor [56].

The modulation of glutamatergic activity by estrogens may have functional implications related to neuroprotection and neurodegeneration. Hence, it is possible that one of the mechanisms involved in the neuroprotective actions of estradiol involves the modulation of AMPAR activity by rescuing the reduction in GluR2 expression after ischemia, thus modulating Ca^{2+} permeability. Phytoestrogen genistein can protect hippocampus CA1 region from delayed neuronal death after ischemia by antioxidant mechanisms promoting increase phosphorylation of oxide nitric endothelial synthase (e- NOS) enzyme involved in the neuroprotective mechanisms [44]. Then, its suggested coumestrol is capable for eliciting neuroprotection using estrogenic pathways because this similarity may be through ER, antioxidant pathways, growth factors release or another possibilities.

The $\text{ER}\alpha$ and $\text{ER}\beta$ are found both in nucleus and cytoplasm or cell membrane and are responsible for conducting nuclear and extranuclear signaling pathways [57], acting as nuclear transcription factors estrogen dependent regulating the expression of many genes such as growth factors and apoptotic and anti-apoptotic mediators [58]. The $\text{ER}\alpha$ has an important role in provide neuroprotection by estrogens and similar compounds after brain ischemia [59,

60], however some phytoestrogens have greater ER β affinity suggesting that protective effects may be mediated by this pathway [61]. Previous research in our laboratory have shown that acute coumestrol administration is effective to reduce neuronal death in hippocampus after ischemia in ovariectomized female rats explained by the estrogen receptor partial activation, antioxidant activity and GPR30 (transmembrane estrogen receptor) activation [27] which in turn may stimulate the cAMP production, mobilize the intracellular calcium and activate growth factors pathways [62].

First evidence about the neuroprotective coumestrol action reports the effect against the Na⁺/K⁺-ATPase activity inhibition post ischemia, suggesting a possible treatment for ischemic injuries leads by excitotoxicity [35]. The GluR2 subunit expression may be influenced by estrogen or no estrogen compounds and also the mechanism could be regulated by neurotrophic factors, like GDNF and BDNF [63]. However, there are few studies about coumestrol effects in cerebral ischemia, and this is the first study to explore glutamatergic system relationship with coumestrol influence on AMPA receptors and GluR2 expression in hippocampal neurons post ischemia, because that, coumestrol action in maintenance GluR2 expression levels remains unclear, more studies are necessary to clarify the signaling pathway in this process.

The phytoestrogens actions are particularly relevant considering the location of ER in hippocampus [64] and prefrontal cortex [65], brain areas that play an important role in the development of learning, memory and cognitive functions and also highly vulnerable to the decline related to aging [41]. Transient global ischemia induces selective, delayed cell death of pyramidal neurons in the CA1 hippocampus [22, 66] and causes functional deficits in learning and memory in rats [67]. Spatial memory tasks are dependent on the hippocampal integrity and the Morris Water Maze task is the most extensively behavioral test of hippocampus-dependent memory [68]. Because coumestrol demonstrated to be neuroprotective in vivo and considering its parallel activity with estradiol [27] we hypothesized that coumestrol could protect from memory impairments usually detected after ischemia. As expected, ischemia caused memory impairment in the spatial maze assessment accompanied by marked death of CA1 pyramidal neuron, suggested by reduction of GluR2 levels, and a single dose of coumestrol

given 1 h before ischemia prevented the memory impairment. This result is extremely important, since functional dependence is a major concern of a stroke survivor.

Estradiol effects improving spatial memory are widely reported, and the decreased estrogen levels during menopause or even premature ovaries removal can lead to memory impairment in rodents [33]. Studies suggest that phytoestrogens administration can promote positive results in learning and spatial memory performance in Morris Water Maze [33, 44], corroborating the results found here. Consistent evidence supports a role for estradiol in long-term potentiation (LTP) enhancement, leading to increased actin polymerization and increased numbers of AMPA receptors [69,70] thereby ameliorating memory deficits after ischemia [71,72]. Considering that coumestrol might share similar mechanisms with estrogens when preserving memory, it is possible that coumestrol could use the estradiol intracellular signaling to preserve memory impairment. In addition, its neuroprotective effects might have contribute to partially preserve neuronal death from the global cerebral ischemia, which may collaborate on memory retain.

In summary, here we provide new data that coumestrol provides protection against global ischemia in mice using alterations in the GluR2 receptor as a biomarker and protection against memory impairment due to global ischemia that may be in part due to a combination of protective actions as well as actions on LTP. Together, our findings suggest a potential role of coumestrol as a neuroprotective and cognitive-enhancing agent. A limitation of this study was not to apply another complementary memory assessment. However, in future, our perspective is to compare coumestrol and estradiol effects on glutamate receptors in order to investigate the neuroprotection mechanisms post ischemia.

5. Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and also by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazilian Foundations.

Fig.1

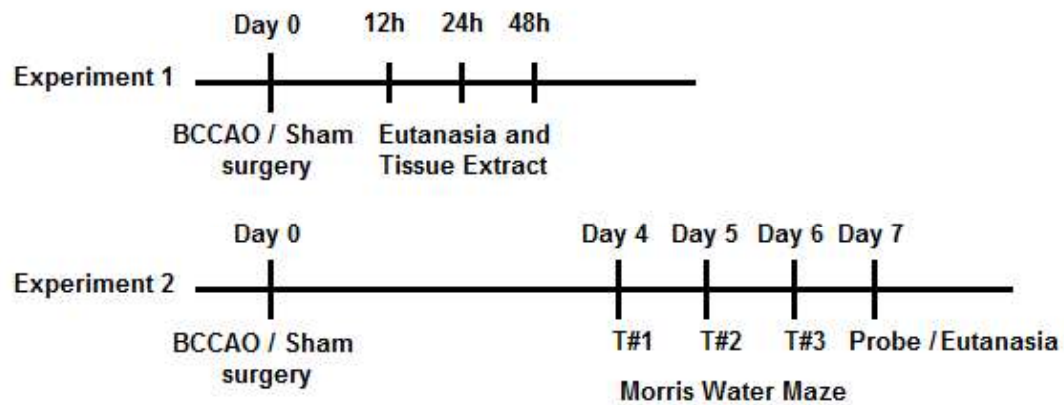


Fig.2

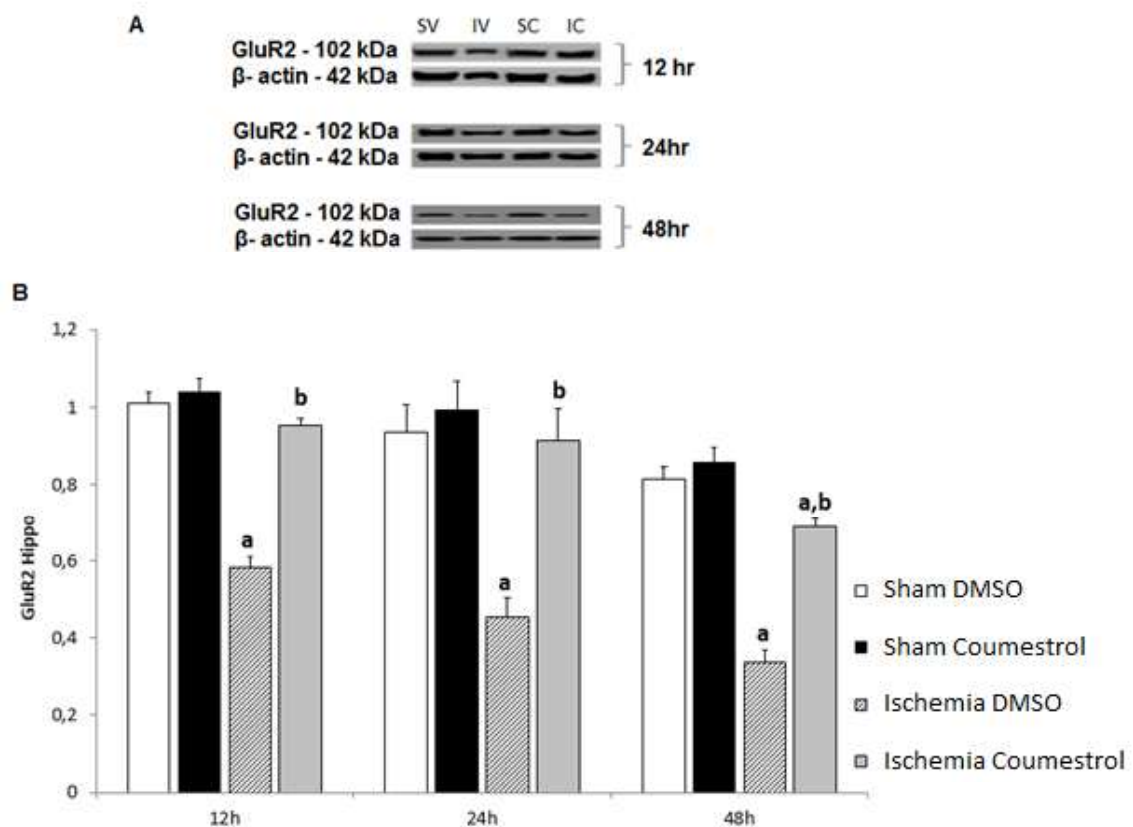


Fig.3

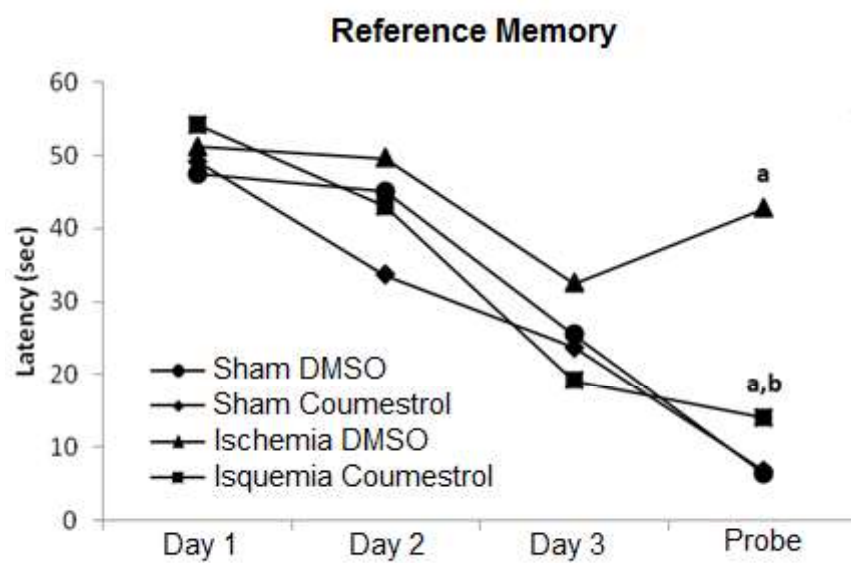


Figure legends

Fig.1 Time line of Experimental Procedures. Experiment 1: Transient global ischemia or sham surgery was induced. Four animals from each experimental group were sacrificed at 12, 24 and 48 hours after surgery and hippocampi were collected for biochemical analysis. Experiment 2: Transient global ischemia or sham surgery was induced. Nine-eleven animals from each experimental group were performed Morris Water Maze and were sacrificed after probe. BCCAO: Bilateral Common Carotid Artery Occlusion. T#1: Trial 1. T#2: Trial 2. T#3: Trial 3.

Fig. 2. Effect of coumestrol treatment on hippocampal protein levels of the AMPA GluR2 in different times after BCCAO. (A) Representatives Western Blots images from each groups (sham DMSO; ischemia DMSO; sham coumestrol; ischemia coumestrol). (B) GluR2 levels measured in the hippocampi from ischemic and sham groups at all-times of reperfusion (**a** $p < 0.05$ ischemia DMSO group versus sham DMSO group; Duncan **b** $p < 0.05$ ischemia DMSO group versus ischemia coumestrol group; **a,b** $p < 0.05$ sham control groups versus ischemia coumestrol group at 48 hr; $n=4$). Uniformity gel loading was confirmed with b-actin as the standard. Bars represent the mean $\pm$ S.E.M. Two-way ANOVA with Duncan post hoc test.

Fig. 3. Reference memory task performance on the Morris Water Maze four days post ischemia. (**a** $p < 0.05$ ischemia DMSO group versus sham groups; **a,b** $p < 0.05$ ischemia coumestrol group versus ischemia DMSO group, $n= 9-11$). Each line represents mean $\pm$ S.E.M. Two-way ANOVA with Duncan post hoc test.

Disclosures none.

References

- [1] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(4):e18-e209. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160056> >.
- [2] Mohr JP, Caplan LR, Melski JW, Goldstein RJ, Duncan GW, Kistler JP, et al. The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry. *Neurology*. 1978;28(8):754-62. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/567291> >.
- [3] Oz M, Demir EA, Caliskan M, Mogulkoc R, Baltaci AK, Nurullahoglu Atalik KE. 3',4'-Dihydroxyflavonol attenuates spatial learning and memory impairments in global cerebral ischemia. *Nutr Neurosci*. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25290491> >.
- [4] Lerouet, D. et al. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, v. 958, n. 1, p. 166-75, Dec 2002a. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12468042> >.
- [5] Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*. 1982;11(5):491-8. Epub 1982/05/01. doi: 10.1002/ana.410110509. PubMed PMID: 7103425.
- [6] Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*. 1991;40(3):599-636. Epub 1991/01/01. doi: 0306-4522(91)90001-5 [pii]. PubMed PMID: 1676492.
- [7] Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci*. 2003;6(10):1039-47. Epub 2003/09/23. doi: 10.1038/nn1119
nn1119 [pii]. PubMed PMID: 14502288.
- [8] Choi DW, Hartley DM. Calcium and glutamate-induced cortical neuronal death. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1993;71:23-34. Epub 1993/01/01. PubMed PMID: 8093332.
- [9] Rothstein JD. Excitotoxicity hypothesis. *Neurology*. 1996;47(4 Suppl 2):S19-25; discussion S6. Epub 1996/10/01. PubMed PMID: 8858047.
- [10] Andrabi SA, Kang HC, Haince JF, Lee YI, Zhang J, Chi Z, et al. Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly(ADP-ribose) polymer-induced cell death. *Nat Med*. 2011;17(6):692-9. Epub 2011/05/24. doi: nm.2387 [pii]
10.1038/nm.2387. PubMed PMID: 21602803; PubMed Central PMCID: PMC3709257.

[11] Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. 2007;54(6):859-71. Epub 2007/06/22. doi: S0896-6273(07)00410-2 [pii]

10.1016/j.neuron.2007.06.001. PubMed PMID: 17582328.

[12] Friedman LK, Pellegrini-Giampietro DE, Sperber EF, Bennett MV, Moshe SL, Zukin RS. Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABAA receptor gene expression in adult rat hippocampus: an in situ hybridization study. *J Neurosci*. 1994;14(5 Pt 1):2697-707. Epub 1994/05/01. PubMed PMID: 8182436.

[13] Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci*. 1997;20(10):464-70. Epub 1997/11/05. doi: S0166-2236(97)01100-4 [pii]. PubMed PMID: 9347614.

[14] Friedman LK. Selective reduction of GluR2 protein in adult hippocampal CA3 neurons following status epilepticus but prior to cell loss. *Hippocampus*. 1998;8(5):511-25. Epub 1998/11/24. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:5<511::AID-HIPO9>3.0.CO;2-W. PubMed PMID: 9825961.

[15] Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. *Brain Res*. 2000;886(1-2):190-207.

[16] Gorter JA, Petrozzino JJ, Aronica EM, Rosenbaum DM, Opitz T, Bennett MV, et al. Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci*. 1997;17(16):6179-88. Epub 1997/08/15. PubMed PMID: 9236229.

[17] Bennett MV, Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Aronica E, Connor JA, Zukin RS. The GluR2 hypothesis: Ca(++)-permeable AMPA receptors in delayed neurodegeneration. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1996;61:373-84. Epub 1996/01/01. PubMed PMID: 9246466.

[18] Oguro K, Oguro N, Kojima T, Grooms SY, Calderone A, Zheng X, et al. Knockdown of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons. *J Neurosci*. 1999;19(21):9218-27. Epub 1999/10/26. PubMed PMID: 10531425.

[19] Markus R, Reutens DC, Kazui S, Read S, Wright P, Pearce DC, et al. Hypoxic tissue in ischaemic stroke: persistence and clinical consequences of spontaneous survival. *Brain*. 2004;127(Pt 6):1427-36.

[20] Waters EM, Simerly RB. Estrogen induces caspase-dependent cell death during hypothalamic development. *J Neurosci*. 2009;29(31):9714-8. Epub 2009/08/07. doi: 29/31/9714 [pii]

10.1523/JNEUROSCI.0135-09.2009. PubMed PMID: 19657024.

[21] Hajszan T, MacLusky NJ. Neurologic links between epilepsy and depression in women: is hippocampal neuroplasticity the key? *Neurology*. 2006;66(6 Suppl

3):S13-22. Epub 2006/03/29. doi: 66/66_suppl_3/S13 [pii]. PubMed PMID: 16567737.

[22] Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MV, Etgen AM, et al. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J Neurosci*. 2002;22(6):2115-24. Epub 2002/03/16. doi: 22/6/2115 [pii]. PubMed PMID: 11896151.

[23] Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*. 2007;72(5):381-405. Epub 2007/03/24. doi: S0039-128X(07)00032-3 [pii]

10.1016/j.steroids.2007.02.003. PubMed PMID: 17379265; PubMed Central PMCID: PMC2048656.

[24] De Nicola AF, Pietranera L, Beauquis J, Ferrini MG, Saravia FE. Steroid protection in aging and age-associated diseases. *Exp Gerontol*. 2009;44(1-2):34-40. Epub 2008/05/01. doi: S0531-5565(08)00085-5 [pii]

10.1016/j.exger.2008.03.005. PubMed PMID: 18445514.

[25] Friedman LK, Segal M. Early exposure of cultured hippocampal neurons to excitatory amino acids protects from later excitotoxicity. *Int J Dev Neurosci*. 2010;28(2):195-205. Epub 2009/11/17. doi: S0736-5748(09)00177-4 [pii]

10.1016/j.ijdevneu.2009.11.002. PubMed PMID: 19913087.

[26] Numakawa Y, Matsumoto T, Yokomaku D, Taguchi T, Niki E, Hatanaka H, et al. 17beta-estradiol protects cortical neurons against oxidative stress-induced cell death through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase and in the accumulation of intracellular calcium. *Endocrinology*. 2007;148(2):627-37. Epub 2006/11/04. doi: en.2006-1210 [pii]

10.1210/en.2006-1210. PubMed PMID: 17082253.

[27] Canal Castro C, Pagnussat AS, Orlandi L, Worm P, Moura N, Etgen AM, et al. Coumestrol has neuroprotective effects before and after global cerebral ischemia in female rats. *Brain Res*. 2012;1474:82-90. Epub 2012/07/25. doi: S0006-8993(12)01172-9 [pii]

10.1016/j.brainres.2012.07.025. PubMed PMID: 22824334.

[28] Lebesgue D, Chevalleyre V, Zukin RS, Etgen AM. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids*. 2009;74(7):555-61. Epub 2009/05/12. doi: S0039-128X(09)00020-8 [pii]

10.1016/j.steroids.2009.01.003. PubMed PMID: 19428444; PubMed Central PMCID: PMC3029071.

[29] Frye CA, Duffy CK, Walf AA. Estrogens and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task. *Neurobiol*

Learn Mem. 2007;88(2):208-16. Epub 2007/05/18. doi: S1074-7427(07)00052-4 [pii]

10.1016/j.nlm.2007.04.003. PubMed PMID: 17507257; PubMed Central PMCID: PMC2077328.

[30] Stahl S, Chun TY, Gray WG. Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;152(1):41-8. Epub 1998/10/17. doi: S0041-008X(98)98500-3 [pii]

10.1006/taap.1998.8500. PubMed PMID: 9772198.

[31] Makela S, Santti R, Salo L, McLachlan JA. Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ Health Perspect.* 1995;103 Suppl 7:123-7. Epub 1995/10/01. PubMed PMID: 8593857; PubMed Central PMCID: PMC1518873.

[32] Anastácio, J. R. et al. Resveratrol treatment has neuroprotective effects and prevents cognitive impairment after chronic cerebral hypoperfusion. *Neurol Res.* 2014; 36 (7): 627-33. Epub 2014/01/01. doi: 10.1179/1743132813Y.0000000293.

[33] Dong Y, Wang Y, Liu Y, Yang N, Zuo P. Phytoestrogen α -zearalanol ameliorates memory impairment and neuronal DNA oxidation in ovariectomized mice. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68(9):1255-62.

[34] Whitten PL, Patisaul HB, Young LJ. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicol Teratol.* 2002;24(1):47-54. Epub 2002/02/12. doi: S0892036201001921 [pii]. PubMed PMID: 11836071.

[35] Castro et al., Coumestrol treatment prevents Na⁺, K⁺-ATPase inhibition and affords histological neuroprotection to male rats receiving cerebral global ischemia. *Neurol Res.* 2014;36(3):198-206. doi: 10.1179/1743132813Y.0000000286.

[36] Jiang J, Gao K, Zhou Y, Xu A, Shi S, Liu G, et al. Electroacupuncture Treatment Improves Learning-Memory Ability and Brain Glucose Metabolism in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: Using Morris Water Maze and Micro-PET. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:142129.

[37] Inagaki T, Etgen AM. Neuroprotective action of acute estrogens: animal models of brain ischemia and clinical implications. *Steroids.* 2013;78(6):597-606.

[38] Mergenthaler, P.; Dirnagl, U.; Meisel, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*, v. 19, n. 3-4, p. 151-67, Dec 2004. ISSN 0885-7490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554412> >.

[39] Rodrigo, J. et al. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med*, v. 39, n. 1, p. 26-50, Jul 2005. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925277> >.

[40] Kase, C. S. et al. Intellectual decline after stroke: the Framingham Study. *Stroke*, v. 29, n. 4, p. 805-12, Apr 1998. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9550515> >.

[41] Farkas, E.; Luiten, P. G.; Bari, F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, v. 54, n. 1, p. 162-80, Apr 2007. ISSN 0165-0173. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296232> >.

[42] Alonso de Leciñana, M. et al. New goals in ischemic stroke therapy: the experimental approach--harmonizing science with practice. *Cerebrovasc Dis*, v. 20 Suppl 2, p. 159-68, 2005. ISSN 1015-9770. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327267> >.

[43] Alkayed, N. J. et al. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke*, v. 31, n. 1, p. 161-8, Jan 2000. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625733> >.

[44] Wang R, Tu J, Zhang Q, Zhang X, Zhu Y, Ma W, et al. Genistein attenuates ischemic oxidative damage and behavioral deficits via eNOS/Nrf2/HO-1 signaling. *Hippocampus*. 2013;23(7):634-47

[45] Kurzer, M. S.; Xu, X. Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr*, v. 17, p. 353-81, 1997a. ISSN 0199-9885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9240932> >.

[46] Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol*. 2013;698(1-3):6-18. Epub 2012/11/06. doi: S0014-2999(12)00900-4 [pii]

10.1016/j.ejphar.2012.10.032. PubMed PMID: 23123057.

[47] Kostandy BB. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci*. 2012;33(2):223-37. Epub 2011/11/03. doi: 10.1007/s10072-011-0828-5. PubMed PMID: 22044990.

[48] Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(5):399-415. Epub 2003/05/03. doi: 10.1038/nrn1106

nrn1106 [pii]. PubMed PMID: 12728267.

[49] Kittler JT. Censoring the editor in transient forebrain ischemia. *Neuron*. 2006;49(5):646-8. Epub 2006/03/01. doi: S0896-6273(06)00130-9 [pii]

10.1016/j.neuron.2006.02.013. PubMed PMID: 16504939.

[50] Alsbo CW, Wrang ML, Moller F, Diemer NH. Is the AMPA receptor subunit GluR2 mRNA an early indicator of cell fate after ischemia? A quantitative single cell RT-PCR study. *Brain Res*. 2001;894(1):101-8. Epub 2001/03/14. doi: S0006-8993(01)01985-0 [pii]. PubMed PMID: 11245820.

[51] Bell JD, Park E, Ai J, Baker AJ. PICK1-mediated GluR2 endocytosis contributes to cellular injury after neuronal trauma. *Cell Death Differ*. 2009;16(12):1665-80. Epub 2009/08/01. doi: cdd2009106 [pii]

10.1038/cdd.2009.106. PubMed PMID: 19644508.

[52] Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, Zhu D, et al. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron*. 2006;49(5):719-33. Epub 2006/03/01. doi: S0896-6273(06)00079-1 [pii]

10.1016/j.neuron.2006.01.025. PubMed PMID: 16504947.

[53] Wang H, Luo M, Li C, Wang G. Propofol post-conditioning induced long-term neuroprotection and reduced internalization of AMPAR GluR2 subunit in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Neurochem*. 2011;119(1):210-9. Epub 2011/07/28. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07400.x. PubMed PMID: 21790606.

[54] Liu S, Lau L, Wei J, Zhu D, Zou S, Sun HS, et al. Expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron*. 2004;43(1):43-55. Epub 2004/07/06. doi: 10.1016/j.neuron.2004.06.017

S0896627304003642 [pii]. PubMed PMID: 15233916.

[55] Cyr M, Calon F, Morissette M, Grandbois M, Di Paolo T, Callier S. Drugs with estrogen-like potency and brain activity: potential therapeutic application for the CNS. *Curr Pharm Des*. 2000;6(12):1287-312

[56] Le Saux M, Estrada-Camarena E, Di Paolo T. Selective estrogen receptor-alpha but not -beta agonist treatment modulates brain alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *J Neurosci Res*. 2006;84(5):1076-84.

[57] Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005;19:1951–9.

[58] Schreihöfer DA, Ma Y. Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: who, what, where, and when? *Brain Res* 2013;1514:107–22.

[59] Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, et al. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1952–7.

[60] Merchenthaler I, Dellovade TL, Shughrue PJ. Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1007:89–100.

[61] Belcher, S.M., Zsarnovszky, A., 2001. Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299 (2), 408–414.

[62] Takeuchi K, Yang Y, Takayasu Y, Gertner M, Hwang JY, Aromolaran K, et al. Estradiol pretreatment ameliorates impaired synaptic plasticity at synapses of insulted CA1 neurons after transient global ischemia. *Brain Res*. 2014.

- [63] Brené S, Messer C, Okado H, Hartley M, Heinemann SF, Nestler EJ. Regulation of GluR2 promoter activity by neurotrophic factors via a neuron-restrictive silencer element. *Eur J Neurosci*. 2000;12(5):1525-33.
- [64] Maki PM, Dennerstein L, Clark M, Guthrie J, Lamontagne P, Fornelli D, et al. Perimenopausal use of hormone therapy is associated with enhanced memory and hippocampal function later in life. *Brain Res* 2011;1379: 232–43.
- [65] Shanmugan S, Epperson CN. Estrogen and the prefrontal cortex: Towards a new understanding of estrogen's effects on executive functions in the menopause transition. *Hum Brain Mapp* 2012.
- [66] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 1979;10(3):267-72. Epub 1979/05/01. PubMed PMID: 37614.
- [67] Dabaghian FH et al., Effect of *Cyperus rotundus* on ischemia-induced brain damage and memory dysfunction in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2015 Feb;18(2):199-204.
- [68] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11(1):47-60. Epub 1984/05/01. doi: 0165-0270(84)90007-4 [pii]. PubMed PMID: 6471907.
- [69] Kramar EA, Chen LY, Brandon NJ, Rex CS, Liu F, Gall CM, et al. Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci*. 2009;29(41):12982-93. Epub 2009/10/16. doi: 29/41/12982 [pii]
- 10.1523/JNEUROSCI.3059-09.2009. PubMed PMID: 19828812; PubMed Central PMCID: PMC2806054.
- [70] Briz V, Baudry M. Estrogen Regulates Protein Synthesis and Actin Polymerization in Hippocampal Neurons through Different Molecular Mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014; 25;5:22. doi: 10.3389/fendo.2014.00022. eCollection 2014.
- [71] Smith CC, McMahon LL. Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci*. 2005;25(34):7780-91. Epub 2005/08/27. doi: 25/34/7780 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.0762-05.2005. PubMed PMID: 16120779.
- [72] Inagaki T, Kaneko N, Zukin RS, Castillo PE, Etgen AM. Estradiol attenuates ischemia-induced death of hippocampal neurons and enhances synaptic transmission in aged, long-term hormone-deprived female rats. *PLoS One*. 2012;7(6):e38018. Epub 2012/06/08. doi: 10.1371/journal.pone.0038018
- PONE-D-12-00066 [pii]. PubMed PMID: 22675505; PubMed Central PMCID: PMC3366987.

5. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Este estudo visou desenvolver novas contribuições para a literatura no campo da Neurociências, no que diz respeito aos mecanismos envolvidos na isquemia cerebral bem como as abordagens capazes de promover a neuroproteção no tecido e prevenir o dano neuronal e subsequente prejuízo cognitivo. Nossos interesses foram voltados em obter maior entendimento do potencial efeito do composto Coumestrol nas células do hipocampo que expressam os receptores AMPA constituídos pela subunidade GluR2, responsável por modular a permeabilidade do Ca^{2+} na célula. Foi observado a significativa redução da expressão dos níveis de GluR2 no hipocampo de camundongos após a isquemia cerebral. Esta redução não ocorreu em animais que fizeram uso do coumestrol, sugerindo o potencial neuroprotetor deste composto nas células. Este achado bioquímico corrobora os resultados dos testes comportamentais que indicam que os animais cujo o coumestrol foi aplicado obtiveram menor dano cognitivo observado pelo protocolo de memória de referência do Labirinto Aquático de Morris. Sendo assim, o coumestrol foi capaz de agir como um agente neuroprotetor no processo isquêmico.

Este foi o primeiro estudo a avaliar os efeitos do coumestrol nos níveis de expressão de GluR2 em camundongos machos após a isquemia. Os objetivos deste estudo foram atingidos, uma vez que foi identificado o potencial neuroprotetor do composto coumestrol atuando na prevenção da morte neuronal causada pelos processos isquêmicos. Tendo em vista que o AVC é uma das maiores causas de morte no mundo e que até o presente momento o único fármaco viável no tratamento é a Alteplase, a relevância clínica deste achado constitui uma possível alternativa no tratamento imediato e/ou prevenção das sequelas cognitivas causadas pela lesão cerebral isquêmica em seres humanos. Para que esta seja uma solução confiável e aplicável, se faz necessária a reprodução de mais estudos sobre o tema que tragam um maior entendimento sobre o mecanismo das vias de sinalização do coumestrol sobre a expressão de GluR2 dos receptores AMPA glutamatérgicos. Nesta perspectiva, é interessante desenvolver, em uma próxima etapa, a comparação dos compostos coumestrol e estradiol e implementar agentes que auxiliem a visualização das vias de ação como os fatores de crescimento ou a quantificação de enzimas implicadas nos

processos antioxidantes a fim de estabelecer um mecanismo de sinalização, bem como a aplicação de outras avaliações comportamentais que auxiliem a determinar o dano cognitivo.

ANEXO A – Comprovante de aprovação do projeto pelo Comissão de Ética no Uso de Animais

 **COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
UFCSPA**

A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

Projeto: 13-127 **Versão do Projeto:** **Versão do TCLE:**

Pesquisadores:
ALINE DE SOUZA PAGNUSSAT
CARLOS ALEXANDRE NETO
ANA PAULA MARTINI
FERNANDA CECHETI
ANGELA WYSE

Título: POTENCIAL NEUROPROTETOR DA TERAPIA COM COUMESTROL EM MODELO ANIMAL DE HIPOPERFUSÃO CEREBRAL CRÔNICA

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim com eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.

Porto Alegre, 18 de outubro de 2013.


Katya V. Rios
Coordenadora da CEUA
UFCSPA

ANEXO B – Normas de formatação do periódico Neuroscience Letters

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Neuroscience Letters is devoted to the rapid publication of short, high-quality papers of interest to the broad community of neuroscientists. Only papers which will make a significant addition to the literature in the field will be published. Papers in all areas of neuroscience - molecular, cellular, developmental, systems, behavioral and cognitive, as well as computational - will be considered for publication. Submission of laboratory investigations that shed light on disease mechanisms is encouraged. Clinical studies will also be published if they provide new information about organization or actions of the nervous system, or provide new insights into the neurobiology of disease. Papers that are primarily devoted to psychological or philosophical questions, that use unvalidated methodology, or that fall outside of the realm of neuroscience, will not be published.

The Neuroscience Peer Review Consortium

Neuroscience Letters is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers. It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results. If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can submit the manuscript to *Neuroscience Letters* and indicate that the referees' reports from the first journal will be made available to the Editors of Neuroscience Letters.

It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to *Neuroscience Letters*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Neuroscience Letters* without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available. Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, reformat the paper to *Neuroscience Letters'* specification and submit the paper to *Neuroscience Letters* with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that the authors will ask for the referees' reports to be forwarded from the first Consortium journal. The authors then must contact the first journal, and ask that reviews be forwarded, indicating they have submitted to *Neuroscience Letters*, and providing the new manuscript ID number.

The Editors of *Neuroscience Letters* will use forwarded referees' reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary. Visit <http://nprc.incf.org> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

Data in Brief

Data in Brief. Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Data in Brief may be submitted directly to the Journal of Proteomics alongside a research article. Authors are encouraged to convert their supplementary data into a Data in Brief article when they submit a revised version of their manuscript to the Journal of Proteomics. If your research article is accepted, your Data in Brief article will also be published in the new, open access journal, Data in Brief. The Open Access fee for Data in Brief in 2015 is \$250. Please directly contact the publisher to request any need-based waivers or discounts. Please use the following template to write your Data in Brief.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article. For other policy issues, authors are referred to the policy guidelines of the Society for Neuroscience (see their website <http://www.jneurosci.org/misc/itoa.shtml>).

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in

these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>. For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 1800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/nsl/> For submission queries, please contact the Editorial Office (NSL@elsevier.com).

Referees

Authors must send the names, addresses and email addresses for 8-10 potential referees that meet the following criteria: potential referees must be experts or active workers in the field, must not be current or prior mentors or collaborators, and must have institutional email addresses (e.g., xx.yy@zz.edu) and not generic email addresses (e.g., xx.yy@163.com or xx.yy@gmail.com). Although the journal does not guarantee these reviewers will be used, the Editors take these suggestions under consideration. These recommendations help the journal speed the editorial process.

Additional information

Length of manuscripts will in no case be more than 6 printed pages (5000 words) of the journal. As an approximate guide to authors for judging the length of their paper, the following estimation may be used: heading + abstract = 0.5-0.6 pages; 3 type-written (double-spaced) pages = 1 printed page; (when using a word processor) 850 words or 5300 characters = 1 printed page; 3 single-column wide or 2 double-column wide figures plus legends = 1 printed page; 3 single-column wide or 2 doublecolumn wide tables = 1 printed page; 17 references = 0.5 printed page.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is in very occasional cases appropriate, although in general, Results and Discussion should be presented as distinct sections of the manuscript. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.
Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue. Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/neuroscience-letters>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
 - Full postal address
- All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>

