

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Francielle Fernandes Spies

**ASSOCIAÇÃO ENTRE HIPOTERMIA TERAPÊUTICA E MEMANTINA COMO
ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA PARA O TRATAMENTO DA HIPÓXIA-
ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL**

Porto Alegre

2023

Francielle Fernandes Spies

**ASSOCIAÇÃO ENTRE HIPOTERMIA TERAPÊUTICA E MEMANTINA COMO
ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA PARA O TRATAMENTO DA HIPÓXIA-
ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Helena da Rosa Paz

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Fernandes Spies, Francielle
"ASSOCIAÇÃO ENTRE HIPOTERMIA TERAPÊUTICA E
MEMANTINA COMO ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA PARA O
TRATAMENTO DA HIPÓXIAISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL" /
Francielle Fernandes Spies. -- 2023.

65 f.

Orientador: Luciano Stürmer de Fraga.

Coorientadora: Ana Helena Paz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Hipóxia-isquemia . 2. Hipotermia Terapêutica. 3.
Memantina. I. Stürmer de Fraga, Luciano, orient. II.
Paz, Ana Helena, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho ao meu avô Lelo (*in memoriam*), a minha avó Maria, e aos meus pais Denise e Leandro. Eles foram responsáveis pela maior herança da minha vida: meus estudos! Amo vocês mais que tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Luciano S. de Fraga, por toda orientação e suporte, além de todo o aprendizado durante esses dois anos de mestrado, mesmo que por conta da pandemia só tenhamos nos conhecido pessoalmente após um ano. Agradeço imensamente ao Luciano por toda ajuda e confiança desde o início. Assim, como todos os conselhos, puxões de orelha, desabafos, paciência. Sou grata por todo o aprendizado. Mesmo sabendo que lidar com o “projeto da memantina” não tenha sido tão simples e fácil como imaginávamos! Obrigada por todo incentivo, paciência e amizade sempre.

Agradeço a minha coorientadora, Profa. Ana Helena da Rosa Paz, por aceitar essa parceria, e mesmo que não tenha executado o projeto de fato na UEA, obrigada por ter aberto as portas do HCPA.

Agradeço aos meus colegas/amigos do laboratório NeuroMet: Anna Clara Collucci, Isadora D'Ávila Tassinari, Janaína Zang e Ricardo Ribeiro Nunes, e à aluna de iniciação científica Isabela Chagas, por toda ajuda e acolhimento. Afinal, nenhum trabalho se faz sozinho. Anna, agradeço por sempre estar disposta a participar, e ajudar nos experimentos, mesmo entre pequenas divergências sou grata por ter sido muitas vezes minha dupla tanto no mestrado, quanto na vida fora do mestrado, tentando me fazer ser uma pessoa fitness (caminhadas pela Redenção). Isa, mesmo que em boa parte do meu mestrado não tenhamos convivido, agradeço por sempre ter me ajudado a distância (Inglaterra); tenho grande admiração pela pesquisadora que és. Bela, agradeço por todo o companheirismo durante esse curto período que tens acompanhado, tenho certeza de que vais longe. Jana, primeiramente, agradeço por ter divulgado o edital de seleção de mestrado no grupo no Whats'app da Biomedicina Univates, por ter me explicado toda a linha de pesquisa que estava vinculada, e claro, por ter me apresentado ao prof. Luciano. Muito obrigada por toda a ajuda de sempre, desde o princípio até às análises de dados. Ricardo, agradeço por ser esse colega incrível, por toda a paciência, por explicar inúmeras vezes minhas dúvidas, por toda ajuda nos experimentos desde o preparo de soluções até as homogeneizações das amostras, e por toda ajuda nas análises de dados.

Agradeço, em especial, ao prof. Dr. Carlos Alexandre Netto a quem devo a realização deste trabalho, pela disposição de todo o laboratório para a realização do

mesmo. Agradeço ao Rafael B. Fabres por ter me dado todo o apoio técnico e intelectual quando necessário, e também, por ter me apresentado ao Laboratório de Isquemia Cerebral e Neuroproteção, laboratório 35 do Departamento de Bioquímica, UFRGS. Agradeço a todos pelo companheirismo, e por toda a ajuda! Muito obrigada: Andrey, Diórlon, Djuly, Kiara, Luz Elena.

Um agradecimento especial vai para a minha família. Para minha mãe, Denise Fernandes, obrigada por ser um grande exemplo, mulher guerreira, que sempre lutou pela minha educação; sem dúvidas, se hoje estou concluindo um mestrado, devo isso a seus ensinamentos de sempre persistir no que eu quero. Agradeço ao meu pai, Leandro Spies, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e mudanças que realizei na vida (durante a faculdade morando em Lajeado, e agora durante o mestrado em Porto Alegre), além de sempre me incentivar a seguir meus sonhos também. Agradeço ao meu irmão caçula (único), Lucas, por sempre me ouvir sobre minha pesquisa (mesmo não sendo da área). Admiro muito o homem que estas se tornando. Agradeço a minha avó materna, Maria Fernandes, o grande exemplo de mulher forte, batalhadora. Sem dúvida seus áudios de bom dia e previsão do tempo deixam meu coração quentinho para levantar e seguir em frente todos os dias. Agradeço, ainda, ao meu falecido avô, Aurélio (Lelo), ao qual dedico esta Dissertação, que sempre me incentivou a ir em busca dos estudos, sempre se preocupou sobre morar longe da família, mas que eu tinha certeza de que sabia que era o melhor; infelizmente a Covid-19 o levou, durante o início do mestrado, deixando somente a saudade e amor. Agradeço a minha Dinda, Jaqueline, por ter escutado todas as minhas reclamações e meus desabafos, e por ter me dado todo o suporte quando precisei, além de ter me confiado a meu afilhado, Filipe, que sempre me alegrou durante estes anos. Agradeço, a minha Dinda e tio, Dalmira e Beto, por todo o apoio e amparo que tenham me dado ao longo desses anos, e também durante o mestrado entre idas e vindas a Porto Alegre. Agradeço a todo apoio das minhas primas, que sempre me acompanharam de fora nessa caminhada: Bruna Spies, Carolina Haeser, e Lauren Fernandes.

Agradeço as minhas amigas que moram comigo, Sámili e Silvana, sou imensamente grata por ter encontrado vocês, por termos caído de paraquedas no mesmo apartamento. Muito obrigada pela convivência, amizade, companheirismo e por serem minha rede de apoio em Porto Alegre. Obrigada por tudo, desde espantar

as abelhas (sou alérgica) que entram no meu quarto, até montar festinha de aniversário.

Agradeço às colegas/amigas que ingressaram comigo no mestrado: Cristiane e Mariana. Obrigada meninas pelo apoio de sempre durante todas as etapas do mestrado, principalmente durante o “cadeirão da fisiologia” e a “disciplina de didática”. O mestrado não teria sido tão leve sem o trio maravilha.

Agradeço aos meus melhores amigos: Alexandre Cera, Anderson Meira, Andressa S., Calebe, Carlos Henrique, Fernanda D., Fernanda Luisa, Heloísa, João Cadore, Luana R., Luíza H., Milena, Mônica F., Renan, Tairis, Wesley por entenderem a minha ausência, e me apoiarem, e sempre me escutarem quando eu precisei.

Agradeço a todos os professores do PPG Fisiologia, por todos os ensinamentos e oportunidades. Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e do ICBS. Agradeço ao pessoal do biotério, em especial à veterinária Fabíola.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Enfim, agradeço a todos que estiveram comigo nesse período de 2021 a 2023, foram dias de lutas, e mal posso esperar pelos dias de glória. Obrigada a todos, sem vocês nada disso seria possível!

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença.”

- Benjamin Franklin

RESUMO

A superestimulação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) causada pela excitotoxicidade glutamatérgica pode ativar vias de morte celular. Este é um dos eventos relevantes na hipóxia-isquemia (HI) neonatal, cujo tratamento padrão é a hipotermia terapêutica (HT). No entanto, a HT é recomendada para lesões cerebrais de grau moderado a grave e crianças que apresentam HI de grau leve não são tratadas devido ao risco de resultados adversos. Apesar disso, esses recém-nascidos com lesão leve podem apresentar significativos sinais de lesão cerebral em períodos mais tardios do seu desenvolvimento. Investigamos os potenciais efeitos neuroprotetores do tratamento com memantina (um antagonista NMDA não-competitivo) combinado com a HT em ratos neonatos machos e fêmeas submetidos à HI com a produção de lesão cerebral leve-moderada. Foram utilizados filhotes de 7 dias (P7) submetidos à oclusão da artéria carótida comum direita seguida de 90 min de hipóxia (8% O₂). Os animais do grupo SHAM foram submetidos a uma cirurgia fictícia. A memantina foi administrada (i.p., 20 mg/kg) imediatamente após a hipóxia. Após um período de recuperação, os filhotes foram expostos à HT (32°C por 5 h). Os filhotes foram pesados de P6 a P9 e submetidos aos testes comportamentais de geotaxia negativa e reflexo de endireitamento. Os animais foram eutanasiados em P9. Foi realizada a análise do volume de lesão encefálica pela coloração de cloreto de trifêniltetrazólio (TTC). O hipocampo ipsilateral à lesão foi coletado e a expressão de p-Akt, caspase-3 clivada e Bcl-XL foram avaliadas por *Western blotting*. Nos machos, o tratamento com hipotermia foi capaz de reverter a lesão causada pela HI. Já nas fêmeas, tanto o grupo HT quanto o grupo com os tratamentos combinados tiveram uma piora na lesão; entretanto, o grupo tratado apenas com memantina sugere uma neuroproteção, não mostrando diferença do grupo SHAM. Em análises moleculares, nas fêmeas, o tratamento combinado reduziu a expressão da caspase-3 clivada em 47% ($p < 0,05$, ANOVA) em relação aos animais do grupo HI. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na expressão de p-Akt e Bcl-XL, e as fêmeas de todos os grupos tiveram ganho de peso semelhante. Nos machos, não houve diferença significativa na expressão hipocampal de p-Akt, caspase-3 clivada, ou Bcl-XL. Estes resultados sugerem que a terapia combinada é capaz de regular negativamente a expressão de caspase-3 clivada, prevenindo a apoptose no hipocampo de fêmeas com lesão hipóxico-isquêmica leve. Assim, a combinação de memantina e HT pode ser uma terapia promissora para o tratamento da hipóxia-isquemia neonatal de grau leve, pelo menos em ratas. Contudo, mais pesquisas são necessárias para abordar se a memantina e a hipotermia combinada devem ser utilizadas como estratégia neuroprotetora para HI leve.

ABSTRACT

Overstimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors caused by glutamatergic excitotoxicity can activate cell death pathways. This is a relevant event in neonatal hypoxia-ischemia (HI), whose standard treatment is therapeutic hypothermia (HT). However, HT is recommended for the treatment of moderate to severe brain injury; children with mild HI brain lesion are not treated due to the risk of adverse outcomes. Despite this, these infants with mild lesion may show signs of more significant brain damage later in life. We investigated the potential neuroprotective effects of treatment with memantine (a non-competitive NMDA antagonist) combined with HT in male and female neonatal rats undergoing HI (mild-moderate brain lesion). Seven-day-old pups (P7) were submitted to occlusion of the right common carotid artery followed by 90 min of hypoxia (8% O₂). Animals from the SHAM group underwent fictitious surgery. Memantine was administered (i.p., 20 mg/kg) immediately after hypoxia. After a recovery period, pups were exposed to HT (32°C for 5 h). Pups were weighed from P6 to P9 and submitted to the behavioral tests of negative geotaxis and righting reflex; animals were euthanized at P9. The volume of brain lesion was evaluated in brain slices stained with triphenyltetrazolium chloride (TTC). The hippocampus ipsilateral to the lesion was collected and the expression of p-Akt, cleaved caspase-3 and Bcl-XL were evaluated by Western blotting. In males, treatment with hypothermia was able to reverse the injury caused by HI in the TH group. In females, both the HT group and the group with combined treatments had a worsening of the lesion; however, the group treated with memantine suggests neuroprotection, not showing any difference from the SHAM group. In molecular analyses, the combined treatment reduced the expression of cleaved caspase-3 by 47% ($p < 0.05$, ANOVA) in females, compared to animals of the HI group. However, no significant differences were observed in p-Akt and Bcl-XL expression, and females from all groups had similar weight gain. In males, there was no significant difference in hippocampal expression of p-Akt, cleaved caspase-3, or Bcl-XL. These results suggest that combined therapy is able to down-regulate cleaved caspase-3, preventing apoptosis in the hippocampus of females with mild HI brain injury. Thus, the combination of memantine and HT may be a promising therapy for the treatment of mild neonatal hypoxia-ischemia, at least in female rats. However, more research is needed to address whether memantine and combined hypothermia should be used as a neuroprotective strategy for mild HI.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Eventos iniciais da hipóxia-isquemia.....	15
Figura 2. Esquema representativo do modelo animal de HI neonatal	25
Figura 3. Esquema representativo do procedimento de HT	27
Figura 4. Desenho experimental.....	29
Figura 5. Representação do teste comportamental de geotaxia negativa	31
Figura 6. Representação do teste do reflexo de endireitamento	32
Figura 7. Imagem representativa das fatias coradas com TTC	33
Figura 8. Temperatura corporal dos animais em P7.....	37
Figura 9. Peso corporal dos animais	38
Figura 10. Latência para girar 180° no teste de geotaxia negativa	39
Figura 11. Latência teste de reflexo de endireitamento.....	41
Figura 12. Análise do volume de lesão encefálica	43
Figura 13. Análise da expressão da p-Akt.....	44
Figura 14. Análise da expressão da caspase-3 clivada	45
Figura 15. Análise da expressão da Bcl-XL.....	46
Tabela 1. Períodos da morte dos animais dos grupos experimentais em machos e fêmeas.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: ácido alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazole propiônico

ATP: trifosfato de adenosina

AUC: área sob a curva

Bad: proteína de morte associada ao Bcl-2

Bcl-XL: membro da família de proteínas Bcl-2; atua como uma proteína anti-apoptótica

Ca²⁺: íon cálcio

HI: hipóxia-isquemia

HT: hipotermia terapêutica

K⁺: íon potássio

Na⁺: íon sódio

NMDA: N-metil-D-Aspartato

PBS: tampão fosfato-salino

SNC: sistema nervoso central

KA: cainato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	21
3 HIPÓTESE	21
4 OBJETIVOS	22
4.1 Objetivos gerais	22
4.1.1 Objetivos específicos	22
5 MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1 Animais	22
5.2 Aspectos Éticos	23
5.3 Hipóxia-isquemia neonatal	23
5.4 Administração de Memantina	25
5.5 Hipotermia Terapêutica	26
5.6 Desenho Experimental	27
5.7 Pesagem dos Animais	30
5.8 Testes Comportamentais	30
5.8.1 Geotaxia Negativa (P6 e P8)	30
5.8.2 Reflexo de Endireitamento (P6 e P8)	31
5.9 Volume de lesão encefálica	32
5.10 Western blotting	33
5.11 Análise Estatística	34
6 RESULTADOS	36
6.1 Mortalidade	36
6.2 Controle da Temperatura Corporal	36
6.3 Peso corporal	37
6.4 Geotaxia negativa	38
6.5 Reflexo de endireitamento	40
6.6 Volume de lesão	42
6.7 Western Blotting	44
7 DISCUSSÃO	47
8 CONCLUSÕES	57
9 PERSPECTIVAS	58
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante presente no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (FONNUM, 1984), sendo responsável por um terço de todas as sinapses excitatórias rápidas no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo (COTMAN et al., 1987; DOBLE, 1999). É essencial para a função cerebral, orquestrando não apenas a neurotransmissão excitatória rápida, mas também as mudanças neuronais de longa duração necessárias para a formação da memória, a aprendizagem e a cognição (WATKINS e EVANS, 1981). Também é fundamental durante o neurodesenvolvimento, devido ao seu papel na regulação da formação e eliminação de sinapses, bem como na migração, proliferação e viabilidade neuronal (PREGNOLATO et al., 2019). A estimulação de um neurônio glutamatérgico resulta na liberação de glutamato nos terminais nervosos (FONNUM, 1984). O glutamato extracelular pode se ligar a receptores pós-sinápticos, do tipo ionotrópico: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -3-amino-hidroxi-5-metil-4-isoxazol de ácido propiônico (AMPA) e receptores cainato (KA) (MONANGHAN, BRIDGE e COTMAN, 1989). Os receptores NMDA e AMPA/KA são canais iônicos controlados por glutamato (conduzindo correntes de Na^+ ou de Na^+ e Ca^{2+}). Ademais, o glutamato também pode se ligar a receptores do tipo metabotrópico (mGluR), que consistem em receptores acoplados à proteína G (DANBOLT, 2001). Em condições fisiológicas normais, a despolarização desencadeia a liberação de glutamato dos terminais nervosos glutamatérgicos, o que permite que esse neurotransmissor atue nos receptores pós-sinápticos (NICHOLLS e ATTWELL, 1990). Essa ligação do glutamato aos seus receptores pode causar um influxo de Na^+ e de Ca^{2+} , induzindo cascatas de sinalização intracelular que levam a respostas celulares, como a regulação de fatores de transcrição e replicação do DNA (DOBLE, 1999; DANBOLT, 2001).

Os receptores NMDA constituem canais catiônicos controlados pelo glutamato e medeiam a transdução de sinal em sinapses centrais (MONYER et al., 1994). As propriedades biofísicas dos canais do receptor NMDA incluem alta permeabilidade ao Ca^{2+} e um bloqueio provocado pelo Mg^{2+} , dependente de voltagem (COTMAN et al., 1987; MONYER et al., 1994). Além disso, para a abertura dos canais, concomitante com a despolarização, o receptor NMDA requer a ligação dos agonistas (glicina, ou D-serina, juntamente com a ligação do glutamato) para que,

assim, seja possível remover o Mg^{2+} que bloqueia o poro do canal (MAYER et al., 1984). Estas características tornam o NMDA único e alvo de diversos estudos, por possuir papel crucial na função sináptica, neuroplasticidade e neurotoxicidade patológica (WANG e REDDY, 2017). Os receptores NMDA são complexos tetraméricos que diferem na composição de suas subunidades, dependendo da localização no encéfalo, do tipo celular, da localização subcelular e do estágio do neurodesenvolvimento (MONYER et al., 1994).

A liberação excessiva de glutamato e a superativação dos receptores glutamatérgicos contribuem para a ativação de processos de morte neuronal (GWAG, 1995). Essa chamada “excitotoxicidade glutamatérgica” ocorre em algumas condições patológicas (CHOI et al., 1987). Dessa forma, o receptor NMDA tem sido implicado como um mediador da lesão neuronal associada a muitos distúrbios neurológicos incluindo a doença de Alzheimer (DA), epilepsia, traumatismo cerebral e isquemia cerebral (OLIVARES et al., 2012). Estas elevações dos níveis de glutamato em condições anormais alteram o potencial de repouso da membrana, ocasionando a remoção do Mg^{2+} que bloqueia o canal e, conseqüentemente, ativando o receptor. Isso resulta em um influxo maciço agudo de água, Na^+ e Cl^- , levando à formação de edema neuronal e, eventualmente, necrose. Além disso, a superativação do receptor NMDA provoca níveis anormalmente altos de Ca^{2+} intracelular, cujas conseqüências são a ativação de enzimas catalíticas, geração de radicais livres tóxicos e interrupção da produção de energia celular. Essas vias relacionadas ao Ca^{2+} levam a uma apoptose tardia (CHOI et al., 1987; BINVIGNAT e OLLOQUEQUI, 2020). Esse é um dos mecanismos que contribui para a lesão hipóxica-isquêmica em neonatos, por exemplo (LIU et al., 2009).

O dano cerebral hipóxico-isquêmico é um processo progressivo que resulta na morte celular por ativação de diferentes mecanismos (DAVIDSON et al., 2015). A hipóxia-isquemia (HI) neonatal é iniciada pela interrupção do fornecimento de sangue oxigenado ao cérebro (isquemia) e pela privação de oxigênio (hipóxia), o que leva a mudanças no metabolismo, que passa a ser anaeróbio, resultando na redução da concentração de ATP intracelular (Figura 1) (NARAYANAMURTHY et al., 2021). A HI não é um evento único, mas sim um processo contínuo que causa a morte de neurônios horas a dias após a lesão inicial (GUNN e THORESEN, 2006). É

possível reconhecer três fases distintas durante esse processo: morte neuronal primária, fase latente e morte neuronal tardia (DAVIDSON et al., 2015).

- 1) Fase primária: a **morte neuronal primária** é observada nos primeiros minutos após o evento hipóxico-isquêmico, sendo determinada pela falha energética durante a HI, resultando em falhas no metabolismo oxidativo, edema citotóxico e excitotoxicidade glutamatérgica (WASSINK et al., 2014).
- 2) Fase secundária ou fase **latente**: dura cerca de 6h; a falha energética permanece durante essa fase, levando ao estresse oxidativo, inflamação e, finalmente, à morte celular (FLEISS e GRESSENS, 2012). No entanto, alguns neurônios podem se recuperar parcialmente na fase latente, devido à função mitocondrial transitória e à restauração do fluxo sanguíneo cerebral. Isso proporciona uma janela de oportunidade para intervenções clínicas para amortecer o impacto da subsequente lesão (NARAYANAMURTHY et al., 2021). Ainda, entre 6h e 15h após o insulto, ocorre a falha energética secundária (**morte neuronal tardia**) que está associada à encefalopatia e aumento da atividade convulsiva (FLEISS e GRESSENS, 2012; GRECO et al., 2020).
- 3) Fase terciária: essa fase de danos terciários pode persistir durante vários meses ou anos após a HI e envolve inflamação, redução na plasticidade neural e sinaptogênese, danos aos oligodendrócitos e alterações epigenéticas (FLEISS e GRESSENS, 2012).

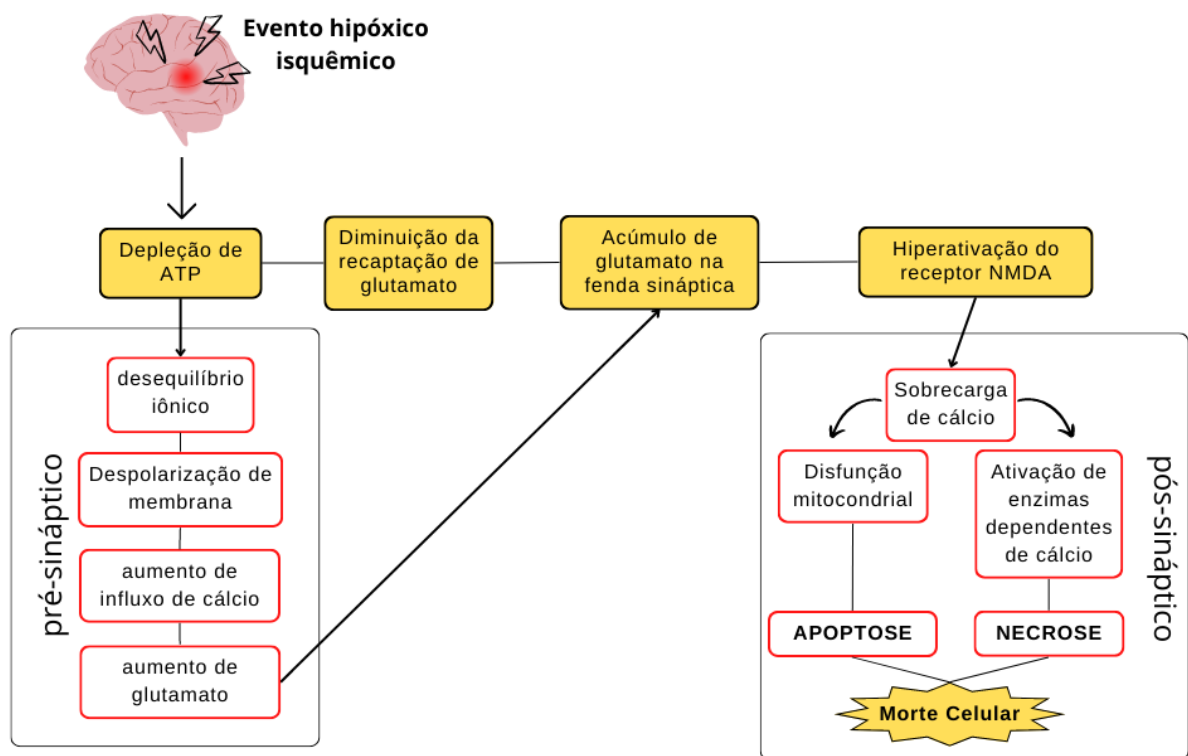


Figura 1. Eventos iniciais da hipóxia-isquemia. A despolarização da membrana neuronal mediada pelo desequilíbrio iônico após a isquemia cerebral pode ativar as sinapses glutamatérgicas, causando liberação excessiva de glutamato e neurotoxicidade, o que desorganiza a estrutura fisiológica normal das sinapses, resultando em seu colapso funcional. Isso também é considerado o evento inicial que leva à ativação de vias de morte celular. Posteriormente, o receptor NMDA medeia os processos de sobrecarga de cálcio intracelular, dano mitocondrial, estresse oxidativo e respostas inflamatórias, acelerando a lesão cerebral e a necrose neuronal (Adaptado de WANG et al., 2022).

Um plano de ação foi elaborado pelas Nações Unidas, no qual constam objetivos de desenvolvimento sustentável mantidos pela Divisão de Estatísticas das Nações Unidas (UNSD), uma divisão do Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais (DESA). Um dos objetivos do plano é garantir vidas saudáveis e promover o bem-estar para todos em todas as idades (<https://sustainabledevelopment.un.org/sdg3>). Dentro desse objetivo há metas e indicadores que propõem a redução da mortalidade neonatal para 12/1.000 e a mortalidade de menores de cinco anos para 25/1.000 nascidos vivos até 2030 (NAIR e KUMAR, 2018). Em termos de comparação, só a incidência de HI é de aproximadamente 1,5 caso por 1.000 nascidos vivos em países desenvolvidos. Em países de baixa e média renda, a incidência é muito maior e pode chegar a valores em torno de 10 a 20 por 1.000 nascidos vivos (GRECO et al., 2020). A HI neonatal é uma importante causa de danos permanentes ao SNC que podem resultar em morte neonatal ou se manifestar mais tarde como retardo mental, epilepsia, paralisia

cerebral ou atraso no desenvolvimento (DUMBUYA et al., 2021). Além de causar deficiências cognitivas e intelectuais nos indivíduos, a HI compromete, em diferentes graus, a atividade motora (GRECO et al., 2020) e produz uma carga clínica significativa devido às suas altas taxas de mortalidade e morbidade em todo o mundo (NAIR e KUMAR, 2018).

Para a busca de novas estratégias de tratamento ou prevenção, assim como para uma melhor compreensão dos mecanismos de lesão associados à HI, há a necessidade do uso de modelos experimentais animais em pesquisas pré-clínicas. O modelo de Levine, adaptado por Rice e colaboradores é uma ferramenta útil para o estudo da HI experimental em modelos animais, podendo reproduzir a lesão encefálica humana (RICE, VANUCCI e BRIERLEY, 1981). Uma das estruturas cerebrais mais vulneráveis à lesão induzida por esse modelo em animais neonatos é o hipocampo (VANUCCI et al., 1999). Estudos recentes utilizando esse modelo também têm demonstrado a existência de diferenças entre animais machos e fêmeas no grau de severidade da lesão após a indução de HI (TASSINARI et al., 2020; FABRES et al., 2022; ZANG et al., 2022), mas essas respostas relacionadas ao sexo têm sido pouco estudadas (NETTO et al., 2017).

A compreensão da fisiopatologia da HI neonatal é essencial para a concepção de novas intervenções eficazes no feto e no recém-nascido que sofreram um evento hipóxico isquêmico encefálico (VANUCCI et al., 2004). A avaliação clínica é oportuna para facilitar a intervenção no período latente da HI, sendo necessário um exame neurológico detalhado para determinar a gravidade da lesão hipóxico-isquêmica, geralmente classificada como leve, moderada ou grave (NAIR e KUMAR, 2018). A única terapia bem estabelecida atualmente para o tratamento da HI neonatal em humanos nascidos a termo é a hipotermia terapêutica (HT) (SABIR et al., 2012). A HT consiste no resfriamento de todo o corpo a uma temperatura central em torno de 33,5°C por 72 horas em humanos, começando nas primeiras 6 horas após o evento hipóxico-isquêmico (SHANKARAN et al., 2005). Estudos pré-clínicos indicam que a HT pode fornecer neuroproteção após a HI moderada em ratos neonatos, mas essa neuroproteção diminui linearmente com o aumento do atraso para iniciar a HT (SABIR et al., 2012). As diretrizes clínicas recomendam que a HT seja iniciada nas primeiras 6 horas após o nascimento com base nos achados em experimentos com modelo fetal de ovelhas (equivalente a humanos nascidos a

termo), mostrando neuroproteção significativa quando a HT é iniciada antes de 5,5 horas após a lesão cerebral (GUNN et al., 1997; 2017).

A HT geralmente é indicada para o tratamento da HI moderada ou grave, necessitando ser iniciada antes que ocorra uma falha energética secundária (NAIR e KUMAR, 2018). Estudos *in vivo* sistemáticos sustentam a importância de iniciar o tratamento na fase latente da HI (GUNN et al., 2017). Em ovinos fetais próximos ao termo, a HT induzida 90 minutos após a reperfusão (isto é, na fase latente), e continuada até 72 horas após a HI, foi capaz de prevenir o edema citotóxico secundário e melhorou a recuperação eletroencefalográfica (GUNN et al., 1997; 2017). Contudo, mesmo nessas condições "ótimas", a HT é apenas parcialmente eficaz (não mais de 50% dos recém-nascidos tratados atingem um resultado melhor) (GRECO et al., 2020). Os mecanismos precisos da neuroproteção conferida pela HT ainda não estão claros. Em termos gerais, o resfriamento suprime muitas das vias que levam à morte celular (GUNN et al., 2017). Estudos pré-clínicos e clínicos confirmam que os protocolos atuais para HT são quase ideais (CHO et al., 2020). Porém, o desafio agora é identificar terapias complementares que possam melhorar ainda mais os desfechos em combinação com HT (CHO et al., 2020). No entanto, o encéfalo de ratos em P7 se aproxima mais de um recém-nascido prematuro com idade gestacional de 32 a 36 semanas, potencialmente tornando-o menos relevante para o recém-nascido a termo, para o qual a HT é utilizada (PATEL et al., 2014). Patel e colaboradores (2015) adaptaram o modelo imaturo de HI em ratos, descreveram um modelo pré-clínico reproduzível de HI e tratamento com HT utilizando animais em P10, sendo mais próximo a um bebê nascido a termo com 36 a 40 semanas (idade gestacional). Com este modelo, demonstraram que a HT reduz a neurodegeneração e melhora o resultado após a HI (PATEL et al., 2015).

A HI neonatal representa uma causa importante de incapacidade a longo prazo e precisa urgentemente de mais pesquisas destinadas a reaproveitar drogas existentes, bem como o desenvolvimento de novas terapêuticas (LANDUCCI et al., 2022). Isso torna-se ainda mais importante para os casos de HI leve, que não possuem tratamento adequado nem dados pré-clínicos muito extensos. No estudo de Ehltting e colaboradores, por exemplo, foi demonstrado que em animais com HI de grau leve a moderado houve uma perda progressiva de tecido cerebral e alterações patológicas nos exames de ressonância magnética, além de um

comprometimento da função motora de longo prazo (EHLTING et al., 2022). Também não está claro se a HT é benéfica para bebês afetados por HI leve (KARIHOLU et al., 2018). Sabir e colaboradores (2021) levantaram recentemente algumas questões importantes e ainda não respondidas sobre a utilização de HT para o tratamento da HI neonatal. Muitas dessas questões não puderam ser abordadas pelos ensaios clínicos randomizados. Por exemplo, como recém-nascidos prematuros tardios com HI devem ser resfriados? O resfriamento é benéfico para HI leve? (SABIR et al., 2021). Em outro estudo, foi observado que a HT sozinha é capaz de atrasar o aparecimento de indicadores do neurodesenvolvimento (MATSUDA et al., 2021). É, portanto, essencial compreender melhor os mecanismos subjacentes à HT no contexto de HI leve-moderada, a fim de desenvolver tratamentos alternativos, seja como terapia única, ou como adjuvantes em combinação com a HT (EHLTING et al., 2022).

Estudos moleculares vêm sugerindo que a memantina, um bloqueador não-competitivo do receptor NMDA com efeito de curta duração, pode ser um potente neuroprotetor, sem efeitos adversos secundários (LANDUCCI et al., 2018; CHEN et al., 1992; 1998). Possuindo um efeito de curta duração, a memantina reduz a excitotoxicidade glutamatérgica, mas evita que o bloqueio do receptor NMDA seja muito prolongado, o que poderia interferir na transmissão sináptica normal (LIU et al., 2009) e afetar negativamente o neurodesenvolvimento. A memantina é um antagonista não-competitivo, pois não compete pelo mesmo sítio de ligação do glutamato no receptor NMDA. O sítio de ligação só pode ser acessado quando o Mg^{2+} é deslocado para fora do canal, liberando o poro (FEDELE et al., 2018). Outro antagonista conhecido do receptor NMDA é o MK-801, considerado como um agente neuroprotetor em modelos animais de acidente vascular cerebral, trauma e parkinsonismo (SONG et al. 2018). Porém, o MK-801 apresenta efeitos colaterais resultado de uma alta afinidade e tempo de ligação ao receptor muito longo, o que impede sua aplicação na clínica para o tratamento da HI neonatal (SONG et al., 2018; LIU et al., 2009). De acordo com Chen e Lipton (2006), uma droga neuroprotetora, clinicamente tolerada, consistiria em um bloqueador de canal de baixa afinidade com uma taxa de desligamento relativamente rápida, não prejudicando, assim, a função sináptica normal. Se, no entanto, um bloqueador se liga com uma afinidade muito alta e uma taxa de desligamento lenta, consequentemente interferiria na função neurológica normal. Esse é o caso do MK-

801, um bloqueador muito bom da excitotoxicidade, mas com tempo de permanência no canal iônico tão longo que acaba por bloquear progressivamente as funções normais críticas (CHEN e LIPTON, 2006; CHEN et al., 1998). Por outro lado, a memantina, que se liga mais fracamente ao canal iônico, tem um uso clínico bem tolerado (LANDUCCI et al., 2018; 2022).

Em outros estudos recentes, a memantina foi relatada como um agente neuroprotetor em modelos de hipóxia-isquemia, acidente vascular cerebral e trauma. Nestes estudos, a memantina teve impacto positivo quando administrada imediatamente após a lesão cerebral traumática (POLAT et al. 2020; LANDUCCI et al. 2018; OLIVARES et al. 2012). Como um agente neuroprotetor, a memantina pode levar a uma redução das sequelas morfológicas induzidas por isquemia (CHEN et al., 1998; LIU et al., 2009). Os pesquisadores sugeriram que o bloqueio do receptor NMDA por memantina pode fornecer uma prevenção farmacológica eficaz da leucomalácia periventricular (LPV) em bebês prematuros (MANNING et al. 2009). Em outro estudo, foi sugerido que o tratamento com a memantina protege contra a repressão induzida por TNF- α da proliferação de células hipocâmpais em camundongos pós-natais, atenuando parcialmente a inflamação (WANG et al., 2018). Embora os estudos mostrem dados positivos quanto ao uso da memantina (LIU et al., 2009; MANNING et al. 2009; LANDUCCI et al. 2018), ainda são necessárias buscas por terapias combinadas (LIU et al., 2009; LANDUCCI et al., 2018), por exemplo, com a HT.

A morte celular programada (apoptose) é caracterizada como um conjunto distinto de alterações morfológicas e bioquímicas. Estas alterações, são compostas por um sistema proteolítico que envolve uma família de proteases chamadas “caspases”. Essas enzimas participam de uma cascata que é desencadeada em resposta a sinais pró-apoptóticos que culminam na clivagem de um conjunto de proteínas, resultando na morte celular (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998). Foi relatado que a via de sinalização da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K/Akt) está envolvida na HI (ZHANG et al., 2018). A via de sinalização PI3K/Akt regula uma gama de atividades celulares, incluindo a sobrevivência celular, proliferação e metabolismo (LI et al., 2008). A PI3K pertence a uma família lipídica cinase, dividida em duas classes, I e II. A classe I, tem como função fosforilar o PIP-2 para gerar um segundo mensageiro, o PIP-3. O PIP-3 pode mediar diferentes funções da PI3K

através de interações específicas com o domínio de PH (*pleckstrin homology domain*), presente em proteínas como a Akt. A Akt é considerada o mediador central da via de sinalização PI3K/Akt, que finalmente leva à fosforilação de alguns alvos anti-apoptóticos (ZHANG et al., 2018). Além disso, a proteína Akt é uma importante mediadora da sobrevivência celular (BRYANT et al., 2008) e, quando ativada, estimula substratos envolvidos na sobrevivência celular e inibe as vias de apoptose (CARDONE et al., 1998; NAIR e KUMAR, 2018). Nas lesões hipóxico-isquêmicas, a apoptose está presente tanto na fase hipóxica inicial, como no período de reperfusão, porém sendo ativada por diferentes vias em cada um dos casos (WU et al., 2018).

Durante a hipóxia, a via intrínseca da apoptose desempenha um papel mais importante, induzido pelo dano mitocondrial, o que leva à ativação da caspase-9, ocasionando a clivagem da caspase-3 e a ativação da via de execução. Já, no estágio de reperfusão, os mediadores inflamatórios são responsáveis pela ativação da via extrínseca da apoptose, ativando a caspase-8, ocasionando a clivagem da caspase-3 e, assim, ativando a via de execução, que inclui a degradação do DNA, reorganização do citoesqueleto, e por fim, a formação dos corpos apoptóticos (NEAG et al., 2022). As interações entre todas as proteínas da via PI3K/Akt, levam a danos mitocondriais, que seriam determinados pela formação de “poros” como consequência da homodimerização dos aceleradores da apoptose de vários domínios Bax (KALE et al., 2018), levando à liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo C (BAS et al., 2021). A liberação do citocromo C desencadeia a formação do apoptossomo, o complexo responsável pela ativação das caspases. As caspases são proteases de cisteína que, em condições normais, estão presentes em um estado inativo pró-caspase e são ativadas por clivagem proteolítica (KALE et al., 2018). A família de proteínas do linfoma de células B (Bcl-2) é conhecida pela sua função na regulação da apoptose, impedindo a formação de poros na membrana mitocondrial externa e a subsequente ativação de caspases. Já a Bcl-xL, um homólogo próximo de Bcl-2, desempenha um papel importante no desenvolvimento neuronal e pode contribuir para alterações morfológicas, como o brotamento e retração de ramos axônicos, no contexto da plasticidade do SNC (BAS et al., 2021).

Muitos estudos com foco na alta expressão de proteínas pró-apoptóticas, como caspase-3, Bax e Bcl, elucidaram que a apoptose é a forma mais prevalente

de morte celular na lesão do encéfalo imaturo, em comparação com modelos adultos (GRECO et al., 2020). Fabres e colaboradores (2020) observaram que os animais tratados com progesterona mostraram um aumento na expressão de p-Akt em relação aos grupos somente submetidos à HI neonatal, assim como demonstraram uma redução na expressão da caspase-3 clivada nos grupos que receberam administração de progesterona (FABRES et al., 2020).

Outros trabalhos, observaram que a morte celular após a HI ocorre com maior frequência por necrose em animais machos e por apoptose nas fêmeas (ZHU et al., 2006). Dessa forma, avaliar a ativação das vias de morte e sobrevivência celular parece ser crucial para uma abordagem adequada para o tratamento da HI neonatal em cada um dos sexos.

2 JUSTIFICATIVA

Não há evidências de estudos que avaliaram a combinação entre HT e memantina sobre os desfechos funcionais (comportamentais) ou sobre as vias de morte e sobrevivência celular após a HI neonatal. Uma vez que a hipotermia terapêutica tornou-se um padrão de terapia para a HI, o teste pré-clínico translacional desse agente terapêutico deve ocorrer também em comparação, bem como em combinação, com a hipotermia terapêutica. Dessa forma, avaliar essa combinação terapêutica e a compreensão dos mecanismos subjacentes poderá permitir o planejamento de intervenções clínicas mais eficazes e mais adequadas para cada um dos sexos em recém-nascidos que sofreram um evento hipóxico-isquêmico encefálico, justificando a execução do presente estudo.

3 HIPÓTESE

A associação da terapia de HT com o tratamento farmacológico com memantina causará uma redução na ativação das vias de morte celular, diminuindo a lesão encefálica e melhorando os desfechos comportamentais em animais previamente submetidos à HI encefálica neonatal. A associação potencializará os efeitos isolados de cada tratamento e os efeitos neuroprotetores serão mais evidentes em animais do sexo feminino.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito neuroprotetor da combinação da HT com a memantina em ratos submetidos ao modelo de HI cerebral neonatal e avaliar esse efeito em animais machos e fêmeas.

4.1.1 Objetivos específicos

- Mensurar o volume de lesão encefálica dos animais após a HI e o tratamento combinado de HT e memantina;
- Avaliar a expressão de proteínas envolvidas nas vias de morte celular após a HI e o tratamento combinado de HT e memantina;
- Avaliar o desempenho dos animais em testes comportamentais antes e após a HI e o tratamento combinado de HT e memantina;
- Analisar o impacto do dimorfismo sexual sobre os parâmetros avaliados.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 168 ratos Wistar neonatos de ambos os sexos (84 machos e 84 fêmeas) com 7 dias de idade (P7) e 14 ratas mães. Os animais foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Os animais foram transportados com 2 dias de vida (P2) para o Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS, onde foram mantidos por 5 dias para aclimação em caixas de polipropileno de 390 X 320 X 170 mm com assoalho recoberto com maravalha, e juntamente com suas respectivas mães. As ninhadas foram padronizadas após o nascimento, sendo compostas por 12 ratos neonatos (6 machos e 6 fêmeas) mantidos com as ratas-mães. Todos os animais foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12h em salas climatizadas ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) e as ratas-mães receberam alimentação e água *ad libitum* durante todas as etapas do projeto.

5.2 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a resolução normativa nº 30, de 02 de fevereiro de 2016, resolução normativa nº 33 de 18 de novembro de 2016, resolução normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018 e resolução normativa nº 52, de 19 de maio de 2021, do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais, constantes do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, 2011)* do *National Research Council of the National Academies* (National Research Council (US) Committee (For The Update Of The Guide For The Care And Use Of Laboratory, 2011). Este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS (número 31442).

Todas as fêmeas adultas (14 ratas-mães não utilizadas nos experimentos) foram eutanasiadas após os experimentos deste projeto pelo método da sobredose anestésica com isoflurano, de acordo com a resolução normativa nº 37 do CONCEA. Para isso, foram colocadas em uma câmara e foi administrado isoflurano na concentração de 5%. Após a observação de parada respiratória, a exposição ao isoflurano continuou por mais dez minutos. Durante os procedimentos experimentais com os animais filhotes, para limitar qualquer sofrimento que não tenha sido previsto, foram utilizados pontos finais humanitários (“end-points”) de acordo com a resolução normativa nº 25 do CONCEA de 2015. Foram analisados os seguintes parâmetros: baixo peso, extremidades azuladas e cianose, e má condição geral do animal. Em caso de necessidade, os animais em más condições foram eutanasiados por sobredose anestésica com isoflurano, conforme já descrito para as ratas-mães.

5.3 Hipóxia-isquemia neonatal

Foi utilizado o modelo experimental baseado na preparação de Levine (1960) modificado por Rice-Vannucci (1981) para ratos neonatos. O procedimento já está bem estabelecido e padronizado pelo grupo de pesquisa que já desenvolveu estudos prévios na Unidade de Experimental Animal (UEA) do HCPA utilizando o mesmo modelo (FABRES et al., 2018; TASSINARI et al., 2020; ZANG et al., 2022),

assim como também no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica (FABRES et al., 2020; 2022).

Aos 7 dias de vida (P7), os animais foram distribuídos entre cada grupo experimental utilizando sorteio aleatório. Os animais foram anestesiados com isoflurano 5% e submetidos ao procedimento cirúrgico de oclusão da artéria carótida comum direita, com duração máxima de 5 minutos por animal. Sobre um colchão térmico veterinário (50 x 50 cm) aquecido, os animais foram anestesiados e posicionados em decúbito dorsal. O procedimento foi iniciado por meio de uma incisão longitudinal na superfície ventral do pescoço, sendo então a artéria carótida comum direita identificada e isolada do nervo vago e das estruturas adjacentes com o auxílio de duas pinças de precisão. A carótida comum direita foi ocluída permanentemente, através de um nó com fio cirúrgico de seda 4.0 (isquemia). Os animais do grupo SHAM (controle) foram anestesiados para posterior realização da incisão e exposição da carótida, porém, não foram submetidos à oclusão da artéria. Ao final desse procedimento, os filhotes foram colocados sobre uma placa aquecida durante um período de recuperação de 15 minutos antes de serem devolvidos às caixas-moradia, onde permaneceram por um intervalo de 90 a 120 minutos junto às mães para amamentação e recuperação.

Decorrido o tempo de recuperação, os ratos neonatos foram novamente retirados de suas caixas-moradia, colocados em uma câmara, e expostos a uma atmosfera hipóxica (utilizando uma mistura gasosa certificada de 8% de O₂ e 92% de N₂) por 90 minutos. Para isso, foram utilizados dois frascos Kitasato de 1.500 ml de volume, vedados com rolha; o fluxo de gás infundido para a câmara de hipóxia (frascos) foi de 5L/min. Foram alocados 5 animais em cada frasco. Os frascos permaneciam parcialmente submersos em banho-maria a 33°C a fim de manter a temperatura corporal dos ratos neonatos em torno de 37°C. Os animais do grupo SHAM não passaram pelo procedimento de hipóxia, sendo colocados durante os 90 minutos sobre uma placa aquecedora (Insight EEF 421) mantida a 33°C em condições de normóxia. Para fins de confirmação, a temperatura corporal dos ratos foi medida individualmente com termômetro infravermelho (Incoterm® TCI1000) logo após a hipóxia.

5.4 Administração de Memantina

Com base em trabalhos que mostraram a farmacocinética da memantina em ratos neonatos, demonstrando atividade de neuroproteção em estudos de dose-resposta, foi escolhida a administração de uma dose única de memantina de 20 mg/kg logo após a HI (ver Figura 2) (CHEN et al., 1998; LIU et al., 2009; LANDUCCI et al., 2018). Essa dose escolhida foi baseada em estudos nos quais os autores utilizaram a via de administração intraperitoneal (LIU et al., 2009; LANDUCCI et al., 2018). A memantina foi diluída em tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4) e os animais dos grupos não-tratados com memantina (SHAM, HI e HT) receberam injeções de veículo (PBS) no volume equivalente ao volume de memantina dos demais grupos. Esse padrão de administração mostrou-se efetivo em modelo de HI em ratos neonatos, exibindo seu grau máximo de neuroproteção (LANDUCCI et al., 2018).

Além disso, o tratamento com memantina demonstrou ser eficaz quando iniciado após a lesão da substância branca em camundongos machos de 6 dias (MANNING et al., 2008). Entretanto, há ausência de dados na literatura para a combinação entre HT e memantina em neonatos.

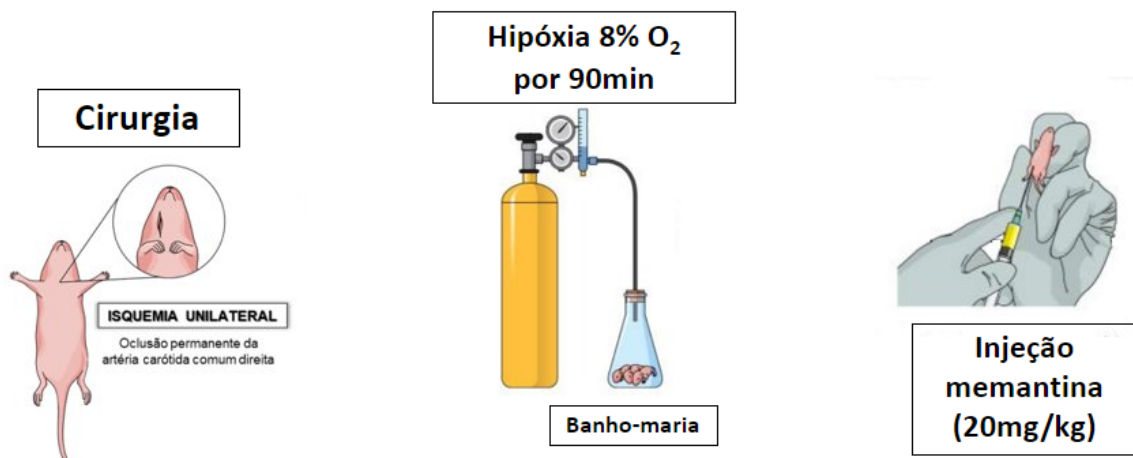


Figura 2. Esquema representativo do modelo animal de HI neonatal de Rice e Vannucci (Rice et al., 1981). O modelo consiste na oclusão permanente da carótida comum direita causando uma isquemia cerebral unilateral no encéfalo do animal. Os animais passam por um período de recuperação de cerca de 2h juntamente com as ratas-mães e, em seguida, são alocados em uma câmara com atmosfera hipóxica (8% de O₂) por 90 minutos. Logo após, é realizada a injeção de dose única de memantina (20 mg/kg) (Figura adaptada de TASSINARI et al., 2020).

5.5 Hipotermia Terapêutica

Para realização da hipotermia terapêutica, os animais foram colocados em uma cuba de acrílico contendo 10 divisórias (um animal por divisória), evitando, assim, que os animais se agrupassem, o que poderia elevar a temperatura corporal. O fundo da caixa foi forrado com maravalha proveniente da caixa moradia do animal. A cuba foi colocada dentro de um banho-maria com temperatura da água controlada (18-20°C; para manter essa baixa temperatura era adicionado gelo na água do banho, ao redor da cuba onde eram mantidos os animais) (Figura 3). Com esse procedimento, os animais neonatos atingiam uma temperatura corporal de aproximadamente 32°C (temperatura indicada para hipotermia terapêutica em animais recém-nascidos) (WOOD et al., 2016; FABRES et al., 2022) em cerca de 20 minutos. Para o controle dessa queda de temperatura, a temperatura corporal de cada animal foi aferida de 5 em 5 minutos até os primeiros 20 minutos de hipotermia.

A HT foi realizada durante um período de 5 horas ininterruptas. Para manter o controle da temperatura corporal dos filhotes, foi aferida a temperatura na cabeça dos animais a cada 20 minutos com o auxílio de um termômetro infravermelho (Incoterm® TC11000), procedimento já realizado em outro trabalho do grupo (ZANG et al., 2022). Os animais dos grupos não submetidos à hipotermia permaneceram em normotermia (temperatura corporal de aproximadamente 37°C) durante este mesmo período de 5 horas sobre uma placa aquecedora (Insight EEF 421). Após as 5 horas ininterruptas, os animais submetidos à hipotermia foram colocados junto aos demais animais da mesma ninhada na placa aquecedora, onde foram reaquecidos durante 30 minutos até atingirem uma temperatura corporal de 34-36°C e depois devolvidos às suas mães (FABRES et al., 2022).

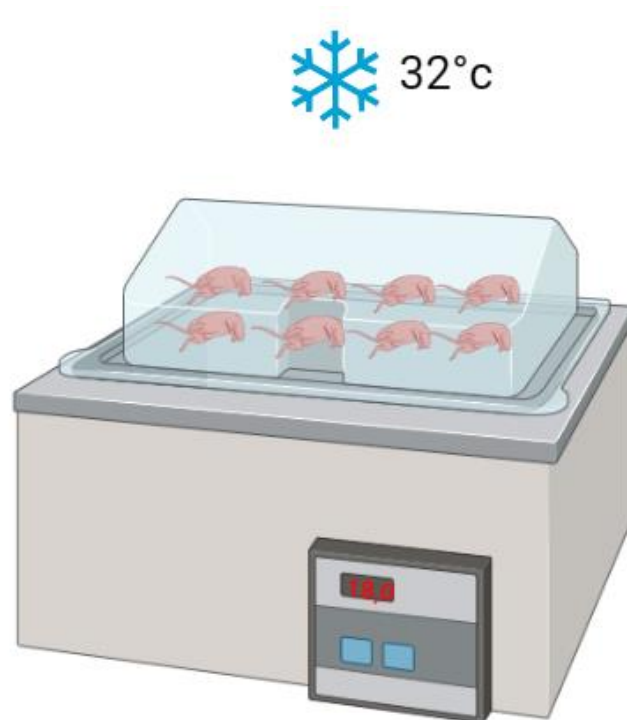


Figura 3. Esquema representativo do procedimento de HT. Passadas 2 horas após a hipóxia, os animais foram alocados em um banho-maria com temperatura da água controlada (18-20°C). Os animais foram mantidos por 5 horas ininterruptas em uma cuba com 10 divisórias, mantendo a temperatura corporal em torno de 32°C. A temperatura dos animais foi aferida a cada 5 minutos nos primeiros 20 min; após a temperatura-alvo para a HT ter sido atingida, a temperatura corporal dos filhotes foi aferida a cada 20 min. Ao final da HT, os animais foram reaquecidos; os animais foram colocados sobre uma placa aquecedora junto aos animais dos grupos que permaneceram em normotermia e permaneceram por 30 min na placa, até atingirem uma temperatura de 34-36°C (Figura de autoria própria).

5.6 Desenho Experimental

Para avaliar o efeito neuroprotetor da memantina combinada com a hipotermia terapêutica, ratos Wistar foram submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia aos 7 dias de vida. Para isso, foram definidos 5 grupos experimentais, divididos em machos e fêmeas, totalizando 10 grupos. Para mais detalhes do desenho experimental, ver Figura 4:

1. **SHAM** (animais submetidos à cirurgia fictícia, mantidos em normóxia e normotermia);
2. **HI** (animais submetidos à hipóxia-isquemia e mantidos em normotermia);
3. **HT** (animais submetidos à hipóxia-isquemia e à hipotermia terapêutica);

4. MT (animais submetidos à hipóxia-isquemia, mantidos em normotermia e tratados com memantina);

5. HT+MT (animais submetidos à hipóxia-isquemia, à hipotermia terapêutica e tratados com memantina).

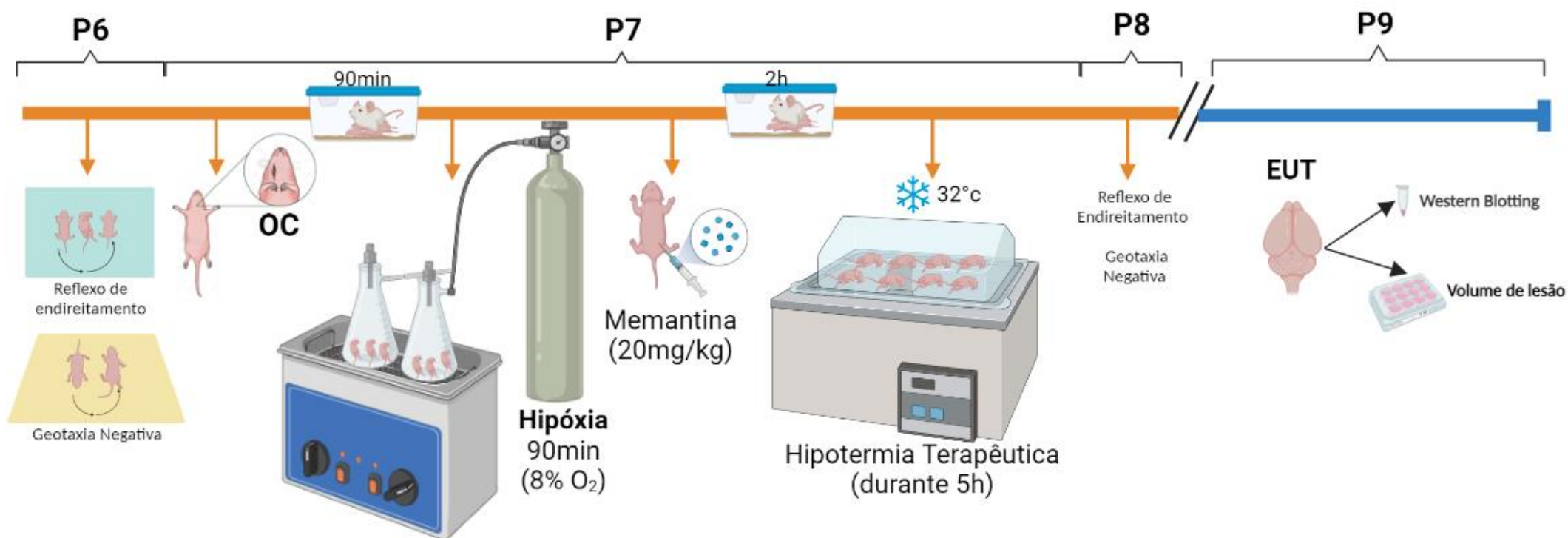


Figura 4. Desenho experimental. No 7º dia pós-natal (P7), ratos Wistar de ambos os sexos foram submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia (HI) neonatal, que consiste em uma cirurgia para a oclusão da carótida comum direita e posteriormente, após período de recuperação, foram expostos a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio) por 90 min. Os animais do grupo SHAM foram submetidos a uma cirurgia fictícia e mantidos em normóxia. Logo após a hipóxia, os animais dos grupos HI+MT e HI+HT+MT receberam injeção de memantina (i.p., 20 mg/kg). Após período de recuperação, os animais dos grupos HI+HT e HI+HT+MT foram submetidos à HT (32°C) por 5h ininterruptas. Os animais dos grupos SHAM, HI, HI+MT foram mantidos em normotermia (37°C). Tanto em P6 (antes da HI) quanto em P8 (após a HI), os animais foram submetidos a testes comportamentais (geotaxia negativa e reflexo de endireitamento). Em P9, todos os animais foram eutanasiados: um grupo teve os encéfalos coletados para a realização da análise de volume de lesão e outro grupo teve os hipocampus coletados para análise por *Western blotting*. OC (oclusão carotídea), EUT (eutanásia) (Figura de autoria própria).

5.7 Pesagem dos Animais

Ao longo dos procedimentos experimentais, os animais foram pesados em uma balança digital (Arcani ARC-2031) em quatro idades distintas:

- **P6**: peso verificado após os testes comportamentais;
- **P7**: peso verificado antes do início do procedimento de HI, ou seja, antes do animal ser anestesiado para a realização da cirurgia de oclusão da carótida comum direita;
- **P8**: peso verificado após os testes comportamentais, 24h após a HI;
- **P9**: peso verificado 48 horas após a HI, antes da eutanásia do animal para a coleta dos encéfalos.

5.8 Testes Comportamentais

Como um dos objetivos do estudo era avaliar o desempenho dos animais em testes comportamentais, foram escolhidos dois testes para avaliar a função neurológica a curto prazo e permitir a comparação de um mesmo animal em duas idades: em P6, ou seja, antes da HI; e em P8, 24h após a HI (YU et al., 2021; 2022). Todos os testes foram realizados sempre no mesmo horário do dia (entre 17h e 19h). Todos os experimentos comportamentais foram gravados para permitir que dois avaliadores distintos, cegos aos grupos experimentais, fizessem as análises posteriormente. O detalhamento dos testes está descrito nos itens a seguir.

5.8.1 Geotaxia Negativa (P6 e P8)

A idade média para o aparecimento do reflexo de geotaxia negativa é em torno da idade de P7, havendo um intervalo de P3-15 (FEATHER-SCHUSSLER & FERGUSON, 2016). O teste avalia a integridade vestibular e motora dos ratos. Os animais foram posicionados sobre um plano inclinado em um ângulo de 35° com a cabeça voltada para a direção negativa (base do plano). A superfície do plano possuía uma rede, para que o animal conseguisse manter-se agarrado à superfície, conforme Figura 5. Foi avaliado o tempo necessário para o animal realizar uma

volta de 180°, voltando a cabeça para cima, com tempo máximo de 60s (SANCHES et al., 2017). Esse é um comportamento inato (tomando como referência a posição da cabeça) (FEATHER-SCHUSSLER & FERGUSON, 2016). Os animais foram testados apenas uma vez, exceto nos casos em que o animal caiu do plano, nos quais foi realizada uma segunda tentativa após a realização dos testes dos outros animais (TASSINARI et al., 2020; NUNES, 2021; ZANG et al., 2022).

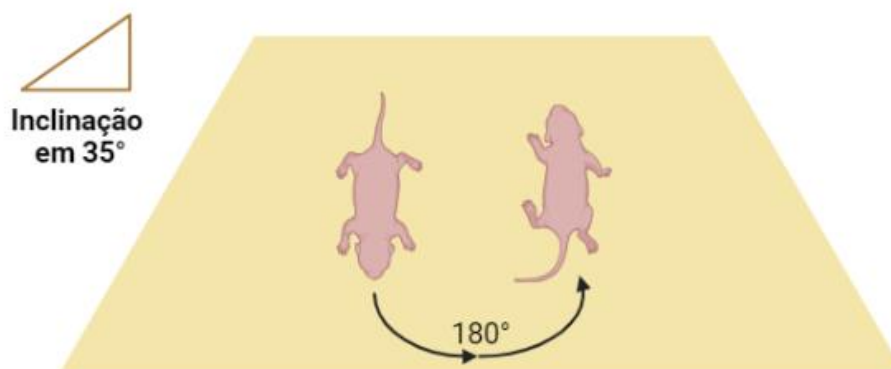


Figura 5. Representação do teste comportamental de geotaxia negativa. A imagem ilustrativa mostra os animais posicionados sobre um plano inclinado (ângulo de 35°) com a cabeça voltada para a direção negativa (base do plano). Foi avaliada a latência da resposta reflexa (Figura de autoria própria).

5.8.2 Reflexo de Endireitamento (P6 e P8)

O reflexo de endireitamento consiste em uma resposta motora que permite a um filhote reorientar sua postura. A idade média do aparecimento deste reflexo em roedores é P5, com um intervalo de P1-10 (FEATHER-SCHUSSLER & FERGUSON, 2016). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre um tecido do tipo TNT em uma superfície plana (Figura 6) e foi medida a latência do animal para voltar à postura original, apoiado sobre as quatro patas, com um tempo máximo de 15s. Cada animal foi testado três vezes; as repetições eram realizadas após todos os animais terem realizado a tentativa, ou seja, de forma não-sequencial. Foi calculada a média entre as três latências registradas (TASSINARI et al., 2020; NUNES, 2021; ZANG et al., 2023).

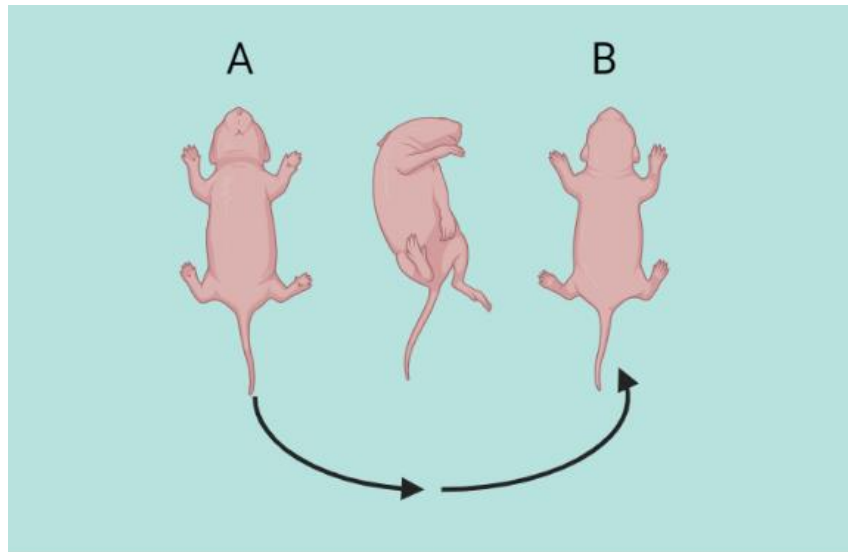


Figura 6. Representação do teste do reflexo de endireitamento. Imagem representativa do teste: **A** representa a posição inicial do animal (em decúbito dorsal) e **B** a posição final, com o animal apoiado sobre as quatro patas (Figura de autoria própria).

5.9 Volume de lesão encefálica

Para mensurar o volume de lesão encefálica dos animais às 48h após a HI (P9), foi realizada a técnica de coloração por TTC (cloreto de trifeniltetrazólio). Para a verificação do volume da lesão encefálica, os animais foram anestesiados profundamente com isoflurano e perfundidos com solução salina (0,9%). Primeiramente, para o procedimento de perfusão, os animais anestesiados foram submetidos à toracotomia para a exposição do coração. A seguir, uma agulha hipodérmica de 13 x 4 mm foi introduzida através do ventrículo esquerdo até atingir a luz da aorta. Foi feito um pequeno corte no átrio direito para a abertura de um orifício que permitia a saída da solução de perfusão. A solução de perfusão foi infundida com o auxílio de uma bomba peristáltica BP600. Os animais foram perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%) resfriada. Após a perfusão, os encéfalos foram dissecados e cortados coronalmente, de modo manual, com o auxílio de navalhas, em 4 secções de 3 mm de espessura cada (Figura 7), com o auxílio de um molde (*brain slicer*) confeccionado sob medida para as dimensões do encéfalo de um rato Wistar com 9 dias de vida (TASSINARI et al., 2020).

A seguir, as secções de tecido obtidas foram incubadas por 20 minutos em uma solução de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) 1% a temperatura de 37°C

e, em seguida, fixadas em paraformaldeído (PFA) 4%. As secções coradas com TTC foram digitalizadas e analisadas utilizando o programa ImageJ (NIH, Bethesda, EUA). Cada imagem digitalizada foi capturada juntamente com uma régua para permitir a criação de uma barra de calibração. Assim, foi possível determinar o tamanho real das áreas de interesse com o auxílio do mouse do computador. As áreas correspondentes ao tecido vivo (coradas com TTC) e tecido morto (áreas não-coradas) foram multiplicadas pela espessura da fatia (3mm) para o cálculo do volume absoluto de lesão (TANIGUCHI e ANDREASSON, 2008). A porcentagem de lesão (volume %) relativa ao volume total do hemisfério ipsilateral foi calculada pela soma do volume de lesão de todas as fatias, com o resultado sendo dividido pelo volume total do hemisfério ipsilateral à isquemia e então multiplicado por 100 (TANIGUCHI e ANDREASSON, 2008; FABRES et al., 2018).

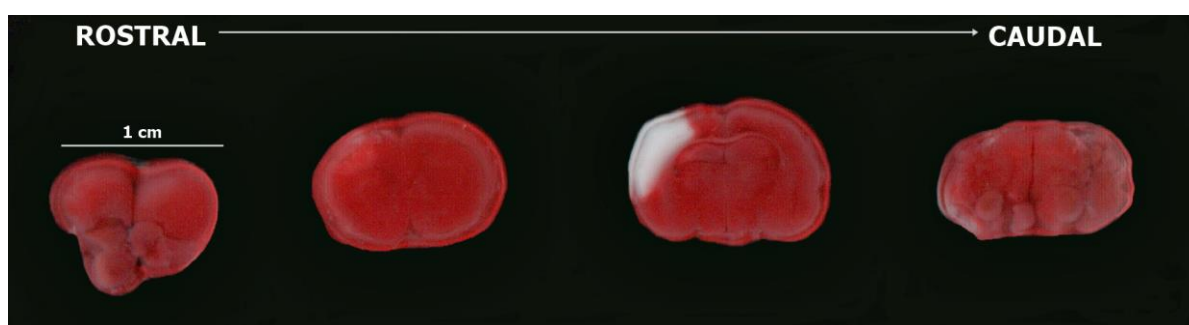


Figura 7. Imagem representativa das fatias coradas com TTC. Após a perfusão, os encéfalos foram dissecados e cortados em 4 fatias de 3 mm de espessura cada em um molde (*brain slicer*). As fatias de tecido foram incubadas por 20 minutos em uma solução de TTC 1% a temperatura de 37°C. As áreas correspondentes ao tecido vivo (coradas com TTC) e tecido morto (áreas não-coradas) foram analisadas utilizando o programa ImageJ. A fatia 1 representa um corte mais rostral e a fatia 4 um corte mais caudal (Figura de autoria própria).

5.10 Western blotting

Para a realização da técnica de *Western blotting*, os hipocampus ipsilaterais à lesão foram rapidamente retirados após a decapitação dos animais, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior homogeneização. Os hipocampus foram homogeneizados em tampão de lise celular e centrifugados (centrífuga refrigerada TH.9300R) à 4°C por 10 min à 10.000 rpm. Todo o sobrenadante foi coletado e uma alíquota foi utilizada para a dosagem de proteínas. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinonínico utilizando um kit comercial (Thermo Fischer – Pierce BCA Protein Assay kit 23225).

A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro (SpectraMax M5) com comprimento de onda de 562 nm.

As amostras foram analisadas por NuPAGE Bis-Tris (gel de poliacrilamida pré-moldado) em gel-gradiente de 4 a 12%, usando o sistema de eletroforese XCell SureLock (Thermo Fischer/Invitrogen). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose com um tamanho de poro de 0,2 μm e incubadas por 2h em solução de bloqueio (tampão Tris-salina contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween 20, pH 7,4).

As membranas foram processadas para imunodeteção com os seguintes anticorpos primários contra as proteínas de interesse: caspase-3 clivada (1:1000, Cell Signaling), fosfo-Akt (1:1000, Cell Signaling) e Bcl-XL (1:1000, Sigma). As membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários. Os resultados foram normalizados pela expressão da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH, 1:1000, Millipore). Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários acoplados à peroxidase: IgG anti-*mouse* (1:10000, Millipore) para a GAPDH e para a p-Akt, e IgG anti-*rabbit* (1:1000, Invitrogen) para caspase-3 clivada e Bcl-XL. Após a incubação com os anticorpos secundários específicos descritos acima, as membranas foram reveladas em sistema de quimiluminescência, com auxílio de reagentes de detecção (ECL, Amersham), no equipamento Image Quant LAS 4000.

5.11 Análise Estatística

Devido ao elevado número de grupos experimentais (5 grupos x 2 sexos = 10 grupos), o que aumenta a variabilidade dos dados, as análises estatísticas foram realizadas separadamente para machos ou fêmeas. A análise dos dados foi realizada usando software estatístico GraphPad Prism versão 8.0. Os dados foram primeiramente analisados para a identificação e remoção de “outliers” pelo método de ROUT, com $Q=1\%$. Os dados foram testados para normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. Após, foi aplicada análise da variância (ANOVA) de uma via seguida por *post hoc* de Tukey (análises de peso e *Western blotting*). Esses dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para as amostras não-paramétricas foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn (análises

de volume de lesão e dos testes comportamentais). Esses resultados foram representados como mediana e intervalos interquartis (25^o e 75^o percentis) e valores máximo e mínimo. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

Durante todas as etapas do estudo os investigadores sempre foram cegos para os grupos: os experimentadores que realizaram o procedimento cirúrgico do modelo de HI e os que gravaram e analisaram os testes comportamentais não tinham conhecimento dos grupos experimentais aos quais os animais pertenciam.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL MAMUN, A. et al. Inflammatory Responses are Sex Specific in Chronic Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 9, p. 1328–1339, 2018.
- ARTENI, N. S. et al. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 1, p. 92–98, 2010.
- BAS, J.; NGUYEN, T.; GILLET, G. Involvement of Bcl-xL in Neuronal Function and Development. **Int. J. Mol. Sci.** Vol. 22, p. 3202, 2021
- BINVIGNAT, O.; OLLOQUEQUI, J. Excitotoxicity as a Target Against Neurodegenerative Processes. **Pharmaceutical Design**. Vol. 26, p. 1251-1262, 2020.
- COTMAN, C. W.; et al. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. **Trends Neuroscience**. Vol. 10, p. 273-280, 1987.
- CHAKKARAPANI, E. et al. Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. **Annals of Neurology**, v. 68, n. 3, p. 330–341, 2010
- CHEN, V.H.S. Neuroprotective concentrations of the n-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. **Neuroscience** Vol. 86, No. 4, p. 1121–1132, 1998
- CHEN, B. Memantine attenuates cell apoptosis by suppressing the calpain-caspase-3 pathway in an experimental model of ischemic stroke. **Experimental Cell Research**. Vol. 351, p. 163–172, 2017
- CHO, K.H.T.; et al. Cooling and immunomodulation for treating hypoxic-ischemic brain injury. **Pediatrics International** vol. 62, p. 770–778, 2020
- CHOI, D.W.; MAULUCCI-GEDDE, M.; KRIEGSTEIN, A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **Journal of Neuroscience**. Vol. 7, n. 2, p. 357-368, 1987.
- DANBOLT, N. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology** vol. 65, 1–105, 2001.
- DAVIDSON, J.O; et al. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy - Where to from here? **Front. Neurol.** Vol. 6, p. 198, 2015.
- DOBLE, A. The Role of Excitotoxicity in Neurodegenerative Disease: Implications for Therapy. **Pharmacology & Therapeutics**. Vol 81, p. 163-221, 1999.
- DUMBUYA. J.S.; et al. The role of G-CSF neuroprotective effects in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE): current status. **Journal of Neuroinflammation** p.18-55, 2021
- DURÁN-CARABALI, L. E. et al. Preventive and therapeutic effects of environmental enrichment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 485–497, 2019.
- FABRES, R. B. et al. Effects of progesterone on the neonatal brain following hypoxiaischemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 3, p. 813–821, 2018.

- FABRES R.B.; et al. Long-Lasting Actions of Progesterone Protect the Neonatal Brain Following Hypoxia/Ischemia. **Cell Mol Neurobiol.** vol. 1;40(8), p. 1417–28. 2020
- FABRES, R.B.; et al. Therapeutic hypothermia for the treatment of neonatal hypoxia/ischemia: sex-dependent modulation of reactive astrogliosis. DOI:10.21203/rs.3.rs-1333012/v1, 2022
- FEDELE, L. et al. Disease-associated missense mutations in GluN2B subunit alter NMDA receptor ligand binding and ion channel properties. **Nature Communications**, v. 9, n. 957, 2018.
- FEATHER-SCHUSSLER, D. N.; FERGUSON, T. S. A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. n. November, p. 1–12, 2016.
- FLEISS, B.; GRESSENS, P. Tertiary mechanisms of brain damage: A new hope for treatment of cerebral palsy? **Lancet Neurol.** Vol.11, p. 556–566, 2012.
- FONNUM, F. Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain. **Journal of Neurochemistry.** Vol. 42, n. 1, 1984.
- GLUCKMAN, P. D. et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: Multicentre randomised trial. **Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 663–670, 2005.
- GRECO, P.; et al. Pathophysiology of hypoxic–ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. **Belgian Neurological Society.** Vol. 120, p. 277–288, 2020.
- GWAG, B.J.; et al. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro. **Neuroscience.** Vol. 68, p. 615-619, 1995.
- GUNN, A.J.; et al. Dramatic Neuronal Rescue with Prolonged Selective Head Cooling after Ischemia in Fetal Lambs. *The American Society for Clinical Investigation* 248–256, 1997
- GUNN, A.J.; THORESEN, M. Hypothermic neuroprotection. **NeuroRx.** Vol. 3, p.154–69, 2006.
- GUNN, A.J.; et al. Therapeutic hypothermia translates from ancient history in to practice. **Pediatr Res.** vol. 81(1-2): 202–209, 2017
- HASSELL, K.J.; et al. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection, *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* Vol. 100 (6), p. 541–552, 2015
- HAGBERG, H. et al. The role of inflammation in perinatal brain injury Henrik. **Nature Review Neurology.** Vol. 11, n. 4, p. 192–208, 2015.
- HILL, C.A.; FITCH, R.H. Sex differences in mechanisms and outcome of neonatal hypoxia-ischemia in rodent models: implications for sex-specific neuroprotection in clinical neonatal practice. **Neurol Res Int.** 2012. DOI: 10.1155/2012/867531
- KALE, J.; OSTERLUND, E.J.; ANDREWS, D.W. BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. **Cell Death Differ.** Vol. 25, p. 65–80, 2018.
- KARIHOLU, U.; et al. Therapeutic hypothermia for mild neonatal encephalopathy: A systematic review and meta-analysis. **Arch. Dis. Child. -Fetal Neonatal.** Vol. 105, p. 225–228, 2018.

- KLÖFERS, M.; et al. M. Effects of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibition in a Neonatal Rodent Model of Hypoxic-Ischemic Injury. **Biomed Res. Int.** 2924848. 2017
- KOEHN LM, et al. Effects of Three Different Doses of Inter-Alpha Inhibitor Proteins on Severe Hypoxia–Ischemia-Related Brain Injury in Neonatal Rats. **International Journal of Molecular Sciences.** Vol. 23(21), p. 13473, 2022.
- LANDUCCI, E.; et al. Neuroprotective effects of topiramate and memantine in combination with hypothermia in hypoxic-ischemic brain injury in vitro and in vivo. **Neurosci. Lett.** Vol. 668, p. 103–107, 2018
- LANDUCCI, E.; PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; FACCHINETTI, F. Experimental Models for Testing the Efficacy of Pharmacological Treatments for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. **Biomedicines** , 10, 937, 2022
- LI, L.; QU, Y.; MAO, M.; XIONG, Y. AND MU, D. The involvement of phosphoinositid 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factor-1alpha in the developing rat brain after hypoxia-ischemia. **Brain Res.** Vol. 1197, p. 152-158, 2008.
- LIN, T.N. et al. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. **Stroke.** vol. 24, p. 117–121, 1993.
- LIU, C.; et al. Neuroprotective effect of memantine combined with topiramate in hypoxic–ischemic brain injury. **Brain research.** Vol. 1282, p. 173 – 182, 2009.
- LUBICS, A. et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioural Brain Research,** v. 157, p. 157–165, 2005.
- MANNING, B.D.; CANTLEY, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell.** vol. 129(7), p.1261–74, 2007.
- MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L.; GUTHRIE, P.B. Voltage-Dependent Block by Mg-2+ of NMDA Responses in Spinal-Cord Neurons. **Nature.** Vol. 309, p. 261–263, 1984.
- MATSUDA, V. D. V. et al. Impact of neonatal anoxia and hypothermic treatment on development and memory of rats. **Experimental Neurology,** p. 113691, 2021.
- MIRZA, M. A. et al. Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. **Journal of Neuroinflammation,** v. 12, n. 1, p. 32, 2015.
- MOIYER, H.; et al. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron.** Vol. 12, n. 3, p. 529-540, 1994.
- MONANGHAN, D.T.; BRIDGES, R. J.; COTMAN, C. W. THE EXCITATORY AMINO ACID RECEPTORS: Their Classes, Pharmacology, and Distinct Properties In the Function of the Central Nervous System. **Pharmacologic Toxicologic.** Vol. 29, p. 365-402, 1989.
- NAIR, J.; KUMAR, V. H. S. Current and Emerging Therapies in the Management of Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Neonates. **Children.** Vol. 5, p. 99, 2018. doi:10.3390/children5070099

- NARAYANAMURTHY, R.; et al. Drug delivery platforms for neonatal brain injury. **Journal of Controlled Release**. Vol. 330, p. 765-787, 2021.
- NETTO, C. A. et al. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 1–2, p. 409–421, 2017.
- NICHOLLS, D.; ATTWELL D. The release and uptake of excitatory amino acids. **Trends Pharmacol Sci**. Vol. 11, p. 462-8, 1990.
- NOVAK, C.M.; OZEN, M.; BURD, I. Perinatal Brain Injury: Mechanisms, Prevention, and Outcomes. **Clin. Perinatol**. Vol. 45, p. 357–375, 2018.
- NUNES, R.R. **Efeito da hipotermia terapêutica sobre parâmetros do desenvolvimento e comportamentais e a imunidade periférica em ratos submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia encefálica neonatal**. Orientador: Luciano S. de Fraga. 2021. Dissertação (mestrado em fisiologia). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre, 2021.
- OLIVARES, D.; et al. N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine Treatment for Alzheimer’s Disease, Vascular Dementia and Parkinson’s Disease. **Current Alzheimer Research**. Vol. 9, p. 746-758, 2012.
- OTA, A.M.D.; et al. Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. Vol. 177, p. 519-526, 1997.
- TEO, J.D.; MORRIS, M.J.; JONES, N.J. Hypoxic postconditioning improves behavioural deficits at 6 weeks following hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. **Behavioural Brain Research** vol. 333, p. 27–34, 2017.
- PATEL, A. R. et al. Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, v. 5, n. 2, p. 73–90, 2013.
- PATEL, S. D.; et al. Therapeutic hypothermia and hypoxia–ischemia in the term-equivalent neonatal rat: characterization of a translational preclinical model. **Pediatr. Res**. Vol. 78(3), p. 264–271, 2015.
- PREGNOLATO, S.; et al. Glutamate Transport and Preterm Brain Injury. **Front. Physiol.**, 2019 doi: 10.3389/fphys.2019.00417
- RICE R.D. et al. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Ann Neurol**. vol. 9, n. 2, p. 131–141, 1981.
- RODRIGUES-FANJUL, J.; et al. Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury: Is it a gender question?. **PLoS ONE** 12(9): e0184643, 2017.
- SABIR, H. et al. Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxiaischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. **Stroke**, v. 43, n. 12, p. 3364–3370, 2012.
- SANCHES, E. F. et al. Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic–ischemic rats. **Brain Research**, v. 1438, p. 85–92, 2012.

- SANCHES, E. F. et al. Pregnancy swimming causes short- and long-term neuroprotection against hypoxia-ischemia in very immature rats. **Pediatric Research**, v. 82, n. 3, p. 544–553, 2017.
- SANCHES, E. F. et al. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia–ischemia in P3 and P7 rats. **Neuroscience**, v. 290, p. 581–593, 2015.
- SHANKARAN, S. et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic–ischemic encephalopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 15, p. 1574– 1584, 2005.
- TANIGUCHI, H.; ANDREASSON, K. The Hypoxic Ischemic Encephalopathy Model of Perinatal Ischemia. **J. Vis. Exp.** p. 3–4, 2008
- TASSINARI, I. D. Á. et al. Lactate Administration Reduces Brain Injury and Ameliorates Behavioral Outcomes Following Neonatal Hypoxia–Ischemia. **Neuroscience**, v. 448, p. 191–205, 2020.
- VANNUCCI, S.J. Hypoxia-ischemia in the immature brain. **Journal of Experimental Biology**. vol. 207, n. 18, p. 3149–3154, 2004.
- VANNUCCI, R. C. et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. **Journal of Neuroscience Research**, v. 55, n. 2, p. 158–163, 1999.
- ZHU, C.; et al. Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. **J Neurochem**. Vol. 96(4), p. 1016–1027, 2006.
- ZANG, J.; et al. Short-term effects of therapeutic hypothermia following hypoxia–ischemia in neonatal male and female rats. **Int J Dev Neurosci**. P.1–13. 2022
- WANG, R.; REDDY, P. H. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer’s disease. **J Alzheimers Dis**. Vol: 57, n. 4, p. 1041–1048, 2017.
- WASSINK, G.; et al. The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. **Front Neurosci**. Vol. 8, p. 40, 2014.
- WATKINS, J. C. Excitatory amino acid transmitters. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol**. 21:165-20, 1981.
- WOOD, T.; et al. Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. **Sci. Rep**. Vol. 6, p. 23430, 2016.
- WOOD, T.; et al. Variability and sex-dependence of hypothermic neuroprotection in a rat model of neonatal hypoxic–ischaemic brain injury: a single laboratory meta-analysis. **Nature**. vol. 10, p.10833, 2020.
- WU, M. Y. et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. **Cell. Physiol. Biochem**. Vol. 46, p. 1650–1667, 2018.