

Antihypoxic Activities of Coenzyme Q and Folic Acid in Asphyctic, Hemic, and Circulatory Hypoxia Models in Mice

Mahsa Modammadyan^{1,2},
Farzaneh Motafeghi^{3,2},
Mohammad Eghbali^{1,2},
Mohammad Ali Ebrahimzadeh^{4,2}

¹ Doctor of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD Student in Toxicology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 3, 2022 ; Accepted May 6, 2023)

Abstract

Background and purpose: Hypoxia is a decrease in oxygen levels of body tissues which can lead to body function impairment. Coenzyme Q and folic acid are well-known drugs with distinctive antioxidant and anti-ischemic activities, but, nothing is known about antihypoxic activities of these compounds. The current study investigated the antihypoxic activities of Coenzyme Q and folic acid in three experimental models of hypoxia; asphyctic, circulatory, and hemic.

Materials and methods: Protective effects of coenzyme Q at 25, 50, and 100 mg/kg and folic acid at 10, 20, and 40 mg/kg against hypoxia-induced lethality in mice were evaluated by increase in the survival time in asphyctic hypoxia, haemic hypoxia, and circulatory hypoxia models against negative control (normal saline) and positive control (propranolol 30 mg/kg). Analysis of variance was performed followed by Newman-Keuls multiple comparison test to determine the differences between means.

Results: Coenzyme Q at 25 mg/kg, in asphyctic and circulating models, showed activities similar to those of propranolol in increasing the survival time ($P>0.05$). Folic acid at 10 mg/kg, in hemic and circulating models, exhibited activities similar to those of propranolol in increasing the survival time ($P>0.05$).

Conclusion: Coenzyme Q and folic acid showed good protective effects by increasing the survival time against hypoxia in all models. The effects were dominant, especially in asphyctic and circulating models for coenzyme Q and in hemic and circulating models for folic acid which led to prolonged survival times. These drugs seem to have a good potential in treatment of hypoxic conditions.

Keywords: asphyctic hypoxia, hemic hypoxia, circulatory hypoxia, Coenzyme Q, folic acid

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (221): 126-131 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Ali Ebrahimzadeh - Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: :zadeh20@yahoo.com)

ارزیابی فعالیت آنتی هیپوکسی کوآنزیم Q و فولیک اسید در سه مدل مختلف هیپوکسی خفگی، خونی و جریان خونی در موش سوری

مهسا محمدیان^{۲۱}

فرزانه متفقی^{۲۳}

محمد اقبالی^{۲۱}

محمدعلی ابراهیم زاده^{۲۴}

چکیده

سابقه و هدف: هیپوکسی، کاهش اکسیژن موجود در بافت‌های بدن است که می‌تواند به اختلال در عملکرد بدن منجر شود. کوآنزیم Q و اسیدفولیک فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌ایسکمی خوبی دارند، اما تا امروز گزارشی در خصوص فعالیت آنتی‌هیپوکسی این داروها بیان نشده است، لذا مطالعه حاضر جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌هیپوکسی کوآنزیم Q و فولیک اسید در سه مدل مختلف هیپوکسی خفگی، خونی و جریان خونی در موش سوری انجام شد.

مواد و روش‌ها: اثر محافظتی دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg از کوآنزیم Q و دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ mg/kg از اسیدفولیک در مقابل مرگ و میر ناشی از هیپوکسی در موش سوری با افزایش زمان بقاء در سه مدل هیپوکسی خفگی، خونی و جریان خونی در مقابل کنترل منفی (نرمال سالین) و کنترل مثبت (پروپرانولول ۳۰ mg/kg) بررسی شد. آنالیز واریانس یک سویه و متعاقب آن تست نیومن کولز به منظور تعیین اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: کوآنزیم Q در دوز ۲۵ mg/kg در هیپوکسی گردش خونی و خفگی اثری مشابه پروپرانولول در افزایش میزان بقاء داشت ($P>0/05$). اسیدفولیک در مدل خونی و گردش خونی در دوز ۱۰ mg/kg اثری مشابه پروپرانولول در افزایش میزان بقاء از خود نشان داد ($P>0/05$).

استنتاج: کوآنزیم Q و اسیدفولیک فعالیت محافظتی به صورت افزایش زمان بقاء در تمامی مدل‌ها از خود نشان دادند. به خصوص کوآنزیم Q در مدل گردش خونی و خفگی و اسیدفولیک در مدل خونی و گردش خونی موجب افزایش زمان بقای موش‌ها شدند. به نظر می‌رسد این داروها پتانسیل خوبی برای استفاده در شرایط هیپوکسی را داشته باشند.

واژه های کلیدی: هیپوکسی خفگی، هیپوکسی خونی، هیپوکسی جریان خون، کوآنزیم Q، اسید فولیک

مقدمه

می‌شود. هیپوکسی به‌عنوان کاهش اکسیژن موجود در بافت‌های بدن تعریف می‌شود، که می‌تواند منجر به اختلال در عملکرد بدن و ایجاد ناهنجاری‌های فیزیولوژیکی شود (۱). کوآنزیم Q اهمیت زیادی در تولید انرژی در

یکی از وظایف سیستم قلبی عروقی و تنفسی، اکسیژن‌رسانی کافی به تمام بافت‌ها می‌باشد، که برای مصرف در میتوکندری و تولید ATP نیاز است. عموماً اختلال در این فرایند، به ایجاد محیط کم اکسیژن منجر

مؤلف مسئول: محمدعلی ابراهیم زاده - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail:zadeh20@yahoo.com

۱. دکتر داروساز، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دستیار سم شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۲/۱۶

سطح سلولی دارد. کاهش آن سبب ایجاد مشکلاتی چون اختلال در تنفس سلول‌های عصبی و اختلال در عملکرد قلب و سیستم ایمنی بدن می‌شود (۲). کوآنزیم Q که کوفاکتور مهم برای حمل و نقل الکترونی در میتوکندری است، دارای اثر آنتی‌اکسیدانی است (۳). مقالات متعددی در خصوص تاثیر مثبت آن بر سطح ATP و جلوگیری از تاثیرات مخرب شرایط هیپوکسی وجود دارد (۳،۴). اسیدفولیک نوعی ویتامین B است که در غذاهایی مانند لویا، عدس، گندم، جگر و چغندر یافت می‌شود. اسیدفولیک یک آنتی‌اکسیدان شناخته شده است که تاثیر مثبت آن در شرایط هیپوکسی و سکنه مغزی گزارش شده است (۵،۶). اسیدفولیک موجب کاهش سطح اینترلوکین ۱ بتا و فاکتور نکروزی توموری آلفا در شرایط هیپوکسی می‌گردد (۷). فولیک اسید موجب پایداری HIF-1 (hypoxia-inducible factor) شده و افزایش بقای سلول، متعاقب محرومیت از گلوکز و اکسیژن را باعث می‌شود (۸). این مطالعه به بررسی و ارزیابی فعالیت آنتی هیپوکسی کوآنزیم Q و اسیدفولیک در سه مدل هیپوکسی خونی، جریان خونی و خفگی پرداخته است، لازم به ذکر است که علی‌رغم فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تاثیر در ایسکمی/ری پرفیوژن این دو دارو، تاکنون فعالیت آنتی هیپوکسی در این مدل‌ها از آن‌ها گزارش نشده است.

مواد و روش‌ها

موش‌های سوری نر با سن حدود ۹ تا ۱۰ هفته در این مطالعه بکار رفتند. پروتکل رعایت اصول اخلاقی در تمامی مراحل به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران رسید (IR.MAZUMS.REC.1399.7041). در هر سه مدل هیپوکسی، ابتدا دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg از کوآنزیم Q و دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ mg/kg از فولیک اسید به مدت ۲۱ روز به موش‌ها گاوژ شد. در مدل خفگی، در روز ۲۱، ۳۰ دقیقه بعد از

گاوژ برای القاء هیپوکسی، هر موش در محفظه شیشه‌ای در بسته به حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر قرار داده شد. در مدل خونی، در روز ۲۱، ۳۰ دقیقه بعد از گاوژ برای القاء هیپوکسی، سدیم نیتريت (۳۶۰ mg/kg i.p.) به هر موش تزریق شد. در مدل هیپوکسی گردش خونی، در روز ۲۱، ۳۰ دقیقه بعد از گاوژ برای القاء هیپوکسی، سدیم فلورید (۱۵۰ mg/kg i.p.) به هر موش تزریق گردید. در تمامی مدل‌ها موش‌ها بر اثر کمبود اکسیژن محیط (هیپوکسی) مردند. اثر ضد هیپوکسی هر دارو به صورت افزایش زمان بقاء موش (به دقیقه) بیان شد. در تمامی مدل‌ها از نرمال سالین به عنوان کنترل منفی و از پروپرانولول ۳۰ mg/kg به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در هر مدل ۴۰ موش (۸ گروه با ۵ سر موش) به کار رفت (۹، ۱۰). تمامی اطلاعات به صورت Mean ± SD گزارش شد. آنالیز واریانس یک سویه و متعاقب آن نیومن کولز برای مقایسه میانگین‌ها به کار رفت. نتایج با احتمال $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها و بحث

نتایج حاصل از تزریق نیتريت سدیم در جدول شماره ۱ آمده است. این زمان بر حسب دقیقه بوده و مدت زمانی که موش پس از تزریق دچار تشنج و مرگ می‌شود را گزارش می‌کند. کوآنزیم Q در مدل هیپوکسی خونی در دوز ۱۰۰ mg/kg زمان مرگ را ۶/۲ دقیقه افزایش داد که این افزایش اختلاف معنی‌داری با کنترل منفی داشت ($P < 0.001$). پروپرانولول در دوز ۳۰ mg/kg زمان بقاء را حدود ۱/۵ دقیقه افزایش داد ($P < 0.05$). کوآنزیم Q در دوز ۵۰ mg/kg اثری معادل پروپرانولول از خود نشان داد ($P > 0.05$). فولیک اسید در دوز ۱۰ mg/kg زمان مرگ را ۱/۸ دقیقه افزایش داد که اختلاف معنی‌داری با کنترل منفی داشت ($P < 0.05$). تاثیر فولیک اسید در این دوز معادل پروپرانولول بود ($P > 0.05$).

جدول شماره ۱: فعالیت آنتی هیپوکسی کوآنزیم Q و فولیک اسید در مدل هیپوکسی خونی، گردش خونی و خفگی در موش سوری نر

ترکیب	دوز	تحرول معیار ± میانگین (هیپوکسی خونی)	تحرول معیار ± میانگین (هیپوکسی گردش خونی)	تحرول معیار ± میانگین (هیپوکسی خفگی)
نرمال سالین	۰/۵ ml	۱۰/۸۰ ± ۰/۴۵	۱۱/۲۰ ± ۰/۹۱	۱۸/۶۰ ± ۱/۳۵
کوآنزیم Q	۱۲/۵	—	—	۲۱/۸۰ ± ۱/۴۳*
کوآنزیم Q	۲۵	۱۰/۰۲ ± ۰/۸۱*	۱۱/۷۵ ± ۰/۹۸*	۲۴/۸۰ ± ۲/۵۹***
کوآنزیم Q	۵۰	۱۱/۸۰ ± ۰/۸۴*	۱۸/۶۰ ± ۱/۵۲***	۲۶/۸۱ ± ۱/۶۶***
کوآنزیم Q	۱۰۰	۱۷/۰۰ ± ۱/۳۳***	۱۹/۶۷ ± ۱/۳۲***	۲۷/۸۵ ± ۲/۵۷***
فولیک اسید	۱۰	۱۲/۶۰ ± ۱/۴۳*	۱۲/۲۰ ± ۰/۸۴*	۱۸/۶۰ ± ۱/۳۴*
فولیک اسید	۲۰	۱۲/۸۰ ± ۰/۸۴*	۱۳/۶۰ ± ۰/۹۰**	۲۰/۰۳ ± ۱/۸۷*
فولیک اسید	۴۰	۱۳/۴۰ ± ۱/۴۴**	۱۴/۶۰ ± ۱/۴۱***	۲۳/۲۰ ± ۱/۶۶***
پروپرانولول	۳۰	۱۲/۲۰ ± ۰/۸۴*	۱۲/۷۶ ± ۰/۸۹*	۲۶/۱۷ ± ۱/۶۹۰۰۰۰

ns: (p>0.05); * (p<0.05); ** (p<0.01); *** (p<0.001); **** (p<0.0001)
اختلاف نسبت به گروه نرمال سالین. در هر گروه از ۵ سر موش سوری نر استفاده شد. اعداد به شکل Mean±SD گزارش شده است.

نتایج حاصل از تزریق سدیم فلوراید در جدول شماره ۱ درج شده است. کوآنزیم Q در دوز ۵۰ mg/kg زمان مرگ را ۷/۴ دقیقه افزایش داد (P<۰/۰۰۰۱). پروپرانولول زمان بقاء را حدود ۱/۵ دقیقه افزایش داد (P<۰/۰۵). کوآنزیم Q در دوز ۲۵ mg/kg اثری معادل پروپرانولول از خود نشان داد (P>۰/۰۵). فولیک اسید در دوز ۲۰ mg/kg زمان زنده ماندن را ۲/۴ دقیقه (P<۰/۰۱) و در ۴۰ mg/kg ۳/۴ دقیقه (P<۰/۰۰۱) افزایش داد. فولیک اسید در دوز ۱۰ mg/kg اثری معادل پروپرانولول داشت (P>۰/۰۵).

نتایج حاصل از شرایط کمبود اکسیژن برای تست خفگی در جدول شماره ۱ آمده است. کوآنزیم Q در مدل هیپوکسی خفگی اثری قوی داشت که عملاً مجبور به استفاده از یک دوز پایین تر شدیم. این ترکیب در دوز ۱۲/۵ mg/kg زمان مرگ را ۳/۲ دقیقه (P<۰/۰۵) و در ۲۵ mg/kg ۶/۲ دقیقه افزایش داد (P<۰/۰۰۱). در این تست پروپرانولول در دوز ۳۰ mg/kg زمان بقاء را بیش از ۷ دقیقه افزایش داد (P<۰/۰۰۰۱). کوآنزیم Q در دوز ۲۵ mg/kg اثری معادل پروپرانولول داشت (P>۰/۰۵). فولیک اسید در مدل هیپوکسی خونی اثری بالایی از خود نشان نداد. در دوز ۴۰ mg/kg زمان مرگ را از به طور معنی داری طولانی نمود (۴/۵ دقیقه) (P<۰/۰۰۱). اما حتی در این دوز هم اثر آن با پروپرانولول قابل مقایسه نبود (P<۰/۰۱).

در یک گزارش، هیپوکسی موجب کوتاه شدن پتانسیل عمل بین غشایی و کاهش محتوای ATP غشا در عضله بطنی شد، اما این کاهش در گروه دریافت کننده کوآنزیم Q به طور معنی داری کم تر از گروه کنترل بود، پس کوآنزیم Q می تواند عضلات قلبی را از مشکلات القاء شده توسط هیپوکسی محافظت کند (۱۱). در مطالعه ای دیگر هیپوکسی موجب کاهش قدرت انقباضی قلب، کاهش متابولیت های ATP و کراتین فسفوکیناز شد. پیش درمانی با کوآنزیم Q موجب بازیابی قابل قبول قدرت انقباضی قلب و محتوای ATP بافت قلبی پس از اکسیژن رسانی شد. آزادسازی کراتین فسفوکیناز از قلب در خلال هیپوکسی و اکسیژن رسانی مجدد، با پیش درمانی کوآنزیم Q به طور کامل مهار شد (۱۱). کوآنزیم Q موجب افزایش cAMP قلبی در شرایط هیپوکسی شد. بنابراین اثر محافظتی کوآنزیم Q در بیماری ایسکمی قلب تایید شد (۱۲). امروزه کمبود و نارسایی کوآنزیم Q در بسیاری از بیماران مبتلا به سکته مغزی و کسانی که به منظور جلوگیری از سکته دوم استاتین مصرف می کنند، رایج است. مصرف کوآنزیم Q به طور موثری عملکرد مغزی و جراحات مغزی را بهبود می دهد (۱۳). تأثیر مکمل کوآنزیم Q بر استرس اکسیداتیو ناشی از هیپوکسی در افرادی که در ارتفاع بالا زندگی می کنند، بررسی شد. نتایج نشان داد که تجویز کوآنزیم Q اثر مهمی در پارامترهای اکسیداتیو استرس در جمعیت هیپوکسی دارد. استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز سکته مغزی ایسکمیک دارد. تجویز کوآنزیم Q منجر به کاهش میزان مرگ و میر، بهبود وضعیت عصبی و کاهش نکرور مغزی پس از ایسکمی مغزی شده است (۱۴). هیپوکسی نوزادان منجر به مشکلات اکسیداتیو در نوزادان نارس و موجب آسیب ریه می شود. کوآنزیم Q برای حفظ بافت ریه و کاهش بیومارکرهای استرس اکسیداتیو موثر است (۱۵). نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که این دارو فعالیت آنتی هیپوکسی خوبی در مدل های مختلف دارد. این عمل شاید به عنوان مکانیسم

برخی اثرات گزارش شده، مطرح گردد.

با توجه به این که اسیدفولیک در زنان باردار استفاده می شود و هیپوکسی در دوره زایمان رخ می دهد، مطالعه ای به منظور بررسی نحوه تأثیر مکمل اسیدفولیک بارداری انجام شده است. نتایج نشان داد که اسیدفولیک از افزایش بیان کاسپاز-۳ جلوگیری می کند (۱۶). ایسکمی مغزی منجر به کاهش اکسیژن مغزی و در نتیجه سکته مغزی یا مرگ بافت مغزی می شود. کاهش غلظت اکسیژن سلول باعث کاهش ATP می شود. در چنین شرایطی سلول از تنفس بی هوازی برای تولید ATP و زنده ماندن استفاده می کند که باعث تجمع لاکتات، اسیدوز و مرگ سلول می شود. تأثیر خوب کوآنزیم Q و اسیدفولیک در هیپوکسی خفگی شاید بتواند به عنوان یک مکانیسم احتمالی در این موارد، مورد استناد قرار گیرد. بر این

اساس شاید بتوان این دو ترکیب را به عنوان داروی کمکی در هیپوکسمی پیشنهاد نمود. کوآنزیم Q و اسیدفولیک در برخی دوزها اثرات محافظتی معنی داری در افزایش زمان زنده ماندن موش های سوری نر از خود نشان دادند. کوآنزیم Q در مدل گردش خونی و خفگی در دوز ۲۵ mg/kg اثری مشابه کنترل مثبت از خود نشان داد. اسیدفولیک در مدل خونی و گردش خونی در دوز ۱۰ mg/kg اثری مشابه پروپرانولول داشت.

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد طرح ۷۰۴۱) تشکر می گردد.

References

1. Xie Y, Jiang S, Su D, Pi N, Ma C, Gao P. Composition analysis and anti-hypoxia activity of polysaccharide from *Brassica rapa* L. *Int J Biol Macromol* 2010; 47(4): 528-533.
2. Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr* 2001; 20(6): 591-598.
3. Overvad K, Diamant B, Holm L, Holmer G, Mortensen SA, Stender S. Coenzyme Q 10 in health and disease. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53(10): 764-770.
4. Furuta T, Kodama I, Kondo N, Toyama J, Yamada K. A protective effect of coenzyme Q10 on isolated rabbit ventricular muscle under hypoxic condition. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4(6): 1062-1067.
5. Deniz BF, Confortim HD, Deckmann I, Miguel PM, Bronauth L, de Oliveira BC, et al. Folic acid supplementation during pregnancy prevents cognitive impairments and BDNF imbalance in the hippocampus of the offspring after neonatal hypoxia-ischemia. *J Nutri Biochem* 2018; 60: 35-46.
6. Chalupsky K, Kračun D, Kanchev I, Bertram K, Görlach A. Folic acid promotes recycling of tetrahydrobiopterin and protects against hypoxia-induced pulmonary hypertension by recoupling endothelial nitric oxide synthase. *Antioxid Redox Signal* 2015; 23(14): 1076-1091.
7. Ma J, Zhen X, Huang X, Jiang X. Folic acid supplementation repressed hypoxia-induced inflammatory response via ROS and JAK2/STAT3 pathway in human promyelomonocytic cells. *Nutri Res* 2018; 53: 40-50.
8. Davis CK, Nampoothiri SS, Rajanikant GK. Folic acid exerts post-ischemic neuroprotection in vitro through HIF-1 α stabilization. *Mol Neurobiol* 2018; 55(11): 8328-8345.
9. Hosseinzadeh MH, Shamshirian A, Ebrahimzadeh MA. Dexamethasone Vs. COVID-19: An experimental study in line with the preliminary findings of a large trial. *Int J Clin Prac* 2020; 75(6): e13943.

10. Ebrahimzadeh MA, Khalili M, Jafari N, Zareh G, Farzin D, Amin G. Antihypoxic activities of *Crataegus pentaegyn* and *Crataegus microphylla* fruits-an in vivo assay. *Braz J Pharm Sci* 2018; 54(2): e17363.
11. Takeo SA, Tanonaka KO, Tazuma YO, Miyake K, Murai R. Possible mechanism by which coenzyme Q10 improves reoxygenation-induced recovery of cardiac contractile force after hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 243(3): 1131-1138.
12. Suzuki N, Nakamura T, Ishida H, Hosono K. Protective effect of coenzyme Q10 against hypoxic cellular damage. *Chem Pharm Bull* 1985; 33(7): 2896-2903.
13. Nasoohi S, Simani L, Khodagholi F, Nikseresht S, Faizi M, Naderi N. Coenzyme Q10 supplementation improves acute outcomes of stroke in rats pretreated with atorvastatin. *Nutri Neurosci* 2019; 22(4): 264-272.
14. Biuomy AR, Oraby FS, Khalifa EA, El-Sherif HA, Hussein J, Abdel-Latif Y. Hypoxia-induced oxidative stress in high altitude population: impact of coenzyme Q10 supplementation. *J Complem Integ Med* 2020; 18(3): 621-626.
15. D'Agrosa C, Cai CL, Siddiqui F, Deslouches K, Wadowski S, Aranda JV, et al. Comparison of coenzyme Q10 or fish oil for prevention of intermittent hypoxia-induced oxidative injury in neonatal rat lungs. *Respir Res* 2021; 22: 196.
16. Deniz BF, Confortim HD, Miguel PM, Bronauth L, Fernandes IR, Muotri AR, et al. High gestational folic acid supplementation prevents hypoxia-ischemia-induced caspase-3 augmenting without changing synapsin and H3 methylation levels in the rat hippocampus. *Int J Develop Neurosci* 2021; 81(6): 510-519.