

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

RAFAEL BANDEIRA FABRES

**PAPEL DA PROGESTERONA COMO POSSÍVEL
NEUROPROTETOR EM MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA
ENCEFÁLICA NEONATAL**

PORTO ALEGRE

2016

RAFAEL BANDEIRA FABRES

**PAPEL DA PROGESTERONA COMO POSSÍVEL
NEUROPROTETOR EM MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA
ENCEFÁLICA NEONATAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga

PORTO ALEGRE

2016

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Hipóxia-isquemia neonatal	9
1.2 Reperusão	13
1.3 Fisiopatologia do modelo.....	14
1.4 Metabolismo energético e transporte de nutrientes no cérebro imaturo.....	15
1.5 Via da Akt.....	17
1.6 Progesterona	18
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. HIPÓTESE	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivos gerais	24
4.2 Objetivos específicos	24
5. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 Animais.....	25
5.2. Considerações Éticas	25
5.3 Anestesia.....	26
5.4 Hipóxia-isquemia neonatal	26
5.5 Grupos experimentais e administração de progesterona.....	27
5.6 Pesagem dos animais.....	29
5.7 Cálculo do volume de lesão	30
5.8 Western blotting	32
5.9 Análise estatística	32
6. RESULTADOS	34
6.1 Mortalidade	34
6.2 Peso corporal	34
6.3 Volume do infarto.....	37
6.4 Volume da área não infartada.....	39
6.4 Volume do infarto corrigido (%)	40
6.5 Comparação dos hemisférios	41
6.6 p-Akt e caspase-3.....	42
7. DISCUSSÃO.....	47
8. CONCLUSÕES	56
9. REFERÊNCIAS:.....	57

Lista de figuras e tabela

Figura 1 - Esquema ilustrativo da fisiopatologia da encefalopatia hipóxico-isquêmica (modificado de ARAUJO et al., 2008).....	12
Figura 2 - Procedimento de hipóxia-isquemia de Levine (LEVINE, 1960), modificado, que se utiliza da combinação de hipóxia e isquemia.....	27
Figura 3 - Ilustração dos procedimentos realizados para os animais do grupo hipóxia-isquemia.....	29
Figura 4 - Imagem representativa de corte do encéfalo corado.....	31
Tabela 1 - Número de animais neonatos utilizados e mortalidade.....	33
Figura 5 - Peso corporal dos animais imediatamente antes do início do procedimento de hipóxia-isquemia (Peso 1).....	35
Figura 6 - Peso corporal dos animais após o início da hipóxia (Peso 2).....	35
Figura 7 - Peso corporal dos animais 6 horas após o início da hipóxia (Peso 3).....	36
Figura 8 - Peso corporal dos animais 24 horas após o início da hipóxia (Peso 4).....	36
Figura 9 - Imagens digitalizadas das fatias do encéfalo de animais de cada um dos grupos experimentais	37
Figura 10 - Volume total do infarto no hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea.....	38
Figura 11 - Porcentagem do volume de infarto relativo ao hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea	39
Figura 12 - Volume da área não infartada no hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea.....	40

Figura 13 - Volume de infarto corrigido (%).....	41
Figura 14 - Comparação do volume total dos hemisférios contralateral e ipsilateral à isquemia carotídea dentro de cada grupo experimental.....	42
Figura 15 - Comparação da relação da expressão p-Akt entre os grupos experimentais.....	43
Figura 16 - Comparação da expressão de caspase-3 entre os os grupos.....	44
Figura 17 - Comparação da expressão p-Akt/Akt basal entre os hemisférios contralateral e ipsilateral à isquemia carotídea para os grupos submetidos à HI.....	45
Figura 18 - Comparação das concentrações de caspase-3 entre os hemisférios contralateral e ipsilateral à isquemia carotídea para os grupos submetidos à hipóxia-isquemia.....	46

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Prof. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro e Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga pelos exemplos profissionais e pessoais. Pelos ensinamentos ao longo desses dois anos e pelo esforço na condução deste trabalho, que convenhamos, não foi fácil.

Aos meus pais; pelo amor, apoio e paciência incondicionais.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro no decorrer destes dois anos.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por ter me dado todo o apoio técnico e intelectual quando necessário.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do HCPA, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos, Vitor e Etri, pelos conselhos e distrações quando eu precisava.

Ao Eduardo Sanches, por me ensinar a reproduzir o modelo de HI, e pelas consultorias via telefone entre Brasil-Suíça.

Ao Felipe Odorcyk, pelas conversas e ideias que me ajudaram a entender cada vez melhor o modelo.

À Luciana Abreu, por ter paciência enquanto eu errava o nó nos primeiros animais e por me acompanhar nos experimentos.

À Amanda Stapenhorst e Ana Lúcia Cecconello, pelo esforço que fizeram para me ajudar a terminar meu trabalho.

Aos colegas do laboratório LAMEC e LINH, que sempre me apoiaram e me deram suporte quando precisei.

À Roberta e Verônica, por terem me ajudado na padronização dos métodos.

Aos meus colegas, em especial, Samir e Elaine que sempre estavam dispostos a me ajudar nos finais de semanas (desculpe pessoal).

À minha melhor amiga e futura esposa, Daniele Bartzen, pela compreensão e paciência nesta trajetória (principalmente nos finais de semana de sol, desculpe também por isso).

Ao Douvan, que mesmo nos deixando tão cedo nesta vida, a sua lembrança de alegria e bondade me dá força para seguir meu caminho.

Resumo

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal, ou simplesmente hipóxia-isquemia (HI) neonatal, é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em neonatos humanos. De 20% a 50% dos recém-nascidos com HI severa morrem no período perinatal. Quando sobrevivem, 25% apresentam deficiências neuropsicológicas, como dificuldade de aprendizado, epilepsia e paralisia cerebral. Devido a isso, a eficácia de possíveis agentes neuroprotetores tem sido testada em modelos animais. Há razão para se pensar que a progesterona tem um forte potencial para o tratamento da HI neonatal, já que a sua utilização tem se mostrado benéfica em pesquisas relacionadas com lesão cerebral traumática, lesão cerebral isquêmica e outros modelos de lesão do sistema nervoso central (SNC) em adultos. Inúmeros estudos têm mostrado que o modelo animal de HI de Rice e Vannucci (1981) em animais neonatos, utilizado no presente trabalho, pode produzir lesões no sistema nervoso central relativamente previsíveis, e que estas lesões encefálicas parecem semelhantes às observadas clinicamente em humanos (SALMASO et al., 2014). Para a realização do modelo de HI foram utilizados ratos Wistar com idade de 7 dias (P7). Após a oclusão da carótida esquerda, os animais foram colocados em câmaras para exposição à atmosfera hipóxica com 8% O₂/92% N₂ por 90 minutos. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: SHAM, HI, HI+PROG-PRÉ (PRÉ), HI+PROG-PÓS (PÓS), HI+PROG-PRÉ/PÓS (PP). Os termos PRÉ e PÓS referem-se à administração de progesterona (na dose de 5 mg/kg) antes ou após o procedimento de HI neonatal. Dependendo do grupo experimental, os animais foram tratados com progesterona imediatamente antes da isquemia e/ou 6 e 24 horas após o início da hipóxia. Foram analisados o peso corporal dos animais (imediatamente antes da isquemia e 6, 24 e 48 horas após o início da hipóxia), o volume de lesão cerebral, além da expressão das proteínas p-Akt e caspase-3 pela técnica de *Western blotting*. Todos os animais submetidos ao modelo de HI (tratados ou não com progesterona) apresentaram lesão cerebral, em comparação ao grupo SHAM. Quanto à expressão das proteínas p-Akt e caspase-3, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os hemisférios lesionados em todos grupos. No entanto, quando foi comparado o hemisfério lesionado dos animais submetidos ao modelo com o hemisfério contralateral, foi possível observar uma diminuição significativa da expressão da p-Akt. Além disso, os grupos PRÉ e PP também apresentaram redução no peso corporal já a partir de 6 horas após a lesão, mostrando uma rápida interferência sistêmica da progesterona administrada antes do procedimento de HI. Após 48 horas, todos os grupos submetidos ao procedimento de HI (tratados ou não com progesterona) apresentaram redução de peso corporal. A progesterona não foi capaz de reverter ou reduzir o dano causado pela HI, ou seja, na dose e padrão de administração utilizados no presente trabalho, a progesterona não atua como um agente neuroprotetor.

Palavras-chave: hipóxia-isquemia neonatal, progesterona, volume de lesão, Akt, caspase-3.

Abstract

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy or simply neonatal hypoxia-ischemia (HI) is a main cause of morbidity and mortality in human neonates. Moreover, 25% of survivors show neuropsychological dysfunctions such as learning difficulties, epilepsy and cerebral palsy. Because of this, the effectiveness of potential neuroprotective agents has been tested in animal models. There is a reason to suppose that progesterone has a strong potential for the treatment of neonatal HI since its use has been shown to be beneficial in researches related to traumatic brain injury, ischemic brain injury and other central nervous system injury models (CNS) in adults. Several studies have shown that the newborn animal model of HI developed by Rice and Vannucci (1981), and used in the present study, can produce lesions in the central nervous system which are predictable and similar to those observed clinically in humans. In order to perform the HI model we used 7 days old (P7) Wistar rats. After occlusion of the left carotid, the animals were placed in hypoxic chambers and exposed to the hypoxic atmosphere (8% O₂/92% N₂ for 90 minutes). The animals were divided into five groups: SHAM, HI, HI+PROG-PRÉ (PRÉ), HI+PROG-PÓS (PÓS), HI+PROG-PRÉ/PÓS (PP). The PRÉ and PÓS terms refer to the administration of progesterone (5 mg/kg) before and/or after the HI procedure. Progesterone was administered immediately before ischemia, 6 and 24 hours after the beginning of hypoxia, depending on the experimental group. Body weight was evaluated immediately before ischemia and/or 6 and 24 hours after the start of hypoxia. The volume of brain damage, in addition to the expression of p-Akt and caspase-3 were also evaluated. All animals submitted to HI (treated or not with progesterone) showed brain damage when compared to the SHAM group. No significant differences were observed for the levels of p-Akt and caspase-3 when ipsilateral hemispheres of all experimental groups were compared each other. However, when the injured hemisphere of all animal was compared with the contralateral one it was verified a significant decrease in the expression of p-Akt. Furthermore, the PRÉ and PP groups have also exhibited a remarkable reduction in the body weight, observed as soon as 6 h after injury. It suggests a fast systemic interference of progesterone administered before the HI procedure. At 48 hours following ischemia, all animals submitted to HI procedure showed a reduction in the body weight. Progesterone was unable to reverse or reduce the damage caused by HI. Thus, considering the specific dose and schedule of administration used in the present study, progesterone can not be considered as a neuroprotector agent.

Keywords: neonatal hypoxic-ischemic, progesterone, lesion volume, Akt, caspase-3

1 INTRODUÇÃO

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal ou simplesmente hipóxia-isquemia (HI) neonatal é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em neonatos (KNOX et al., 2013). A HI ocorre em cerca de 2% dos recém-nascidos, sendo que 60% destes são prematuros. De 20% a 50% dos recém-nascidos com HI severa morrem no período perinatal. Quando sobrevivem, 25% apresentam deficiências neuropsicológicas, como dificuldade de aprendizado, epilepsia e paralisia cerebral (MCQUILLEN; FERRIERO, 2006). As causas da HI, em sua maioria, ocorrem antes do nascimento, porém podem ocorrer também durante e após o nascimento (DOUGLAS-ESCOBAR; WEISS, 2013).

A compreensão da fisiopatologia da HI neonatal é essencial para a concepção de intervenções eficazes no feto e no recém-nascido que sofreram eventos hipóxico-isquêmicos encefálicos (VANNUCCI; HAGBERG, 2004). Existe uma escassez de opções terapêuticas para o tratamento da HI (FERRIERO, 2004), embora a busca por estratégias para superar este problema venha de longa data (YANG et al., 2012). A única terapia bem estabelecida atualmente para a HI em neonatos nascidos a termo é a hipotermia moderada. Entretanto, a hipotermia promove proteção apenas se o encéfalo for moderadamente afetado pelo evento hipóxico-isquêmico, não tendo efeito se o evento for severo. Devido a isso, a eficácia de outros possíveis agentes neuroprotetores tem sido testada em modelos animais (REES; HARDING; WALKER, 2011).

1.1 Hipóxia-isquemia neonatal

Em um curto período de isquemia não é possível observar mudanças histopatológicas encefálicas. Entretanto, a deterioração no estado energético e as subseqüentes alterações metabólicas ocorrem rapidamente, podendo ser observadas nos primeiros cinco minutos pós-isquemia (DUARTE; CAMPOS; COLLI, 2003). Os efeitos cerebrais causados pela isquemia podem ser

divididos em três fases: despolarização, cascata bioquímica e lesão de reperfusão (RIMPILÄINEN et al., 2000).

A deterioração no estado energético está associada à redução da síntese de ATP, prejudicando o equilíbrio iônico através da membrana celular, invertendo as concentrações dos íons e gerando edema cerebral (KORC; BIDEAIN; MARTELL, 1995; PRANDINI et al., 2005). Em função desta diminuição da concentração de ATP, há uma dificuldade em manter a atividade das bombas, como a bomba Na^+/K^+ -ATPase, levando a uma despolarização da célula que causa uma massiva liberação de neurotransmissores, incluindo o glutamato (DU PLESSIS; JOHNSTON, 1997; SANCHES et al., 2013a). Os eventos hipóxico-isquêmicos têm sido relacionados com a liberação excessiva de aminoácidos excitatórios. Durante o evento hipóxico, os neurônios que liberam glutamato são ativados pela entrada de cálcio devido à despolarização (DELIVORIA-PAPADOPOULOS; MISHRA, 1998).

A neurotoxicidade do glutamato está intimamente ligada a um aumento de Ca^{2+} intracelular causado pela estimulação excessiva de seus receptores ionotrópicos, que são canais iônicos que quando ativados se tornam permeáveis a cátions como sódio, cálcio e potássio. Os receptores ionotrópicos do glutamato são divididos em NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) e cainato. Também ocorre estimulação dos receptores metabotrópicos, que são proteínas ligadas à ativação de sistemas de segundos mensageiros acoplados à proteína G, os quais modulam a atividade de enzimas como adenilato-ciclase, guanilato-ciclase e fosfolipase C. Sendo o receptor NMDA altamente permeável ao Ca^{2+} , sua hiper-estimulação tem sido considerada como a principal responsável pela morte celular associada à excitotoxicidade do glutamato (DELIVORIA-PAPADOPOULOS; MISHRA, 1998; MELDRUM, 2000; OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998). Esta condição de aumento excessivo de Ca^{2+} intracelular gera uma retroalimentação positiva, que leva à despolarização da membrana, abertura de mais canais NMDA e mais influxo elevado de Ca^{2+} , o qual será bombeado pelas Ca^{2+} -ATPases da membrana plasmática, levando assim ao consumo exagerado de ATP (PRANDINI et al., 2005).

O principal fator da cascata de eventos ativada pela HI é justamente

esse acúmulo do cálcio citosólico, que leva à morte celular induzida pela hipóxia-isquemia (PROCIANOY; SILVEIRA, 2001). As altas concentrações intracelulares de Ca^{2+} levam a alterações como a ativação das fosfolipases A e C, que promovem a hidrólise dos fosfolípidios e geram agressão celular (GAGLIARDI, 2000). A concentração aumentada de Ca^{2+} , além de levar à ativação das fosfolipases, também pode ativar enzimas celulares envolvidas em processos auto-digestivos e estimular uma sequência de reações enzimáticas tóxicas que causam danos ao processo de fosforilação oxidativa, com redução da função mitocondrial e da produção de energia (GAGLIARDI, 2000; PRANDINI et al., 2005).

O insulto hipóxico-isquêmico leva também a uma ativação excessiva da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o que eleva a concentração de óxido nítrico (NO) e a produção de radicais livres. Quando a produção de radicais livres ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes ocorre estresse oxidativo, que pode levar a lesões na membrana plasmática das células neurais (GAGLIARDI, 2000).

Outro evento importante durante o processo de HI é a liberação de citocromo C pela mitocôndria. O citocromo C é um ativador das caspases e, em conjunto com outros ativadores, acaba alterando o transporte de elétrons e levando à perda do potencial transmembrana mitocondrial. Isso resulta em redução ou mesmo depleção do ATP celular, fato que auxilia no processo de morte celular (KOWALTOWSKI, 2000; ROSETO; BRENNER, 1999). Além da depleção do ATP, a ativação das caspases pelo NO e pelo citocromo C pode dar início ao processo conhecido como apoptose ou morte celular programada (ZHU et al., 2004).

No evento hipóxico-isquêmico, o excesso de radicais livres ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes (KOWALTOWSKI, 2000), induzindo necrose e apoptose (ROSETO; BRENNER, 1999), sobretudo no recém-nascido pré-termo que nasce com uma proteção insuficiente contra os radicais livres de O_2 (KORC; BIDEAIN; MARTELL, 1995; TATARANNO; PERRONE; BUONOCORE, 2015). A ativação de proteases pelo Ca^{2+} , juntamente com o excesso de radicais livres que atuam na membrana fosfolipídica, podem lesionar a membrana plasmática e acabar danificando a célula (PRANDINI et

al., 2005). Ao mesmo tempo, várias evidências experimentais indicam também o envolvimento da cascata inflamatória na patogênese da lesão isquêmica cerebral e no processo de excitotoxicidade (PRANDINI et al., 2005).

A figura 1 resume os eventos que ocorrem durante a encefalopatia hipóxico-isquêmica.

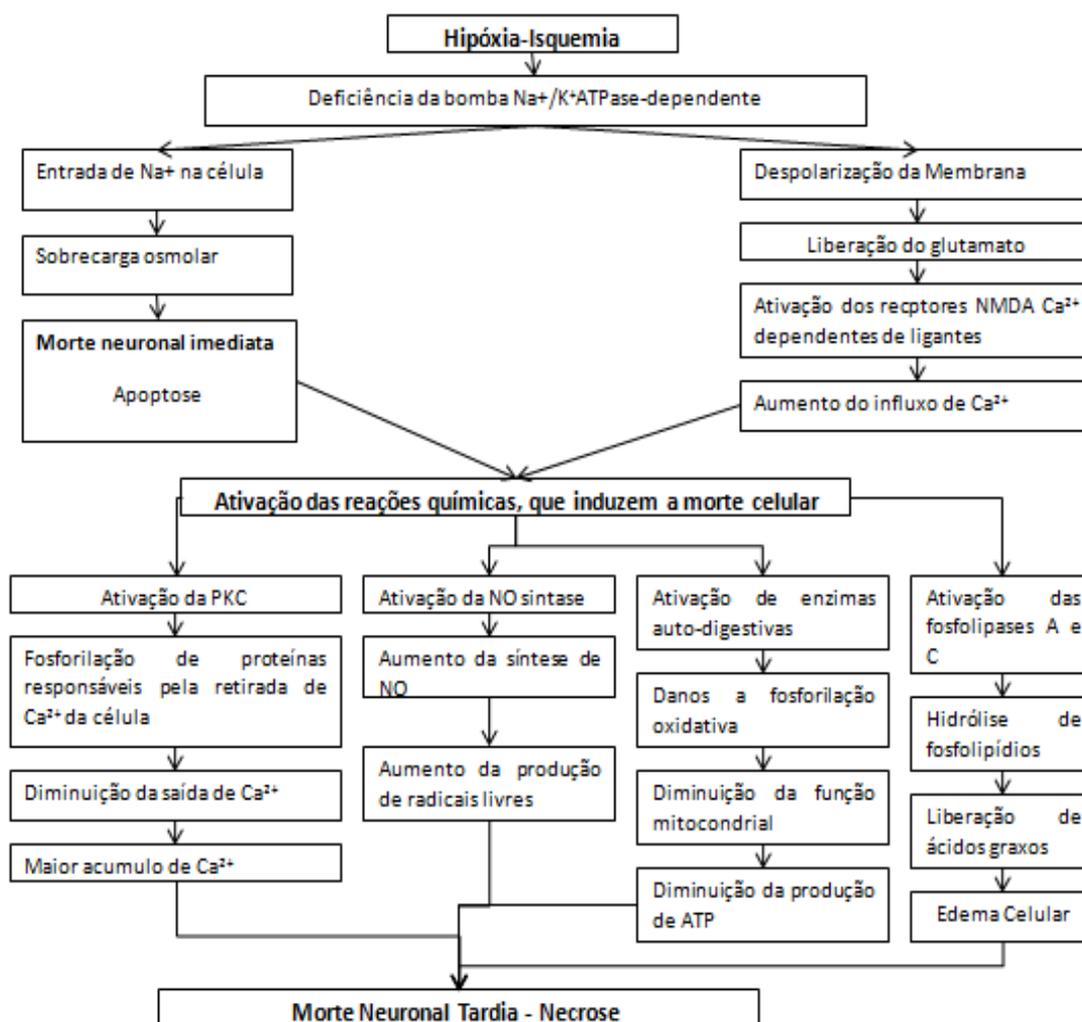


Figura 1 – Esquema ilustrativo da fisiopatologia da encefalopatia hipóxico-isquêmica (modificado de ARAUJO et al., 2008)

1.2 Reperusão

Além dos mecanismos relacionados à lesão hipóxico-isquêmica, também podem ser produzidos danos celulares durante a fase de recuperação do fornecimento de oxigênio e restabelecimento da fosforilação oxidativa. Quando a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial está comprometida e ocorre um retorno repentino da disponibilização de oxigênio, pode ocorrer a produção excessiva de radicais livres que afetam a recuperação mitocondrial, inibindo ainda mais a respiração mitocondrial e tornando impossível a recuperação, ou até mesmo agravando a lesão inicial. Esta é a situação conhecida como lesão de reperusão (MUNIZ; FARIA; VASCONCELOS, 2004; NAKANO; COLLI; ROSELINO, 2002; PRANDINI et al., 2005). Como esse retorno do fluxo sanguíneo oxigenado pode desencadear lesões teciduais intensas, a manutenção de um fluxo sanguíneo reduzido na área isquêmica permite a ocorrência de disfunção celular sem morte eminente, possibilitando uma recuperação celular dependendo do tempo e da intensidade da isquemia (CASTRO E SILVA JR. et al., 2002; DUARTE; CAMPOS; COLLI, 2003).

A reperusão parece não interferir com a função mitocondrial em tecidos cerebrais submetidos a até 30 minutos de isquemia, porém períodos maiores fazem com que a retomada da função mitocondrial não seja completa e o consumo de O_2 mantenha-se abaixo daquele do período pré-isquêmico (DUARTE; CAMPOS; COLLI, 2003; NAKANO; COLLI; ROSELINO, 2002). Os ácidos graxos livres (AGL) se acumulam no tecido cerebral durante a isquemia, enquanto que na fase da reperusão esses AGL sofrem metabolização formando radicais livres que promovem a peroxidação lipídica, que se propaga na forma de uma reação em cadeia autocatalítica (TARDINI et al., 2003).

1.3 Fisiopatologia do modelo

Inúmeros estudos têm mostrado que os diferentes modelos experimentais de hipóxia e/ou isquemia em animais neonatos podem produzir lesões do sistema nervoso central relativamente previsíveis (JOHNSTON et al., 2001; RICE; VANNUCCI; BRIERLEY, 1981), e que estas lesões encefálicas parecem semelhantes às observadas clinicamente em humanos (VANNUCCI, 1990).

No modelo animal de HI de Rice e Vannucci (RICE; VANNUCCI; BRIERLEY, 1981), durante a exposição à condição de hipóxia, os filhotes apresentam hipoxemia combinada com hipocapnia, produzida pela hiperventilação. A hipocapnia compensa a acidose metabólica produzida pela acidose láctica e o pH sistêmico não é alterado significativamente (VANNUCCI; HAGBERG, 2004). A média da pressão arterial sistêmica diminui 25-30% durante a hipóxia e o fluxo sanguíneo cerebral no hemisfério ipsilateral à ligadura da carótida é reduzido em 40-60%. O fluxo sanguíneo cerebral é restaurado a valores controle imediatamente após o regresso às condições de normóxia (VANNUCCI; HAGBERG, 2004).

Danos cerebrais, que podem variar desde uma morte neuronal seletiva até um infarto tecidual generalizado, ou uma combinação de ambos, são uma constatação quase universal nos animais neonatos submetidos ao modelo de HI. A lesão é normalmente restrita ao hemisfério ipsilateral à ligadura e é observada principalmente no córtex cerebral, na substância branca periventricular, no estriado, no tálamo e no hipocampo. Esses danos são raramente observados no hemisfério contralateral (VANNUCCI; HAGBERG, 2004).

As consequências neuropatológicas da lesão ocasionada pela hipóxia-isquemia dependem do período de gestação em que os animais se encontram no momento do parto, assim como da intensidade e da duração do evento hipóxico-isquêmico, podendo levar a deficiências motoras e cognitivas (MCQUILLEN; FERRIERO, 2006).

1.4 Metabolismo energético e transporte de nutrientes no cérebro imaturo

A glicose é um combustível obrigatório para o encéfalo adulto, bem como para o recém-nascido, mas o metabolismo da glicose cerebral no encéfalo imaturo apresenta características que diferem do adulto, em parte conferindo resistência e em parte conferindo vulnerabilidade ao processo de hipóxia-isquemia (CREMER, 1982; NEHLIG; PEREIRA DE VASCONCELOS, 1993). A vulnerabilidade está associada à falha energética provocada pela HI e implica em uma menor funcionalidade de transportadores iônicos, acúmulo de cálcio intracelular, mudanças no padrão de neurotransmissão e, dependendo da gravidade e do tempo de redução no conteúdo de ATP, pode levar a danos ao DNA (HERRERA-MARSCHITZ et al., 2011).

A resistência está associada à baixa taxa metabólica basal no cérebro imaturo, o que pode ser relacionado principalmente com o nível de maturação neuronal e à atividade sináptica na fase de desenvolvimento cerebral. Além disso, os roedores recém-nascidos e os seres humanos recém-nascidos podem facilmente utilizar outros substratos que não a glicose (o lactato e os corpos cetônicos), para satisfazer as necessidades energéticas cerebrais (EDMOND et al., 1985; NEHLIG; PEREIRA DE VASCONCELOS, 1993).

Durante as primeiras duas semanas após o nascimento, os roedores são especialmente cetogênicos. Isso ocorre devido às altas concentrações de lipídeos presentes no leite materno. Os corpos cetônicos presentes no leite materno podem fornecer 60% do combustível energético cerebral durante estas duas semanas de vida (NEHLIG; PEREIRA DE VASCONCELOS, 1993).

O transporte de glicose e de corpos cetônicos da circulação para o encéfalo é mediado por duas famílias de proteínas de membrana, as proteínas transportadoras de glicose da família dos GLUTs, e as proteínas transportadoras de monocarboxilatos (MCT) (VANNUCCI; VANNUCCI, 1997). O GLUT1 e o GLUT3, e o MCT1 e o MCT2 são as principais isoformas desses transportadores presentes no cérebro dos mamíferos (VANNUCCI; HAGBERG, 2004).

O transporte de glicose através da barreira hematoencefálica (BHE) é mediado por uma forma glicosilada de GLUT1 (55 kDa); a forma menos glicosilada de GLUT1 (45 kDa) é expressa no plexo coróide, epêndima, bem como em todos os elementos gliais do cérebro. Já o GLUT3 é o transportador neuronal de glicose (VANNUCCI; VANNUCCI, 1997). No rato, a utilização de glicose cerebral é apenas 10% do valor do adulto durante as primeiras semanas após o nascimento e a expressão dos GLUTs é comparativamente baixa, sendo que ocorre um aumento na expressão de GLUT3 neuronal coincidente com os períodos de maturação neuronal e sinaptogênese (NEHLIG; DE VASCONCELOS; BOYET, 1988). No entanto, os corpos cetônicos fornecem uma proporção significativa de combustível metabólico cerebral durante as primeiras duas semanas de vida do rato e a alta expressão, especialmente de MCT1, na BHE, reflete a utilização preferencial deste substrato energético. Assim, o cérebro imaturo caracteriza-se por uma baixa capacidade para o transporte de glicose e uma alta capacidade de transporte tanto de corpos cetônicos quanto de lactato. Durante situações de hipóxia e hipóxia-isquemia, o encéfalo do neonato aumenta sua dependência da glicólise anaeróbia, confirmando o aumento da utilização da glicose cerebral (BINKOWSKI; WEINMANN, 2015; VANNUCCI; YAGER; VANNUCCI, 1994). No entanto, a baixa concentração de transportadores de glicose no cérebro do rato P7 torna a utilização de glicose cerebral limitada nesta fase do desenvolvimento (VANNUCCI; HAGBERG, 2004).

As concentrações de glicose no cérebro do animal neonato submetido ao modelo de HI caem rapidamente para concentrações quase indetectáveis (apesar do plasma manter concentrações próximas do normal). Essa fase inicial da falha energética cerebral é normalmente observada após 90 minutos de hipóxia-isquemia (YAGER; BRUCKLACHER; VANNUCCI, 1992). A capacidade do neonato de sobreviver a um período de HI mais longo do que o adulto relaciona-se com os níveis reduzidos de consumo de energia, mas a incapacidade para transportar glicose suficiente pela BHE impõe, para o neonato, uma limitação significativa na utilização de glicose cerebral durante a HI (VANNUCCI; HAGBERG, 2004). Estas duas características opostas do neonato, resistência e vulnerabilidade cerebral à HI, não se anulam

completamente em um ambiente pobre em oxigênio e o animal neonato ainda consegue apresentar uma maior resistência ao modelo de HI em comparação ao animal adulto (VANNUCCI; HAGBERG, 2004).

1.5 Via da Akt

A apoptose, ou morte celular programada, é caracterizada como um conjunto distinto de alterações morfológicas e bioquímicas (KUANG et al., 2000). A via PI3K/Akt é uma importante via de sinalização anti-apoptótica e de sobrevivência celular (BRYANT et al., 2006; LI et al., 2015). Em mamíferos, a Akt (também conhecida como proteína cinase B) compreende três membros homólogos conhecidos como PKB alfa (Akt1), PKB beta (Akt2), e PKB gama (Akt3) (FERNANDES et al., 2008). Estas três isoformas compartilham mais de 80% de homologia e são expressas de maneira específica nos tecidos. Assim, as isoformas Akt1 e Akt2 são predominantemente expressas no músculo esquelético, cérebro, coração e pulmão, enquanto a isoforma Akt3 predomina apenas no cérebro e testículo (COFFER; WOODGETT, 1991; JONES et al., 1991). Além da apoptose, a Akt também atua como um regulador crucial de processos celulares como proliferação, diferenciação e metabolismo. A fosforilação e a consequente ativação da Akt podem ser reguladas por vários estímulos, tais como hormônios, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, de maneira dependente da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) (FRANKE et al., 1995).

A ativação da Akt estimula substratos envolvidos na sobrevivência celular e inibe substratos pró-apoptóticos, como Bad e caspase-9, inibindo as vias de apoptose e contribuindo para a sobrevivência celular (CARDONE et al., 1998; KIM et al., 2007; NAIR; OLANOW, 2008).

A maioria dos estudos sobre o envolvimento da proteína Akt na lesão isquêmica observou algum grau de alteração na fosforilação dessa enzima, nos mais variados períodos após a lesão. Os processos de fosforilação/desfosforilação são mecanismos regulatórios que levam à ativação/inativação da Akt (KITAGAWA et al., 2002a). Entretanto, outra forma

de inativação da enzima é sua clivagem pela caspase 3, que anula os efeitos anti-apoptóticos da Akt (FRANÇOIS; GRIMES, 1999).

A ativação da Akt promove sobrevivência através de diferentes ações celulares. Uma ação que pode mediar os efeitos neuroprotetores da Akt durante eventos hipóxicos é o aumento da captação de glicose pelas células afetadas (LI et al., 2015).

1.6 Progesterona

A ideia de que os esteroides gonadais controlam apenas as funções reprodutivas e de que os esteroides produzidos pelas adrenais regulam apenas a homeostase dos fluidos e a resposta adaptativa ao estresse tem mudado completamente nos últimos anos (SCHUMACHER et al., 2007). Diversos estudos experimentais têm demonstrado múltiplas ações da progesterona, do estradiol, dos androgênios, dos glicocorticoides e dos mineralocorticoides no sistema nervoso central (SNC) e sua influência no funcionamento de neurônios e de células gliais (SCHUMACHER et al., 2007). Atualmente, sabe-se que o SNC não é alvo apenas da ação endócrina exercida por esteroides sintetizados em tecidos periféricos, mas também por uma ação como neurotransmissor exercida por esses esteroides, quando são chamados de neuroesteroides (BAULIEU, 1998).

Vários esteroides exógenos ou sintéticos também podem modificar a atividade do sistema nervoso. Por isso, foi criado o termo "esteroides neuroativos" (PAUL; PURDY, 1992) referindo-se a todos os esteroides capazes de regular as funções neurais, incluindo hormônios esteroides, neuroesteroides e esteroides sintéticos (MELCANGI; GARCIA-SEGURA; MENSAH-NYAGAN, 2008).

A progesterona é um neuroesteroide e pode ser sintetizada a partir do colesterol ou a partir de precursores esteroides importados de estruturas periféricas que são metabolizados "in situ" (DUBROVSKY, 2006; KUMRAL et al., 2003; SHAHROKHI et al., 2010), no sistema nervoso central e periférico, nas células gliais e em neurônios (CHEN et al., 2008; STEIN, 2008). A

progesterona também é considerada um esteroide neuroativo, sendo capaz de modular a atividade neural (DUBROVSKY, 2006) e de regular diversas outras funções do organismo, como desenvolvimento, diferenciação, metabolismo e reprodução de fêmeas de várias espécies (PLUCHINO et al., 2006).

A ação da progesterona produz tanto efeitos genômicos como efeitos não-genômicos (RUPPRECHT, 2003). Sendo um esteroide, a progesterona atravessa a membrana plasmática e atua em receptores intracelulares, produzindo seus efeitos genômicos clássicos, de longo-prazo (minutos a horas). Os receptores de progesterona atuam como fatores de transcrição, regulando a expressão de genes de redes neurais para o início ou para a manutenção de respostas fisiológicas (MANI, 2008). Classicamente, esses receptores se apresentam sob duas isoformas, os receptores de progesterona A (PRA) e os receptores de progesterona B (PRB), que diferem em relação a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua resposta à progesterona, com o PRA sendo um repressor do PRB (MANI, 2008).

Por outro lado, a progesterona também pode produzir efeitos não-genômicos, que podem ser observados de milissegundos até poucos segundos, ou seja, são muito mais rápidos do que os efeitos clássicos. Muitos desses efeitos são mediados por metabólitos da progesterona, como por exemplo, a alopregnanolona. Esses efeitos incluem a modulação da excitabilidade neuronal através de ações na superfície celular e efeitos moduladores sobre a função e composição de alguns receptores, como por exemplo, os receptores serotoninérgicos e o receptor GABA_A (ARBO et al., 2014; RUPPRECHT, 2003).

Este efeito prejudicial da progesterona pode ser explicado pelos efeitos da ativação do receptor GABA_A cuja ativação também é dependente da idade, como explicado por Tsuji e colaboradores (TSUJI et al., 2012). Em uma fase inicial da maturação encefálica, os neurônios têm concentrações intracelulares mais elevadas de cloreto (Cl⁻), que conduzem a um efluxo de Cl⁻ e às ações excitatórias do GABA nos neurônios imaturos. A redução progressiva da concentração de Cl⁻ intracelular durante o desenvolvimento precoce é a chave da alteração da ação do GABA de excitatório (despolarização) para inibitório (hiperpolarização), o que se mantém por toda a vida do animal (BEN-ARI et al.,

2007). O momento desta mudança depende da espécie, sexo, estrutura cerebral e tipo neuronal. Em ratos Wistar, este momento ocorre entre P8 e P12 no hipocampo (BEN-ARI et al., 2007). Especula-se que a lesão produzida pela hipóxia-isquemia poderia atrasar o desenvolvimento do receptor GABA_A ou agravar outros mecanismos, além da ação do GABA, que podem ocorrer em animais imaturos (TSUJI et al., 2012).

Sabe-se que a progesterona ativa algumas vias de sinalização envolvidas com estímulos pró-sobrevivência em diferentes áreas encefálicas, promovendo a fosforilação da Akt e a fosforilação da Erk (componente da via das proteínas cinases ativadas por mitógenos - MAPK) (GUERRA-ARAIZA et al., 2009; KAUR et al., 2007). Essas cinases participam das ações da progesterona envolvendo o controle da diferenciação e da função neuronal e do comportamento reprodutivo, além das ações de neuroproteção (KAUR et al., 2007). A progesterona pode, ainda, reduzir a expressão e a atividade da enzima caspase-3, que é considerada a caspase efetora central e final, sendo responsável pela maior parte da apoptose biológica. Seu efeito preventivo ao dano cerebral e seu mecanismo de ação têm atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores (WANG et al., 2013).

Há razões para se pensar que o neuroesteroide progesterona tem um forte potencial para o tratamento da HI neonatal já que o mesmo apresenta efeitos benéficos em pesquisas relacionadas com lesão cerebral traumática, lesão cerebral isquêmica e outros modelos de lesão do sistema nervoso central (SNC) de adultos (KAORE et al., 2012; LUOMA; STERN; MERMELSTEIN, 2012; STEIN, 2011).

Os mecanismos moleculares que ativam a cascata de lesão isquêmica no cérebro adulto são semelhantes aos ativados pela HI em animais neonatos (PETERSON et al., 2015). Em ambos os modelos de lesão, há edema cerebral, infiltração de macrófagos e ativação microglial, levando a uma resposta inflamatória, excitotoxicidade e morte celular (SAYEED; STEIN, 2009; THORNTON et al., 2012). À medida que a cascata de lesão progride, pode ocorrer desmielinização, formação de radicais livres e indução de apoptose, o que significa mais dano e, conseqüentemente, morte celular (PETERSON et al., 2015). Alguns autores já demonstraram que a progesterona também pode

diminuir o edema cerebral, diminuir a peroxidação lipídica, diminuir a apoptose e anormalidades neuronais, promover a estabilidade da BHE, além de melhorar a cognição após danos cerebrais (AGGARWAL et al., 2008; SARKAKI et al., 2013). A progesterona também pode diminuir o edema, a inflamação, a excitotoxicidade do glutamato, os radicais livres e a apoptose em lesões de encéfalos adultos (GUO et al., 2006; ISHRAT et al., 2010; STEIN, 2011). No entanto, Tsuji e colaboradores (TSUJI et al., 2012) relataram que a progesterona e a alopregnanolona teriam um efeito agravante na lesão cerebral hipóxico-isquêmica em ratos imaturos. Essa diferença de resultados na literatura pode ser relacionada à variação de doses utilizadas de progesterona, diferença de idade dos animais e o momento em que é administrado o neuroesteroide nos diferentes trabalhos (PETERSON et al., 2015; TSUJI et al., 2012; WANG et al., 2010).

O possível mecanismo neuroprotetor da progesterona ainda não está completamente esclarecido. Estudos sobre o efeito neuroprotetor da progesterona têm focado principalmente nos danos encefálicos em ratos adultos, enquanto aqueles em ratos recém-nascidos são raramente relatados (WANG et al., 2013). As concentrações séricas da progesterona e da alopregnanolona, principal metabólito da progesterona, em uma gestante, tendem a aumentar durante a gravidez, mostrando uma elevação em torno de 10 a 100 vezes no momento do parto (LUIZI et al., 2000). Já foi demonstrado que a concentração de alopregnanolona encontrada no cordão umbilical é praticamente a mesma daquela encontrada no sangue materno (HILL et al., 2000). Além disso, esses esteroides têm a característica de cruzar facilmente a BHE (LI et al., 2013). O encéfalo do rato recém-nascido também está exposto a altas concentrações de progesterona e alopregnanolona (GROBIN et al., 2003). Estes dois neuroesteroides são fornecidos pela circulação materna, além de serem produzidos pelo encéfalo do feto. Por outro lado, as concentrações de progesterona e de alopregnanolona diminuem muito no encéfalo do neonato após o nascimento, devido à perda do fornecimento de sangue materno (WANG et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

A hipóxia neonatal ainda desperta grande interesse científico e político-social, uma vez que continua situando-se entre as causas mais frequentes de óbito neonatal no mundo, além de deixar sequelas graves nos sobreviventes, requerendo ações preventivas(VANNUCCI; HAGBERG, 2004).

Muito do conhecimento atual sobre os mecanismos de lesão hipóxico-isquêmica encefálica, bem como potenciais intervenções terapêuticas, deriva de uma extensa literatura sobre modelos experimentais de isquemia em ratos adultos (AGGARWAL et al., 2008; GIBSON; COOMBER; RATHBONE, 2009). No entanto, a aplicação direta dos resultados obtidos no encéfalo adulto para o animal neonatal tem sido dificultada por um paradoxo, no qual o cérebro imaturo tem sido considerado mais “resistente” aos efeitos prejudiciais da hipóxia e da HI. Além disso, um insulto hipóxico-isquêmico ou hipóxia no encéfalo em desenvolvimento terá um impacto sobre a maturação subsequente, com consequências duradouras para o sistema nervoso adulto (VANNUCCI; HAGBERG, 2004). Estudos avaliando as ações da progesterona durante eventos de hipóxia-isquemia neonatal são escassos, mas seriam de relevância essencial para o planejamento de intervenções eficazes para o feto e o recém-nascido que sofreram eventos hipóxico-isquêmicos encefálicos. Portanto, este estudo aborda possíveis efeitos neuroprotetores da progesterona no encéfalo de ratos Wistar submetidos ao modelo de HI neonatal e busca esclarecer o envolvimento da via da Akt e da ativação da caspase-3 nesses efeitos.

3. HIPÓTESE

Baseado no acima exposto e nos dados da literatura, a hipótese do presente projeto foi de que a progesterona administrada em ratos neonatos submetidos ao modelo de HI tem efeitos neuroprotetores, reduzindo o volume da lesão encefálica causada pela HI. Para isso, entre os efeitos múltiplos da progesterona, se propõe que a mesma seja capaz de ativar vias de sobrevivência celular, como a via da Akt, e de inibir vias de apoptose, como a via das caspases.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi investigar o possível efeito neuroprotetor da progesterona no encéfalo de ratos neonatos submetidos ao modelo de HI, procurando identificar os mecanismos de ação do hormônio sobre vias de sobrevivência ou morte celular.

4.2. Objetivos específicos

-Determinar o grau de dano encefálico provocado pela HI neonatal e verificar se a progesterona reduz este dano. Para isso, foi avaliado o volume da lesão no hemisfério ipsilateral à mesma;

-Determinar o efeito da HI neonatal e a ação da progesterona sobre processos associados à sobrevivência ou morte celular no hipocampo dos animais dos diferentes grupos experimentais. Para isso, foram avaliadas a expressão da proteína Akt (proteína com efeitos anti-apoptóticos) e da proteína caspase 3 (proteína pró-apoptótica).

-Investigar se o momento de administração da progesterona, antes e/ou depois da HI, pode alterar os efeitos desse neuroesteroide neste modelo experimental.

-Verificar se a lesão HI pode provocar efeito sistêmico, como alteração do peso corporal dos animais neonatos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 120 ratos Wistar machos neonatos com 7 dias de idade (P7) e 15 mães. Os animais foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Foi realizada a implantação dos filhotes machos nas caixas, para que cada caixa contivesse sempre uma rata mãe e oito filhotes machos. Após o recebimento dos animais do CREAL, os mesmos foram mantidos nos biotérios setoriais da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os filhotes foram mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310 mm, juntamente com suas respectivas mães (8 filhotes machos por caixa, juntamente com as respectivas mães). O assoalho das caixas foi recoberto com maravalha. As mães receberam alimentação e água *ad libitum* e os animais foram mantidos sob períodos de 12h luz/12h escuro, sob temperatura média de 22°C.

5.2 Considerações Éticas

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a resolução normativa nº 12, de 20 de setembro de 2013 e a resolução normativa nº13, de 20 de setembro de 2013 do CONCEA 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)* do *National Research Council*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS (projeto número 26669) e pela CEUA/HCPA (projeto número 140578).

5.3 Anestesia

Para a anestesia, os animais receberam isoflurano, liberado por cone nasal, conforme descrito por Smith e colaboradores (SMITH et al., 2004), com pequenas modificações: 5% para a indução e 3% para a manutenção, com o oxigênio (5L/min) como gás de transporte. A concentração de isoflurano administrada foi controlada com a utilização de um vaporizador calibrado específico para isoflurano (marca HB). Após a anestesia, os animais neonatos foram submetidos ao procedimento de HI neonatal.

5.4 Hipóxia-isquemia neonatal

O procedimento de HI neonatal foi baseado no modelo de Rice-Vannucci (Rice, Vannucci et al. 1981). No P7, sob anestesia, os animais foram submetidos à cirurgia para a oclusão da artéria carótida comum esquerda. Foi realizada incisão longitudinal dois milímetros à esquerda da traqueia, seguida por divulsão dos músculos presentes na área para localização da carótida comum esquerda. A carótida comum esquerda foi isolada e ocluída permanentemente por meio de nó com fio cirúrgico (seda 4.0). Após a oclusão da carótida, foram realizados dois nós internos (seda 4.0) na pele do animal, para que o ferimento realizado pelo corte não ficasse exposto, diminuindo assim as chances de infecção e melhorando a cicatrização. Após a cirurgia, os filhotes foram deixados com as mães durante 1h-2h para recuperação e então foram alocados em uma câmara para hipóxia (n=6 animais por câmara) e expostos à atmosfera hipóxica utilizando uma mistura certificada de 8% O₂/92% N₂ por 90 minutos a 33°C (Figura 2). A umidade dentro da câmara foi mantida em torno de 70%. A câmara foi colocada dentro de uma incubadora (marca Fanem, modelo C186TS) para manter a temperatura adequada. A temperatura e a umidade foram verificadas com a utilização de um termo-higrômetro. O fluxo de gás que foi infundido para a câmara de hipóxia foi de 5L/min. Terminada a exposição, os filhotes foram retirados da câmara hipóxica e colocados em

recuperação, novamente em uma caixa sob aquecimento, por aproximadamente 30 minutos e então retornaram às suas mães.

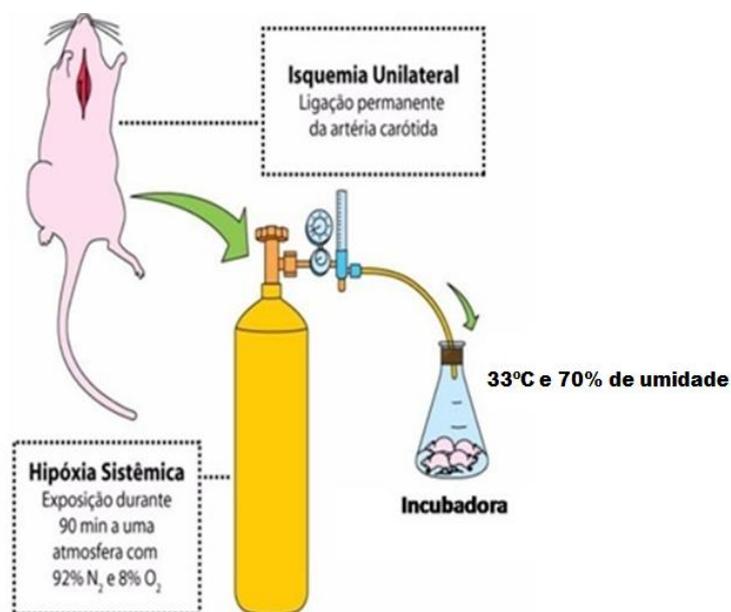


Figura 2 - Procedimento de hipóxia-isquemia de Levine (LEVINE, 1960), modificado, que se utiliza da combinação de hipóxia e isquemia.

5.5 Grupos experimentais e administração de progesterona

A administração de progesterona foi realizada de acordo com o modelo proposto por Tsuji e colaboradores (TSUJI et al., 2012). A progesterona (Sigma) foi dissolvida em ciclodextrina 22,5% (2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina) e foi administrada na dose de 10 mg/kg de peso corporal (na concentração de 5 mg/mL).

Os animais foram divididos em cinco grupos: SHAM, HI, HI+PROG-PRÉ (PRÉ), HI+PROG-PÓS (PÓS), HI+PROG-PRÉ/PÓS (PP). Com exceção do grupo SHAM, os animais de todos os demais grupos foram submetidos ao modelo de HI.

GRUPO PP: a progesterona foi administrada em três momentos nos animais do **grupo PP**: a primeira administração do hormônio foi realizada

imediatamente antes do início da HI, para reproduzir, nos ratos P7, os níveis fisiológicos pré-natais do hormônio. Essa primeira administração, pré-HI, foi realizada intraperitonealmente (com os animais previamente anestesiados), para permitir a rápida absorção do hormônio. As duas administrações seguintes foram realizadas 6h e 24h após o início da hipóxia, para simular, nos ratos P7, o tratamento clínico de crianças recém-nascidas. Essas duas injeções, pós-HI, foram realizadas por via subcutânea, para permitir uma absorção mais gradual do hormônio.

GRUPO PRÉ: nos animais do **grupo PRÉ** a administração de PROG foi realizada uma única vez, intraperitonealmente, antes do início da isquemia. Os animais do grupo PRÉ receberam injeções de veículo (ciclodextrina) por via subcutânea 6h e 24h após o início da hipóxia (para manter o mesmo número de injeções do grupo PP).

GRUPO PÓS: os animais do **grupo PÓS** receberam a injeção de progesterona apenas após o procedimento de HI. Nesses animais foi realizada apenas a injeção do veículo (ciclodextrina) antes do procedimento de HI. A administração de progesterona ocorreu após o evento hipóxico-isquêmico: 6h e 24h após o início da hipóxia, por via subcutânea.

GRUPO HI: os animais do **grupo HI** foram submetidos ao modelo de HI, mas receberam apenas o veículo (ciclodextrina), ao invés da administração de progesterona. O veículo foi administrado em três momentos: antes da HI, 6h após o início da HI e 24 após o início da HI (para simular o padrão de três injeções dos demais grupos). Para mimetizar os demais grupos, a via de administração do veículo foi a intraperitoneal para a administração feita antes do procedimento de HI e subcutânea para as administrações realizadas após o evento isquêmico.

GRUPO SHAM: os animais do **grupo SHAM** foram submetidos à cirurgia fictícia (mas não sofreram o processo de isquemia, ou seja, não tiveram a artéria carótida comum esquerda ocluída) e receberam a injeção do veículo (ciclodextrina), em três momentos: antes da HI, 6h após o início da HI e 24 após o início da HI (para simular o padrão de três injeções dos demais grupos). Para mimetizar os demais grupos, a via de administração do veículo

foi a intraperitoneal para a administração feita antes do procedimento de HI e subcutânea para as administrações realizadas após o evento isquêmico.

Os animais de todos os cinco grupos experimentais foram sacrificados 24h após a administração da terceira injeção (de progesterona ou de veículo). A Figura 3 resume o desenho experimental, utilizando o grupo HI como exemplo.

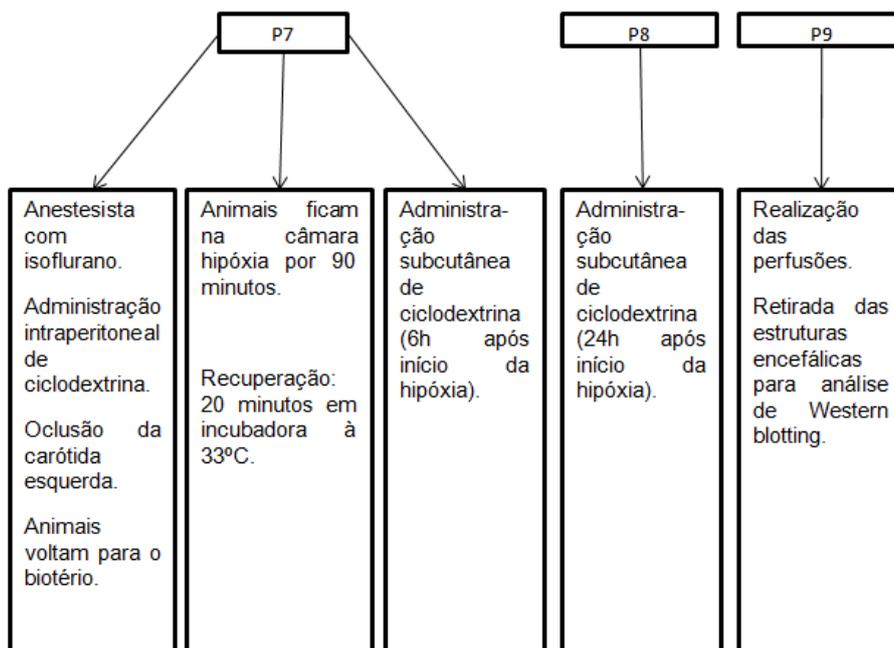


Figura 3 – Ilustração dos procedimentos realizados para os animais do grupo HI.

5.6 Pesagem dos animais

Ao longo dos procedimentos experimentais, os animais foram pesados em uma balança em quatro momentos distintos:

-Peso 1: 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 esquerda;

-Peso 2: peso verificado 6 horas após o início da hipóxia (ou seja, 6h após a colocação do animal na câmara de hipóxia), antes de ser administrada a segunda injeção (progesterona ou veículo, de acordo com o grupo experimental);

-Peso 3: peso verificado 24 horas após o início da hipóxia (ou seja, 24h após a colocação do animal na câmara de hipóxia);

-Peso 4: peso verificado 48 horas após o início da hipóxia (ou seja, 48h após a colocação do animal na câmara de hipóxia), antes do sacrifício do animal para a coleta dos tecidos.

5.7 Cálculo do volume de lesão

O volume da lesão foi calculado conforme Taniguchi e Andreasson (TANIGUCHI; ANDREASSON, 2008) e Sun e colaboradores (SUN et al., 2015). Para a verificação do volume da lesão, os animais foram anestesiados profundamente com isoflurano e perfundidos. Para o procedimento de perfusão os animais anestesiados foram submetidos à toracotomia para a exposição do coração. A seguir, um cateter foi introduzido através do ventrículo esquerdo até atingir a luz da aorta. Foi feito um pequeno corte no átrio direito para permitir 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. 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. 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 ambiente e, em seguida, fixadas em paraformaldeído 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. Cada área de interesse (detalhadas abaixo) foi circundada com o auxílio do mouse do computador. Para cada

imagem foram delimitadas três áreas: a área da lesão (área não corada pelo TTC no hemisfério ipsilateral), a área total do hemisfério ipsilateral e a área total do hemisfério contralateral (Figura 4).

Para determinar o **volume total do infarto** a área infartada de cada fatia foi multiplicada pela espessura de corte (3 mm). **A porcentagem do volume de infarto relativo ao hemisfério ipsilateral** foi calculada pela soma do volume de infarto de todas as fatias, com o resultado sendo dividido pelo volume total do hemisfério ipsilateral à isquemia e então multiplicado por 100 (TANIGUCHI; ANDREASSON, 2008). O chamado **volume de área não infartada** (correspondente ao volume da área não-lesionada) foi determinado pela subtração do volume total do hemisfério ipsilateral pelo volume do infarto.

Sun e colaboradores (SUN et al., 2015) descrevem que é necessário corrigir o volume do infarto ocasionado no hemisfério ipsilateral à isquemia pelo volume do hemisfério contralateral em função de um possível aparecimento de edema no hemisfério ipsilateral. Assim, esses autores sugerem a utilização do **volume do infarto corrigido (%)**, o qual é calculado pela seguinte equação:

$$\left[\frac{\text{volume total do hemisfério contralateral} - \text{volume de células vivas no hemisfério ipsilateral}}{\text{volume total do hemisfério contralateral}} \right] \times 100$$



0,5 cm

Figura 4 – Imagem representativa de corte do encéfalo no qual o material corado em vermelho representa as células vivas, enquanto a área em branco representa a lesão produzida pelo modelo. Barra de calibração: 0,5 cm.

5.8 Western blotting

Para os experimentos de *Western blotting*, os hipocampos foram rapidamente retirados após a decapitação dos animais, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior homogeneização. As áreas ipsilateral e contralateral à lesão hipóxico-isquêmica foram processadas separadamente. Quarenta μg de proteína das amostras foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram processadas para imunodeteção com os anticorpos primários contra as proteínas de interesse: anti-fosfo-Akt (1:1000, Santa Cruz) e anti-caspase-3 (1:2000, Santa Cruz). Os resultados foram normalizados pela expressão da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (caspase3/GAPDH) ou Akt basal (fosfo-Akt/Akt basal). As concentrações utilizadas dos anticorpos anti-GAPDH (Milipore) e anti-Akt basal (Santa Cruz) foram de 1:1000. Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários acoplados à peroxidase: IgG anti-camundongo (1:10000, Milipore) para a GAPDH e IgG anti-coelho (1:10000, Milipore) para a fosfo-Akt, a Akt basal e a caspase-3. Após a incubação com os anticorpos secundários específicos descritos acima as membranas foram reveladas em sistema de quimiluminescência e as autorradiografias obtidas foram analisadas densitometricamente.

5.9 Análise estatística

Para as comparações entre os cinco grupos experimentais foi utilizado o teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey. Para a comparação dos hemisférios ipsilateral e contralateral dentro de um mesmo grupo utilizou-se o teste T de Student para amostras pareadas (foi realizado o pareamento dos hemisférios ipsilateral e contralateral do mesmo animal). Para a comparação da expressão das proteínas p-Akt e caspase-3 entre os

hemisférios ipsilateral e contralateral (agrupando os hemisférios de todos os animais submetidos à HI), utilizou-se o teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas. O nível de significância foi de 0,05.

6. RESULTADOS

6.1 Mortalidade

Para a realização deste estudo foram utilizados 120 ratos Wistar de 7 dias (P7), sendo que foi encontrada uma mortalidade de 20,83% do total dos animais (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de animais neonatos utilizados e mortalidade

	Animais (mortos/total)	Mortalidade (%)
Total	25/120	20,83

6.2 Peso corporal

A primeira medida dos pesos dos animais, realizada imediatamente antes do início do procedimento de HI, não mostrou diferença significativa entre os grupos (Figura 5). Entretanto, o peso dos animais dos grupos PRÉ e PP foi reduzido 6h após o início da hipóxia em comparação com o grupo SHAM (Figura 6). Esse mesmo resultado foi observado na verificação realizada 24h após o início da hipóxia (Figura 7). Na última pesagem, realizada antes do sacrifício, ou seja, 48h após o início da hipóxia, a média dos pesos dos animais de todos os grupos experimentais submetidos à HI (tratados ou não com progesterona) foi menor do que o peso dos animais do grupo SHAM (Figura 8).

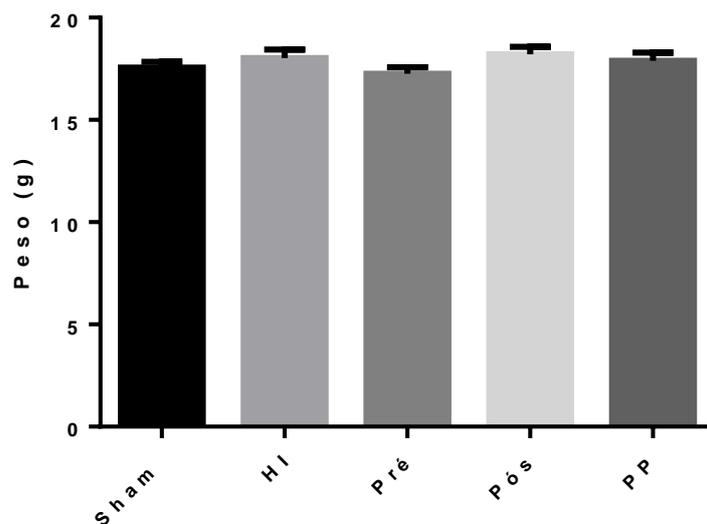


Figura 5 – Peso dos animais imediatamente antes do início do procedimento de HI (Peso 1). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±EPM. Os resultados não mostram diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

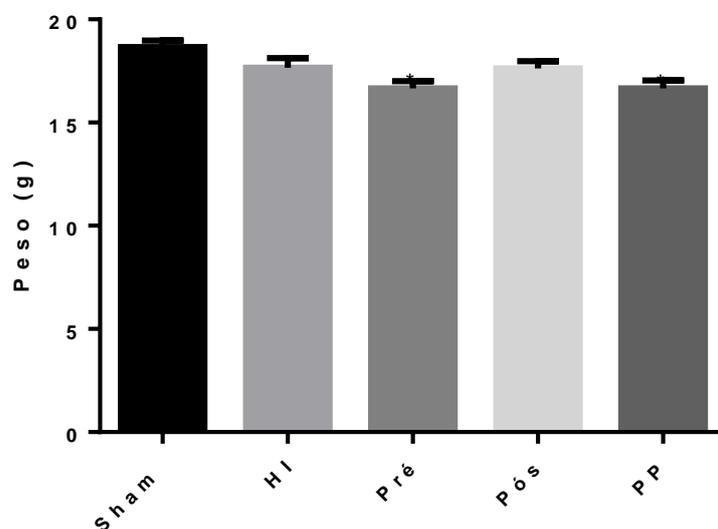


Figura 6 – Peso dos animais 6 horas após o início da hipóxia (Peso 2). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±EPM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo SHAM ($p<0,05$).

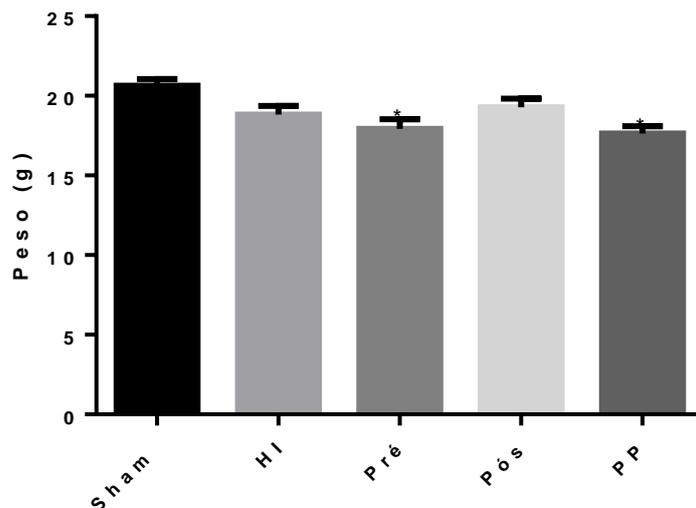


Figura 7 – Peso dos animais 24 horas após início da hipóxia (Peso 3). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±EPM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo SHAM ($p<0,05$).

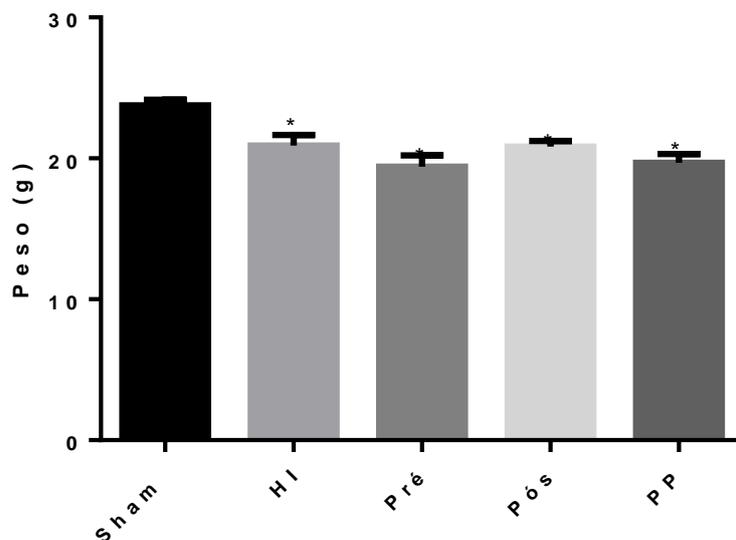


Figura 8 – Peso dos animais 48 horas após o início da hipóxia (Peso 4). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±EPM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo SHAM ($p<0,05$).

6.3 Volume do infarto

A Figura 9 é uma figura representativa das imagens digitalizadas dos cortes corados com TTC dos encéfalos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Pode ser observado que, com exceção do grupo SHAM, todos os demais grupos apresentaram uma área cerebral lesionada (área não corada das figuras). Essas imagens foram analisadas para cada animal, para a obtenção dos resultados apresentados nas figuras 10-14.

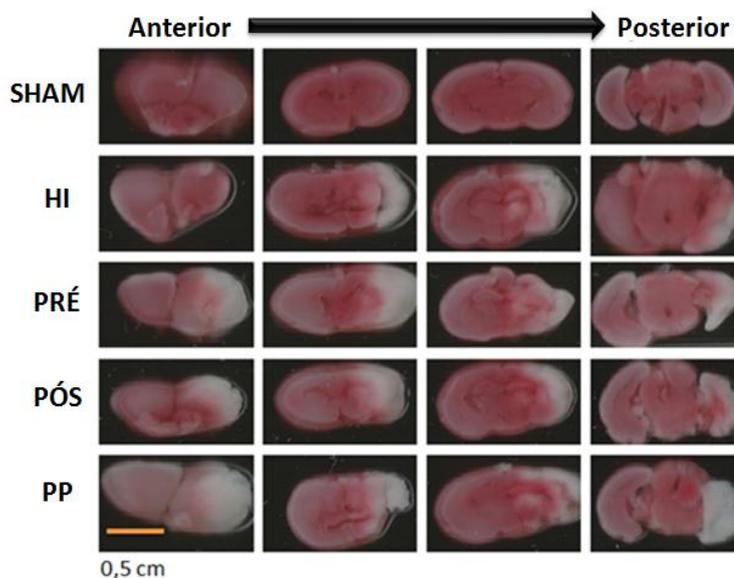


Figura 9 - Imagens digitalizadas das fatias do encéfalo de animais de cada um dos grupos experimentais. As fatias foram previamente coradas com TTC. A área vermelha representa a área não infartada e a área branca a região do infarto. A partir da análise dessas áreas foram produzidos os resultados apresentados nas figuras 10-14. Barra de calibração: 0,5 cm.

Os dados obtidos para o volume total do infarto mostram uma diferença significativa entre todos os grupos submetidos ao procedimento de hipóxia-isquemia em comparação ao grupo SHAM, no qual foi realizada apenas uma cirurgia fictícia e no qual os animais não foram submetidos à hipóxia. No entanto, pode-se observar que os grupos tratados com progesterona (PRÉ, PÓS e PP) não apresentaram redução ou aumento do volume de lesão em relação ao grupo HI (Figura 10).

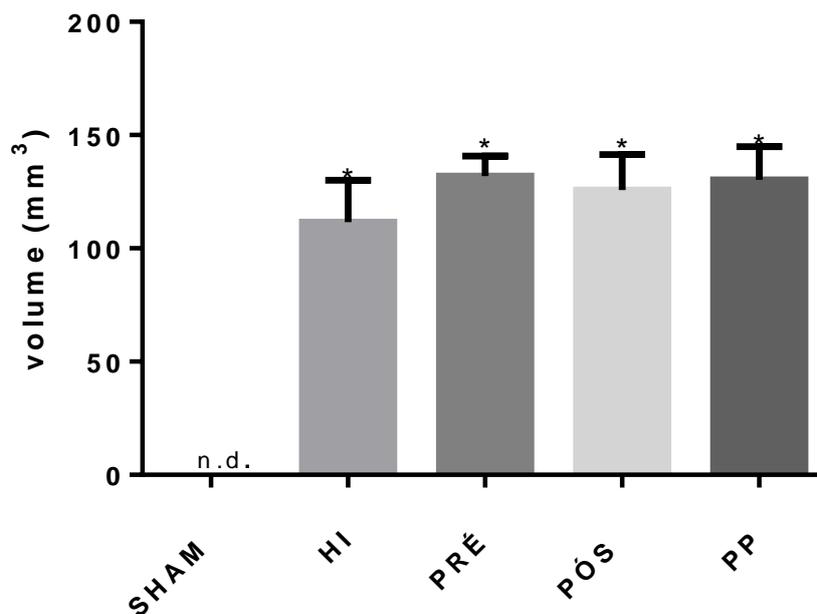


Figura 10 - Volume total do infarto no hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±EPM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$). n.d.: não detectável.

Os dados referentes à porcentagem do volume de infarto relativo ao hemisfério ipsilateral à isquemia mostraram uma diferença significativa de todos os grupos submetidos à HI em relação ao grupo SHAM. Entretanto, a análise desses resultados mostrou que não houve diferenças com significância estatística entre os grupos lesionados (Figura 11).

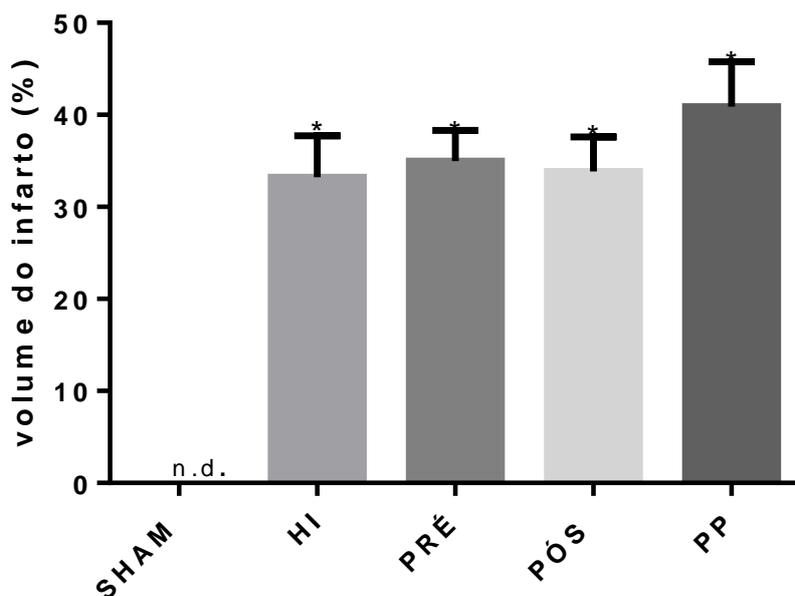


Figura 11 - Porcentagem do volume de infarto relativo ao hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±EPM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$). n.d.: não detectável.

6.4. Volume da área não infartada

O volume da área não infartada também apresentou diferença significativa entre o grupo SHAM e os demais grupos experimentais. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos submetidos à HI (Figura 12).

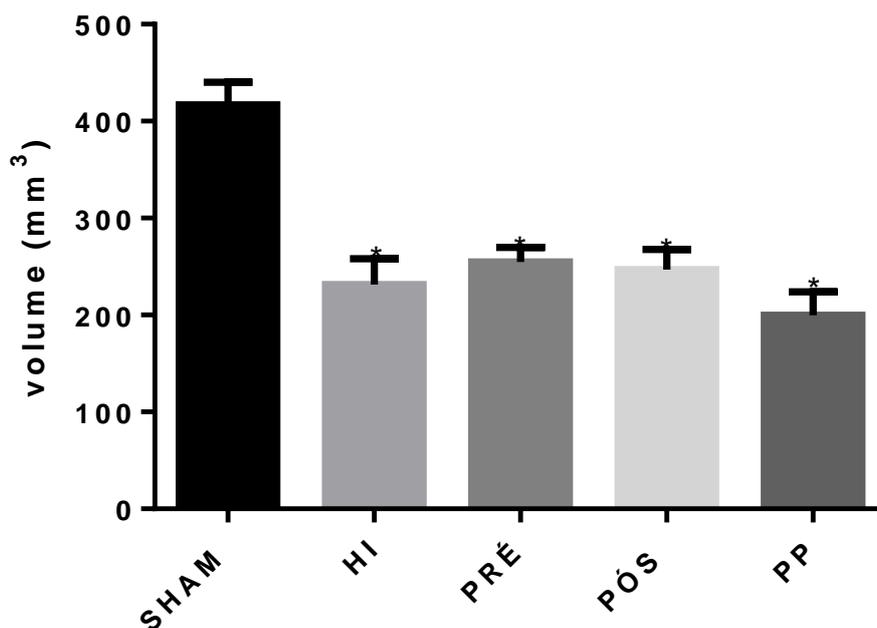


Figura 12 - Volume da área não infartada no hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±EPM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$).

6.4 Volume do infarto corrigido (%)

A Figura 13 apresenta os dados referentes ao volume de infarto corrigido. Houve diferença significativa entre os grupos lesionados em relação ao grupo SHAM. Entretanto, não houve diferença no volume de infarto corrigido entre os grupos submetidos à HI.

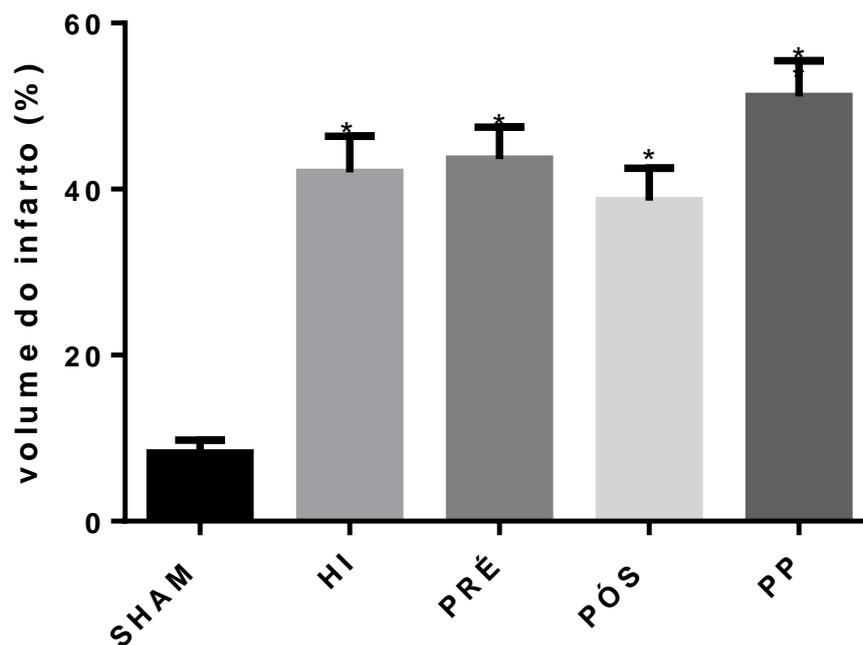


Figura 13 - Volume de infarto corrigido (%). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±EPM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$).

6.5 Comparação dos hemisférios

Partindo do pressuposto de que os hemisférios cerebrais esquerdos e direitos de animais saudáveis apresentam pequenas diferenças em seu volume, foi realizada uma comparação do volume total dos dois hemisférios dentro de cada um dos grupos de animais lesionados. Foi possível observar uma diminuição do volume do hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea, em relação ao hemisfério contralateral, em todos os grupos experimentais submetidos ao modelo de HI, independente do tratamento. Os dados estão representados na Figura 14.

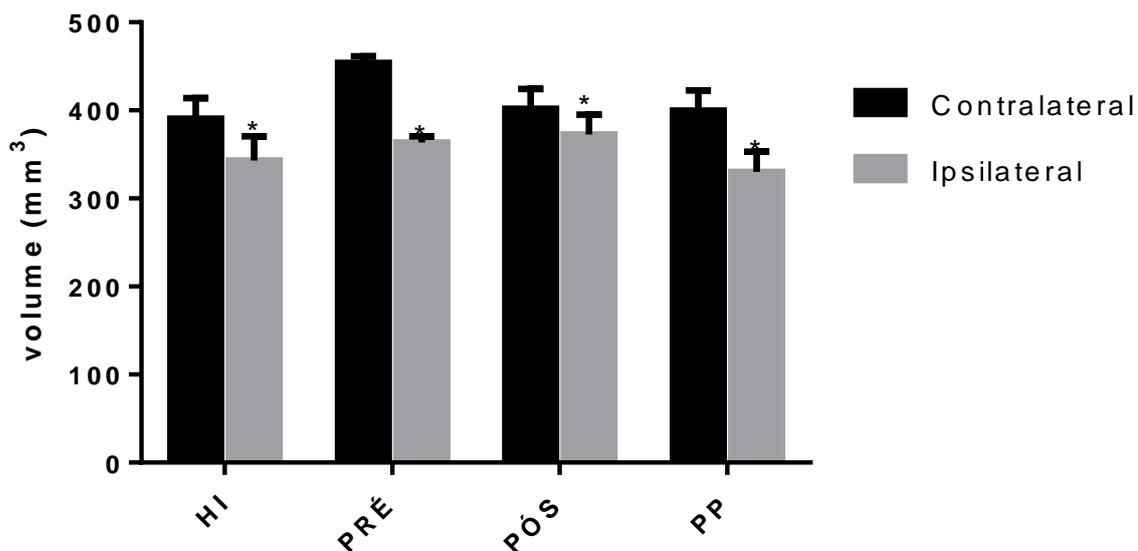


Figura 14 - Comparação do volume total dos hemisférios contralateral e ipsilateral à isquemia carotídea dentro de cada grupo experimental. Os dados foram analisados pelo teste T de Student para amostras pareadas. Os dados foram expressos como média±EPM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao hemisfério contralateral ($p < 0,05$).

6.6 p-Akt e caspase-3

Os resultados apresentados na figura 15 mostram a expressão da p-Akt no hipocampo contralateral e ipsilateral à isquemia dentro de cada grupo experimental, considerando a relação p-Akt/Akt basal. Para esta análise foi utilizado teste T de Student para amostras pareadas. Os dados não apresentaram diferenças significativas. Outra análise realizada foi ANOVA de uma via para comparar a concentração de p-Akt entre os grupos, na qual não se identificou diferença estatística ($p = 0,07$). Nesta avaliação foi utilizado um n de 5 animais por grupo.

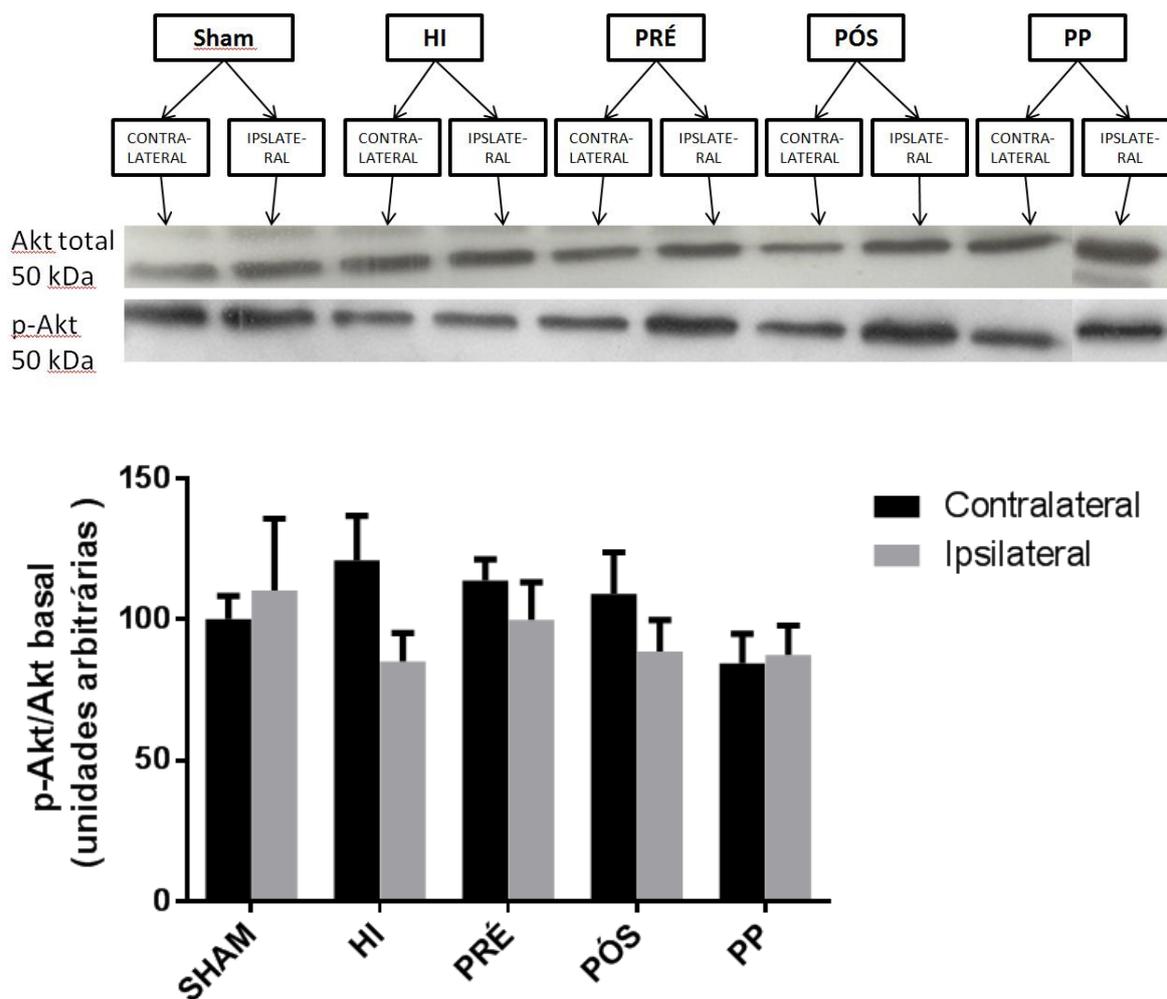


Figura 15 - Comparação da expressão da p-Akt entre os grupos experimentais. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±EPM. As imagens acima do gráfico são bandas representativas de cada grupo experimental mostrando o hemisfério contralateral e ipsilateral. Os dados não apresentaram diferença estatística significativa. A Akt basal foi usada como normalizadora da carga de proteína adicionada (p-Akt/Akt basal).

A figura 16 mostra a expressão de caspase-3 no hipocampo comparando o hemisfério contralateral e ipsilateral à isquemia dentro do mesmo grupo experimental. Para esta análise foi utilizado o teste T de Student para amostras pareadas. A análise dos dados não apresentou diferença significativa. Outra análise realizada foi ANOVA de uma via para comparar a

expressão proteica de caspase-3 entre os grupos. No entanto também não foram identificadas diferenças significativas.

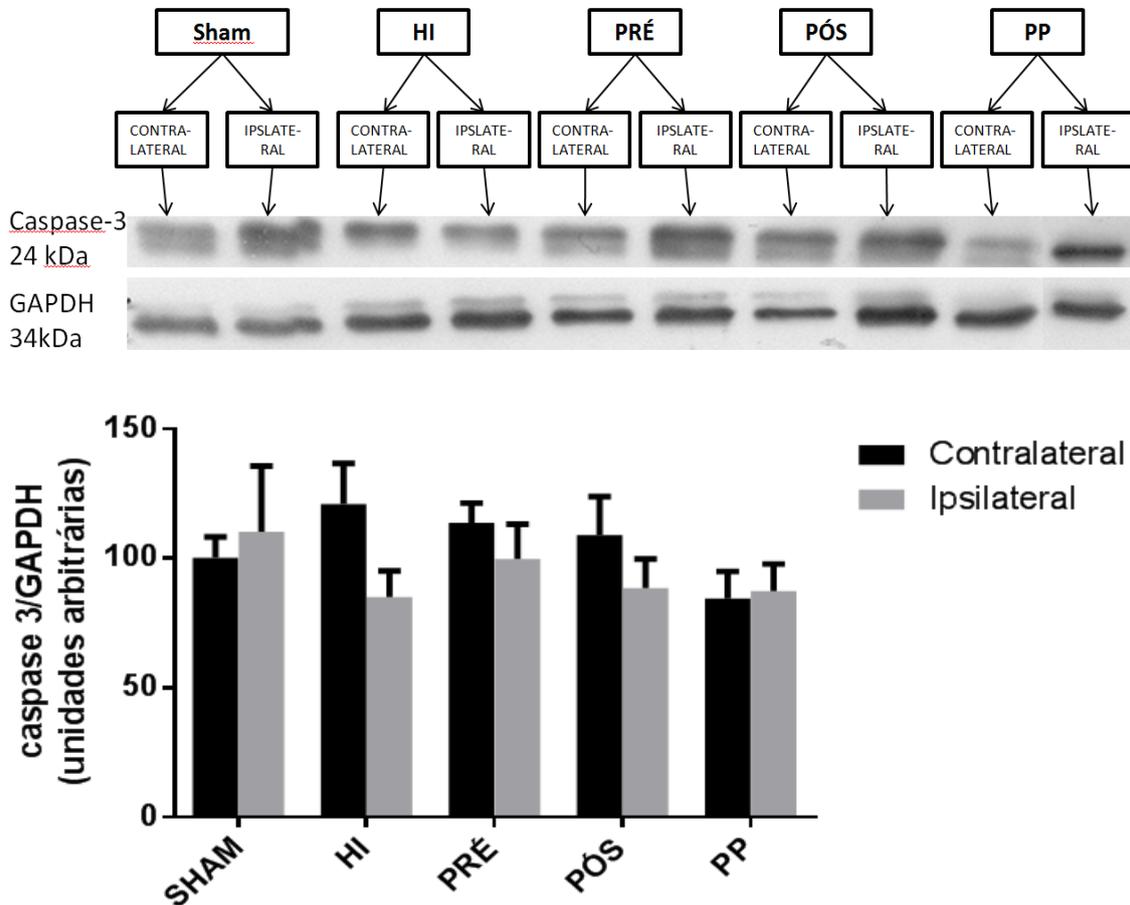


Figura 16 - Comparação dos níveis de caspase-3 entre os grupos experimentais. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados foram expressos como média±EPM. As imagens acima do gráfico são bandas representativas de cada grupo experimental mostrando o hemisfério contralateral e ipsilateral. Os dados não apresentaram diferença estatística significativa. A GAPDH foi usada como normalizadora da carga de proteína adicionada (caspase 3/GAPDH).

Os resultados apresentados na figura 17 mostram a relação p-Akt/Akt basal no hipocampo contralateral e ipsilateral à isquemia de todos os grupos submetidos à HI. Para esta análise foi utilizado o teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas. Foi verificada uma diminuição significativa da expressão proteica da p-Akt no hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea.

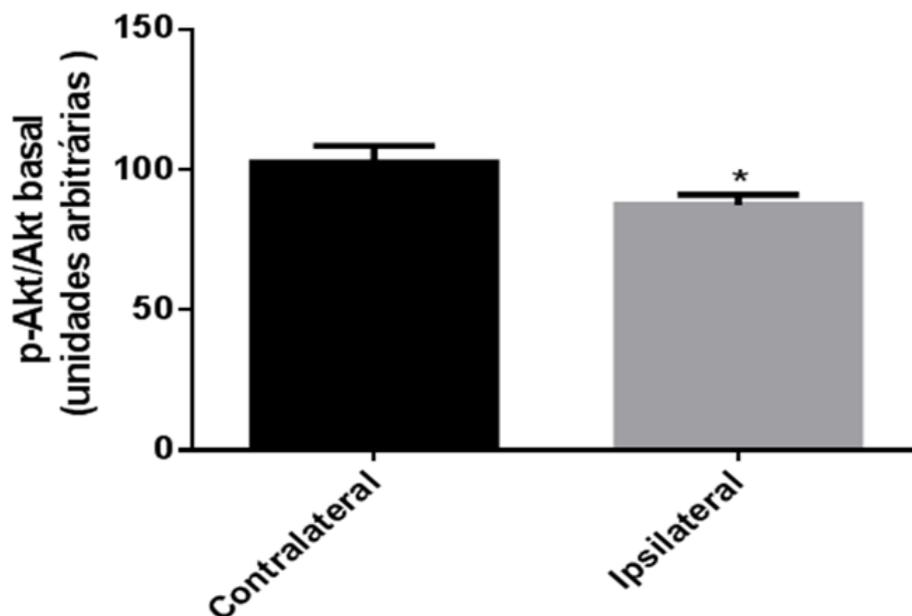


Figura 17 - Expressão proteica da p-Akt entre os hemisférios contralateral e ipsilateral à isquemia carotídea para os grupos submetidos à HI. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas. Os dados foram expressos como média±EPM. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao hemisfério contralateral ($p < 0,05$). A Akt basal foi usada como normalizadora da carga de proteína adicionada (p-Akt/Akt basal).

A figura 18 mostra a expressão de caspase-3 no hipocampo comparando o hemisfério contralateral e ipsilateral à isquemia de todos os grupos submetidos à HI. Para esta análise foi utilizado o teste de Mann-Whitney para amostras não pareadas. A análise dos dados não apresentou diferença significativa.

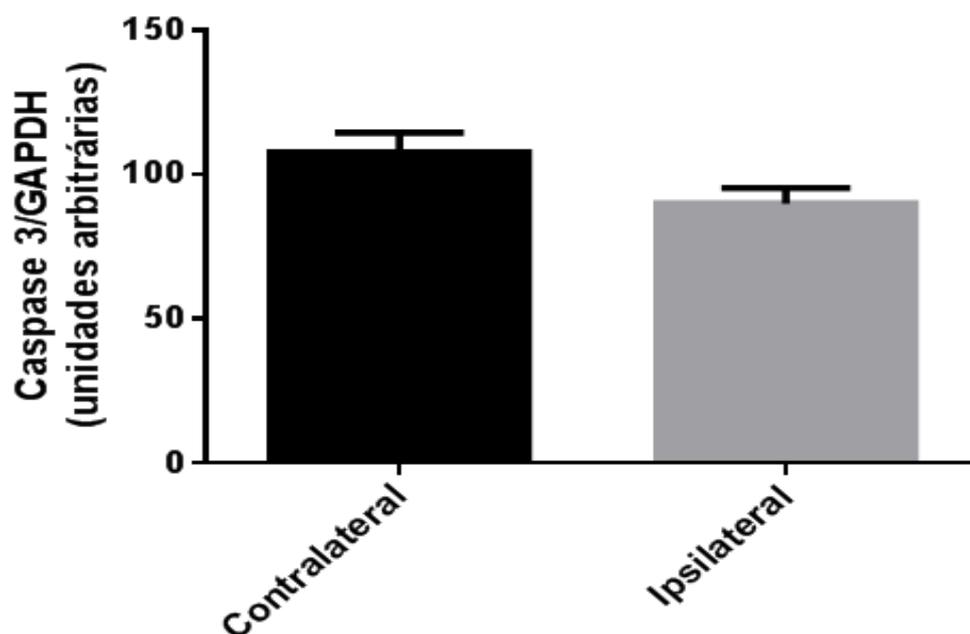


Figura 18 - Expressão proteica de caspase-3 entre os hemisférios contralateral e ipsilateral à isquemia carotídea para os grupos submetidos à HI. Os dados foram analisados pelo teste Mann-Whitney para amostras não pareadas. Os dados foram expressos como média±EPM. Os dados não apresentaram diferença estatística significativa. A GAPDH foi usada como normalizadora da carga de proteína adicionada (caspase 3/GAPDH).

7 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar, a curto prazo, os possíveis efeitos neuroprotetores da progesterona exógena, administrada em ratos neonatos submetidos à hipóxia-isquemia, sobre parâmetros distintos como o volume da lesão encefálica, o peso corporal e a expressão de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas.

A mortalidade observada neste trabalho apresenta semelhança com dados descritos na literatura, sendo que obtivemos uma mortalidade de aproximadamente 20% dos animais submetidos ao modelo. Sun e colaboradores (SUN et al., 2004) registraram uma mortalidade de 19% para animais submetidos ao modelo de HI, enquanto os estudos de Calvert e colaboradores (CALVERT et al., 2002) e Lafemina e colaboradores (LAFEMINA; SHELDON; FERRIERO, 2006) obtiveram uma mortalidade de 13% e 10%, respectivamente. Em nosso caso, entretanto, estamos considerando a mortalidade total dos animais, incluindo mesmo aqueles que morreram durante a anestesia ou o procedimento cirúrgico, e não apenas os animais mortos após o procedimento completo de HI. Talvez isso explique o valor um pouco mais elevado.

Todos os animais submetidos à HI utilizados no presente estudo apresentaram lesão no hemisfério cerebral ipsilateral à isquemia carotídea e nenhuma lesão no hemisfério contralateral, o que indica que o procedimento experimental foi padronizado e executado adequadamente.

Também cabe salientar que foram tomados diversos cuidados experimentais durante o processo de padronização dos experimentos. Embora nosso protocolo tenha se baseado na metodologia descrita na literatura da área (RICE; VANNUCCI; BRIERLEY, 1981; TSUJI et al., 2012), alguns ajustes foram necessários. Observamos que a utilização de uma temperatura de 37°C dentro da incubadora, juntamente com o tempo de 120 minutos de hipóxia (utilizado por outros grupos) (CHEN et al., 2015; NAKAJIMA et al., 2000; TSUJI

et al., 2012) provocava uma taxa de mortalidade muito elevada. Por isso, mantivemos a temperatura ajustada em 33°C (uma temperatura mais parecida com a temperatura do ninho) (JANS; WOODSIDE, 1990; ZIMMERBERG; SHARTRAND, 1992) e submetemos os animais à hipóxia por 90 minutos. Outro cuidado tomado foi a colocação de um termômetro dentro da câmara hipóxica para ajustar a temperatura de 33°C no local mais próximo possível aos animais. Nos nossos experimentos, a câmara hipóxica foi colocada dentro de uma incubadora (incubadora para bebês prematuros), o que facilitou o controle da temperatura e reduziu a variação térmica dentro da câmara hipóxica. Além disso, utilizamos um umidificador acoplado à entrada do sistema de gás hipóxico na câmara. O umidificador permitiu manter a umidade da câmara em torno de 70%, além de fazer com que o gás que estava ingressando na câmara tivesse uma temperatura em torno de 33°C (a temperatura do gás que deixa o cilindro gira em torno de 20°C e, por isso, o influxo do gás poderia reduzir a temperatura no interior da câmara hipóxica). Durante a padronização, observamos que uma umidade abaixo dos 20% aumentava consideravelmente a mortalidade dos animais. Outro cuidado tomado refere-se ao tempo em que os animais permaneciam anestesiados com isoflurano: foram utilizados nos experimentos apenas animais expostos ao isoflurano por menos de 10 minutos, ou seja, animais cuja realização da cirurgia durou mais do que 10 minutos não foram utilizados. Apesar desse tipo de cuidado experimental não estar descrito na literatura, foi observado que um período mais longo de anestesia aumentava a mortalidade (observação pessoal, dados não quantificados).

Os resultados de volume de infarto do hemisfério ipsilateral à isquemia mostram que realmente o procedimento de HI produziu uma lesão encefálica. Esses resultados são confirmados quando são avaliados os dados relativos ao volume de tecido não infartado do mesmo hemisfério, ou seja, o volume de tecido não infartado foi reduzido nos animais submetidos à HI, em comparação ao grupo SHAM. Essa avaliação dupla (avaliação do volume de lesão e do volume de tecido não lesionado) comprova que não ocorreu erro na delimitação das bordas entre a área vermelha corada com TTC e a área branca que caracteriza a lesão. O TTC reage com o tecido e tem como produto final o trifetil formazan, que dá uma coloração avermelhada ao tecido vivo (KRAMER

et al., 2010). Esta reação é muito utilizada em modelos experimentais de isquemia cerebral, pois no tecido infartado não ocorre a redução química do TTC e o tecido permanece esbranquiçado (não-corado) (BEDERSON et al., 1986; KUO et al., 2016; YAO et al., 2015).

Nossos resultados também mostram que a progesterona não produziu neuproteção, independente do momento em que foi administrada, já que não diminuiu a lesão produzida pelo procedimento de HI, nem nos animais tratados imediatamente antes da isquemia (grupo PRÉ), nem nos animais que receberam progesterona após o evento hipóxico-isquêmico (grupo PÓS) e nem mesmo no grupo de animais que foi tratado com esse neuroesteroide antes e depois da indução da HI (grupo PP).

Obviamente, esses resultados são dependentes da dose e da idade dos animais utilizados no trabalho. Já foi demonstrado, por exemplo, um maior dano encefálico causado pela progesterona em ratos Wistar de 14 dias de idade em comparação com animais de 7 dias de idade, submetidos à hipóxia-isquemia (TSUJI et al., 2012). Este dano pode ser observado pela maior diminuição do volume do hemisfério ipsilateral à isquemia nos animais que receberam progesterona em relação ao grupo submetido ao modelo de HI e que não recebeu a administração de progesterona ou de seu metabólito, a alopregnanolona. Já os animais de 21 dias de idade tratados com progesterona apresentaram lesão semelhante ao grupo sem a administração de progesterona (TSUJI et al., 2012). Esses resultados sugerem que a administração de progesterona em animais submetidos à HI pode ser prejudicial dependendo da idade de maturação encefálica do animal.

Nesse mesmo trabalho (TSUJI et al., 2012), também foi verificado que a administração tanto de alopregnanolona quanto de progesterona exógena produzia os mesmos efeitos, levando à hipótese de que a progesterona poderia acentuar a lesão (nesse caso) através de seu principal metabólito, a alopregnanolona. A utilização de uma curva utilizando doses diferentes de alopregnanolona (1 mg/kg, 3 mg/kg e 10 mg/kg) constatou uma diminuição significativa do volume do hemisfério ipsilateral à lesão HI apenas nos grupos que receberam as doses de 3 mg/kg e 10 mg/kg de alopregnanolona. A dose

de 1 mg/kg de alopregnanolona não acentuou a lesão produzida pela HI (TSUJI et al., 2012).

Enquanto o trabalho de Tsuji e colaboradores (TSUJI et al., 2012) mostrou que a progesterona acentuava a lesão produzida pela HI, outros estudos relatam que a progesterona pode ser benéfica em diversos modelos de lesões do sistema nervoso, ou seja, atua como um agente neuroprotetor (CERVANTES et al., 2002; CHEN; CHOPP; LI, 1999; PETERSON et al., 2015). Assim, os resultados apresentados na literatura são contraditórios, mostrando em algumas ocasiões efeitos benéficos e, em outras, resultados negativos referentes ao possível efeito neuroprotetor da progesterona.

Além do trabalho de Tsuji e colaboradores (TSUJI et al., 2012), também já foi demonstrado efeito prejudicial da progesterona tanto em modelo exclusivo de isquemia cerebral (MURPHY; LITTLETON-KEARNEY; HURN, 2002) quanto em modelo de HI cerebral neonatal (TSUJI et al., 2012).

No presente trabalho, não se observou nem aumento, nem redução da lesão cerebral nos animais submetidos à HI e tratados com progesterona. Ou seja, a progesterona não teve nenhum tipo de efeito sobre o volume de lesão produzido pela HI. Cabe salientar que, no presente estudo, foi utilizada a mesma dose de progesterona (10 mg/kg) que aumentava a lesão no estudo realizado por Tsuji e colaboradores (TSUJI et al., 2012). Tsuji e colaboradores (TSUJI et al., 2012) observaram esse efeito maléfico administrando a progesterona (10 mg/kg) imediatamente antes da cirurgia e após a cirurgia (o padrão de administração equivalente ao grupo PP do presente estudo). Assim, nossos resultados diferem daqueles encontrados por Tsuji e colaboradores (TSUJI et al., 2012). Entretanto, salientamos que além desse regime de administração de progesterona (antes e depois da cirurgia), no presente trabalho também avaliamos grupos de animais nos quais a progesterona foi administrada apenas antes (grupo PRÉ) ou apenas depois (grupo PÓS) da cirurgia e todos apresentaram o mesmo resultado: nenhuma alteração no volume de lesão em comparação ao grupo submetido à HI mas que não recebeu progesterona.

Por outro lado, é importante discutir que no presente estudo não foi realizado teste com diferentes doses de progesterona. Assim, não é possível descartar completamente a hipótese de que a progesterona possa agir como um agente neuroprotetor ou mesmo ter algum efeito adverso, aumentando o volume da lesão hipóxico-isquêmica quando administrada em outras doses. Estudos adicionais utilizando diferentes doses de progesterona são necessários para avaliar essa possibilidade

No presente trabalho, foi observado que todos os animais submetidos ao modelo de HI (com ou sem a administração de progesterona) tiveram uma diminuição do peso corporal em relação ao grupo SHAM, no período de 48 horas após a lesão (ou seja, na pesagem realizada antes do sacrifício dos animais). Essa redução do peso corporal poderia ser explicada em razão de alguma dificuldade motora que os animais possam ter adquirido devido à lesão encefálica. Alguns estudos sugerem que o procedimento de HI pode levar a uma deficiência motora e de aprendizagem para o animal neonato. Kooij e colaboradores (KOOIJ et al., 2010) observaram prejuízos na aprendizagem de animais (P9) submetidos à hipóxia por 75 minutos e deficiência na cognição de animais submetidos a 45 minutos de hipóxia. Lee e colaboradores (LEE et al., 2010) mostraram que animais (P7) submetidos à HI tiveram um desempenho motor prejudicado. Esses dados sustentam a hipótese de que o modelo de HI possa estar causando uma deficiência motora nos animais. Por outro lado, Sanches e colaboradores (SANCHES et al., 2013b) obtiveram resultados distintos com ratos Wistar de 3 dias e não constataram comprometimento motor nos animais.

Em nosso estudo, entretanto, a observação do comportamento dos animais nas caixas, após o procedimento de HI, parecia indicar que os mesmos apresentavam alguma dificuldade motora, como por exemplo, locomoção mais lenta. Talvez esses déficits motores possam ter produzido dificuldades na mamada, fazendo com que os animais acabassem perdendo peso. Entretanto, nenhum teste comportamental foi realizado para confirmar essa hipótese. A questão, por outro lado, é intrigante e merece ser elucidada em trabalhos futuros.

Além disso, parece que a administração de progesterona é capaz de acelerar a perda de peso. Os resultados do presente trabalho mostram que os animais que receberam progesterona antes da isquemia (grupos PRÉ ou PP) apresentaram peso corporal significativamente menor do que os demais grupos já nas primeiras 6 e 24 horas após a isquemia. Assim, é possível que a administração de progesterona imediatamente antes da cirurgia para indução de isquemia cerebral exerça algum efeito sistêmico importante, que acaba levando à redução do peso corporal. Não foram encontradas evidências na literatura que pudessem explicar a diminuição de peso causada pela progesterona em um modelo de HI.

O efeito preventivo da progesterona no evento isquêmico cerebral tem atraído grande atenção nos últimos anos (WANG et al., 2013). Wang e colaboradores (WANG et al., 2013) administraram uma dose de progesterona (8 mg/kg) menor do que a dose utilizada no presente estudo, e a administração foi realizada 30 minutos antes da oclusão da carótida em ratos Wistar (P7). Os animais foram sacrificados 24 horas após a isquemia para avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Em razão disso, foi avaliada a expressão da metaloproteinase da matriz do tipo 9 (MMP9), responsável pela decomposição da matriz extracelular e consequente degradação e destruição da BHE. Outro objetivo no trabalho de Wang e colaboradores (WANG et al., 2013) foi avaliar a expressão da aquaporina do tipo 4 (AQP-4), uma proteína específica de membrana que tem ampla distribuição no tecido cerebral e está relacionada ao desenvolvimento do edema cerebral causado por diversos motivos, como a própria isquemia. Os resultados obtidos foram promissores. Embora o modelo de HI cause destruição e aumento da permeabilidade da BHE, levando a um edema cerebral (o que foi associado ao aumento da expressão de MMP9 e AQP-4), a administração de progesterona antes da isquemia poderia reduzir a formação de edema (já que o esteroide reduziu a expressão de MMP9 e AQP-4) (WANG et al., 2013).

No entanto, como foi abordado no decorrer desta discussão, os dados do presente trabalho, juntamente com os dados de Tsuji e colaboradores (TSUJI et al., 2012), não sugerem qualquer efeito neuroprotetor da

progesterona, já que a mesma foi incapaz de reduzir a lesão produzida pela HI. Wang e colaboradores (WANG et al., 2010) utilizaram uma dose menor de progesterona (8mg/kg) do que a dose (10mg/kg) utilizada no presente estudo e no trabalho de Tsuji e colaboradores (TSUJI et al., 2012), além de administrar o neuroesteroide 30 minutos antes da isquemia (e não imediatamente antes do início da cirurgia). Essa diferença em relação à dose e ao padrão de administração de progesterona poderia explicar os resultados controversos entre os trabalhos. Entretanto, deve ser salientado que Wang e colaboradores (WANG et al., 2010) não analisaram o volume de lesão nos animais estudados, mas apenas a expressão das proteínas MMP9 e AQP-4. Talvez a redução observada na expressão dessas proteínas não seja suficiente para diminuir o edema e a lesão produzida pelo modelo de HI.

A via da PI3K/Akt é uma importante via de sinalização anti-apoptótica, enquanto as proteínas Bcl-2 e caspase-3 são importantes indutores de apoptose. A Akt é ativada por fosforilação e a expressão da p-Akt é um bom indicador do grau de ativação da Akt (CALAUTTI et al., 2005). No presente trabalho, não foi observada diferença na expressão da p-Akt entre os hipocampos ipsilaterais (hemisfério lesionado) dos diferentes grupos experimentais. O mesmo resultado se repetiu para a caspase-3. Porém, quando os hipocampos lesionados de todos os grupos experimentais que sofreram HI foram agrupados (ipsilateral) e comparados aos hipocampos contralaterais (não lesionado), foi observado que a expressão de p-Akt estava diminuída no lado ipsilateral. Isso é mais uma evidência de que a aplicação do modelo experimental foi adequada. Já foi observado em outros estudos que a lesão HI causa redução da expressão da p-Akt (WANG et al., 2013).

Em outro estudo, onde foi usado o mesmo modelo e a mesma dose (8mg/kg) e tempo de administração de progesterona (30 minutos antes da isquemia) que o realizado por Wang e colaboradores (WANG et al., 2010), a progesterona provocou uma ativação da Akt e Bcl-2 em comparação aos grupos HI e sham (LI et al., 2015). Já no presente trabalho, os grupos tratados com progesterona na concentração de 10 mg/kg mantiveram a expressão de p-Akt e caspases-3 semelhantes à do grupo HI. As diferenças na dose administrada e no tempo de administração do hormônio entre os trabalhos

podem ser os fatores principais para a diferença encontrada nos resultados relatados.

Em outro trabalho, que utilizou o mesmo modelo com administração de progesterona (8 mg/kg) 30 minutos antes do evento hipóxico-isquêmico, foi avaliada a expressão dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT3 24 horas após a isquemia. Foi verificado um aumento da expressão de GLUT1 e GLUT3 no grupo de animais que receberam o esteroide, sugerindo que a progesterona melhora o transporte de glicose na lesão cerebral hipóxica-isquêmica (LI et al., 2013).

Esses estudos (LI et al., 2013, 2015; WANG et al., 2010) apresentaram dados referentes a uma ativação das vias de sobrevivência, aumento dos transportadores de glicose e diminuição do edema cerebral com a administração de progesterona em modelos de HI utilizando ratos Wistar de 7 dias. Já no presente trabalho, foi observado que a progesterona não promoveu melhora nos parâmetros avaliados, em comparação aos animais do grupo HI, pelo menos a curto prazo. No entanto, é possível que a progesterona produza uma resposta benéfica a longo prazo, uma vez que ela poderia estar ativando outras vias de sobrevivência e proteínas de transporte essenciais para a recuperação dos animais que não foram avaliados no presente trabalho.

Visto que existem na literatura trabalhos utilizando a progesterona que demonstram efeitos maléficos da progesterona (TSUJI et al., 2012), enquanto outros mostram efeitos neuroprotetores do hormônio (LI et al., 2013; WANG et al., 2010) no modelo de HI, seria interessante saber se a progesterona poderia provocar danos ao animal se administrada em condições basais (sem estar associado ao procedimento de HI). Na literatura, apenas um trabalho comparou os resultados de animais tratados com progesterona, mas não submetidos ao modelo de HI, com os de animais tratados com progesterona e submetidos à HI (PETERSON et al., 2015). Os animais não submetidos ao procedimento de HI e que receberam progesterona não mostraram resultados diferentes dos animais do grupo SHAM para qualquer parâmetro examinado.

A idade do animal no momento do evento hipóxico-isquêmico também desempenha um papel crítico nos resultados funcionais e morfológicos, podendo existir também diferenças sexuais importantes nesta resposta (KOLB et al., 2011; NEMATI; KOLB, 2012). Peterson e colaboradores (PETERSON et

al., 2015) trabalharam com ratos P7 da linhagem Sprague-Dawley, utilizando machos e fêmeas submetidos aos eventos hipóxicos-isquêmicos. Em um dos grupos de animais, a progesterona (8mg/kg) foi administrada em um total de 9 injeções, nos tempos 0 (logo após o fim do evento hipóxico), 2 e 24 horas e 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias após a HI. Os animais foram eutanasiados com 52 dias, para permitir uma análise da resposta da progesterona a longo prazo. Foi verificado que a progesterona reduziu a lesão nos animais machos submetidos ao procedimento de HI. Por outro lado, os resultados obtidos com fêmeas não mostraram qualquer efeito neuroprotetor capaz de reduzir a lesão. Portanto, além da idade do animal ser um fator de extrema importância para a escolha do modelo e tratamento, como já discutido, a diferença sexual também influencia a resposta, neste caso mostrando um efeito neuroprotetor da progesterona apenas em animais machos (PETERSON et al., 2015).

Sanches e colaboradores (SANCHES et al., 2013b), utilizando ratos Wistar de 3 dias de idade, também foram capazes de demonstrar as diferenças de gênero nas respostas ao procedimento de HI. As fêmeas com oclusão da carótida comum esquerda aparentavam ser mais prejudicadas pela lesão do que ratos machos. Esses resultados mostram a importância da inclusão de indivíduos de ambos os sexos nas investigações pré-clínicas e clínicas no tratamento de lesões cerebrais e para o desenvolvimento de novos medicamentos.

No presente trabalho, foram utilizados apenas animais neonatos machos e não foi constatada nenhuma forma de neuroproteção nos animais tratados com progesterona, em relação aos parâmetros avaliados. Esses dados podem ser influenciados pela dose e tempo em que foi administrado o neuroesteróide. A perda de peso mais acentuada foi observada nos animais nos quais se administrou progesterona antes da isquemia porém, após 48 horas do início do evento hipóxico, todos os grupos submetidos à cirurgia e ao evento hipóxico mostraram redução significativa de seus pesos corporais. Essa perda rápida de peso pelos animais tratados com progesterona poderia estar associada a um efeito sistêmico da progesterona. Permanece por ser determinado se esse efeito também ocorre em outras condições experimentais e por serem esclarecidas as causas do mesmo.

8. CONCLUSÕES

-A observação da existência de lesão encefálica no hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea em todos os grupos submetidos ao modelo de HI, juntamente com a diminuição da expressão da p-Akt no lado ipsilateral à isquemia, demonstram que o procedimento experimental foi padronizado e executado adequadamente, replicando de forma satisfatória o modelo de HI neonatal descrito na literatura;

-A administração de progesterona na dose de 10 mg/kg, em qualquer dos esquemas de administração utilizados, não tem qualquer efeito neuroprotetor nos animais submetidos ao procedimento de HI neonatal, já que o neuroesteroide foi incapaz de reduzir o volume da lesão encefálica e também foi incapaz de aumentar a ativação das vias de sinalização celular associadas a ações anti-apoptóticas (no caso, a via da Akt);

-Quando administrada imediatamente antes do procedimento de HI, a progesterona parece exercer um efeito sistêmico prejudicial, visto que os animais que receberam progesterona nesse período (grupos PRÉ e PP) tiveram uma aceleração na redução do peso corporal, que já foi observada nas primeiras horas após o evento hipóxico-isquêmico.

9. REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, R. et al. Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 60, n. 6, p. 731–7, jun. 2008.
- ARAUJO, A. S. DE et al. A hipotermia como estratégia protetora de encefalopatia hipóxico-isquêmica em recém-nascidos com asfixia perinatal. **Revista brasileira de crescimento e desenvolvimento humano**, v. 18, n. 3, p. 346–358, 2008.
- ARBO, B. D. et al. Effect of low doses of progesterone in the expression of the GABA(A) receptor $\alpha 4$ subunit and procaspase-3 in the hypothalamus of female rats. **Endocrine**, v. 46, n. 3, p. 561–567, 24 ago. 2014.
- BAULIEU, E. E. Neurosteroids: a novel function of the brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 8, p. 963–87, nov. 1998.
- BEDERSON, J. B. et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke**, v. 17, n. 6, p. 1304–1308, 1 nov. 1986.
- BEN-ARI, Y. et al. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. **Physiological reviews**, v. 87, n. 4, p. 1215–84, out. 2007.
- BINKOWSKI, R. T. K.; WEINMANN, A. R. M. Hipotermia terapêutica em recém-nascidos com diagnóstico de encefalopatia hipóxico isquêmica: Revisão de Literatura. **Saúde (Santa Maria), Santa Maria**, v. 41, n. 1, p. 37–48, 2015.
- CALAUTTI, E. et al. Phosphoinositide 3-Kinase Signaling to Akt Promotes Keratinocyte Differentiation Versus Death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 38, p. 32856–32865, 23 set. 2005.
- CALVERT, J. W. et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia–ischemia in a neonatal rat model. **Brain Research**, v. 951, p. 1–8, 2002.
- CARDONE, M. H. et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5392, p. 1318–21, 13 nov. 1998.
- CASTRO E SILVA JR., O. DE et al. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, p. 96–100, 2002.
- CERVANTES, M. et al. Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. **Archives of medical research**, v. 33, n. 1, p. 6–14, 2002.
- CHEN, C.-Y. et al. Hypoxic Preconditioning Suppresses Glial Activation and Neuroinflammation in Neonatal Brain Insults. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 632592, 2015.
- CHEN, G. et al. Effects of progesterone on intestinal inflammatory response,

- mucosa structure alterations, and apoptosis following traumatic brain injury in male rats. **The Journal of surgical research**, v. 147, n. 1, p. 92–8, 1 jun. 2008.
- CHEN, J.; CHOPP, M.; LI, Y. Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. **Journal of the neurological sciences**, v. 171, n. 1, p. 24–30, 1 dez. 1999.
- COFFER, P. J.; WOODGETT, J. R. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 201, n. 2, p. 475–81, 15 out. 1991.
- CREMER, J. E. Substrate utilization and brain development. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, v. 2, n. 4, p. 394–407, 1982.
- DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.; MISHRA, O. P. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. **The Journal of pediatrics**, v. 132, n. 3 Pt 2, p. S30–4, mar. 1998.
- DOUGLAS-ESCOBAR, M.; WEISS, M. D. Biomarkers of brain injury in the premature infant. **Frontiers in neurology**, v. 3, p. 185, 2012.
- DU PLESSIS, A.; JOHNSTON, M. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. **Clinics in Perinatology**, v. 24, n. 3, p. 627–654, 1997.
- DUARTE, S. G.; CAMPOS, A. D.; COLLI, B. O. Functional evaluation of temporary focal cerebral ischemia: experimental model. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 3B, p. 751–756, set. 2003.
- DUBROVSKY, B. Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 84, n. 4, p. 644–55, ago. 2006.
- EDMOND, J. et al. Ketone body metabolism in the neonate: development and the effect of diet. **Federation proceedings**, v. 44, n. 7, p. 2359–64, abr. 1985.
- FERNANDES, T. et al. Determinantes moleculares da hipertrofia do músculo esquelético mediados pelo treinamento físico: estudo de vias de sinalização. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 7, n. 1, p. 168–188, 2008.
- FERRIERO, D. M. Neonatal brain injury. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 19, p. 1985–95, 4 nov. 2004.
- FRANÇOIS, F.; GRIMES, M. L. Phosphorylation-dependent Akt cleavage in neural cell in vitro reconstitution of apoptosis. **Journal of neurochemistry**, v. 73, n. 4, p. 1773–6, out. 1999.
- FRANKE, T. F. et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. **Cell**, v. 81, n. 5, p. 727–36, 2 jun. 1995.
- GAGLIARDI, R. J. Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 58, n. 2B, p. 583–588, 2000.
- GIBSON, C. L.; COOMBER, B.; RATHBONE, J. Is progesterone a candidate neuroprotective factor for treatment following ischemic stroke? **The**

Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry, 2009.

GROBIN, A. C. et al. Perinatal neurosteroid levels influence GABAergic interneuron localization in adult rat prefrontal cortex. **The Journal of neuroscience** : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 23, n. 5, p. 1832–9, 1 mar. 2003.

GUERRA-ARAIZA, C. et al. Regulation of the phosphoinositide-3 kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain. **Journal of neuroscience research**, v. 87, n. 2, p. 470–81, fev. 2009.

GUO, Q. et al. Progesterone administration modulates AQP4 expression and edema after traumatic brain injury in male rats. **Experimental neurology**, v. 198, n. 2, p. 469–78, abr. 2006.

HERRERA-MARSCHITZ, M. et al. Perinatal asphyxia: current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus on sentinel proteins. **Neurotoxicity research**, v. 19, n. 4, p. 603–27, maio 2011.

HILL, M. et al. Neuroactive steroids, their precursors, and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal and umbilical blood: 1. Identification and simultaneous determination of pregnanolone isomers. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 75, n. 4-5, p. 237–44, 31 dez. 2000.

ISHRAT, T. et al. Progesterone and allopregnanolone attenuate blood-brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. **Experimental neurology**, v. 226, n. 1, p. 183–90, nov. 2010.

JANS, J. E.; WOODSIDE, B. C. Nest temperature: Effects on maternal behavior, pup development, and interactions with handling. **Developmental Psychobiology**, v. 23, n. 6, p. 519–534, set. 1990.

JOHNSTON, M. V et al. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. **Pediatric research**, v. 49, n. 6, p. 735–41, 1 jun. 2001.

JONES, P. F. et al. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 10, p. 4171–4175, 15 maio 1991.

KAORE, S. N. et al. Novel actions of progesterone: what we know today and what will be the scenario in the future? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 8, p. 1040–1062, ago. 2012.

KAUR, P. et al. Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants. **Journal of neuroscience research**, v. 85, n. 11, p. 2441–9, 15 ago. 2007.

KIM, N. H. et al. PKB/Akt inhibits ceramide-induced apoptosis in neuroblastoma cells by blocking apoptosis-inducing factor (AIF) translocation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 102, n. 5, p. 1160–70, 1 dez. 2007.

- KITAGAWA, K. et al. Differential Akt phosphorylation at Ser473 and Thr308 in cultured neurons after exposure to glutamate in rats. **Neuroscience Letters**, v. 333, n. 3, p. 187–190, nov. 2002a.
- KITAGAWA, K. et al. Differential Akt phosphorylation at Ser473 and Thr308 in cultured neurons after exposure to glutamate in rats. **Neuroscience letters**, v. 333, n. 3, p. 187–90, 29 nov. 2002b.
- KNOX, R. et al. Enhanced NMDA receptor tyrosine phosphorylation and increased brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in mice with neuronal Fyn overexpression. **Neurobiology of disease**, v. 51, p. 113–9, mar. 2013.
- KOLB, B. et al. Brain plasticity and recovery from early cortical injury. **Developmental medicine and child neurology**, v. 53 Suppl 4, p. 4–8, set. 2011.
- KOOIJ, M. A. VAN DER et al. Mild neonatal hypoxia–ischemia induces long-term motor- and cognitive impairments in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 5, p. 850–856, 2010.
- KORC, I.; BIDEAIN, M.; MARTELL, M. Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. **Revista Médica del Uruguay**, v. 11, p. 121–135, 1995.
- KOWALTOWSKI, A. J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: Beyond ATP production. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 241–250, 2000.
- KRAMER, M. et al. TTC staining of damaged brain areas after MCA occlusion in the rat does not constrict quantitative gene and protein analyses. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 187, n. 1, p. 84–89, mar. 2010.
- KUAN, C. Y. et al. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. **Trends in neurosciences**, v. 23, n. 7, p. 291–7, jul. 2000.
- KUMRAL, A. et al. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. **Biology of the neonate**, v. 83, n. 3, p. 224–8, 2003.
- KUO, P. et al. Interferon- β Modulates Inflammatory Response in Cerebral Ischemia. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 1, p. e002610, 26 jan. 2016.
- LAFEMINA, M. J.; SHELDON, R. A.; FERRIERO, D. M. Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. **Pediatric research**, v. 59, n. 5, p. 680–3, maio 2006.
- LEE, J. A. et al. Mesenchymal Stem-Cell Transplantation for Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rat Model. **Pediatric Research**, v. 67, n. 1, p. 42–48, 2010.
- LEVINE, S. Anoxic-Ischemic encephalopathy in Rats. **American Journal Pathology**, v. 36, n. 1, p. 1–17, 1960.
- LI, X. et al. Progesterone treatment before experimental hypoxia-ischemia enhances the expression of glucose transporter proteins GLUT1 and GLUT3 in

neonatal rats. **Neuroscience Bulletin**, 2013.

LI, X. et al. Progesterone reduces inflammation and apoptosis in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage through the PI3K/Akt pathway. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 5, p. 8197–203, 2015.

LUISI, S. et al. Serum allopregnanolone levels in pregnant women: changes during pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 85, n. 7, p. 2429–33, jul. 2000.

LUOMA, J. I.; STERN, C. M.; MERMELSTEIN, P. G. Progesterone inhibition of neuronal calcium signaling underlies aspects of progesterone-mediated neuroprotection. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 131, n. 1-2, p. 30–6, ago. 2012.

MANI, S. Progesterin Receptor Subtypes in the Brain: The Known and the Unknown. **Endocrinology**, v. 149, n. 6, p. 2750–2756, jun. 2008.

MCQUILLEN, P. S.; FERRIERO, D. M. Perinatal Subplate Neuron Injury: Implications for Cortical Development and Plasticity. **Brain Pathology**, v. 15, n. 3, p. 250–260, 5 abr. 2006.

MELCANGI, R. C.; GARCIA-SEGURA, L. M.; MENSAH-NYAGAN, A. G. Neuroactive steroids: State of the art and new perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 5, p. 777–797, 26 mar. 2008.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S–15S, abr. 2000.

MUNIZ, L. R. F.; FARIA, M. H. G.; VASCONCELOS, P. R. L. DE. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 5, p. 529–534, out. 2004.

MURPHY, S. J.; LITTLETON-KEARNEY, M. T.; HURN, P. D. Progesterone administration during reperfusion, but not preischemia alone, reduces injury in ovariectomized rats. **Journal of cerebral blood flow and metabolism** □ : **official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 22, n. 10, p. 1181–8, out. 2002.

NAIR, V. D.; OLANOW, C. W. Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3beta pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 22, p. 15469–78, 30 maio 2008.

NAKAJIMA, W. et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. **The Journal of neuroscience** □ : **the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 21, p. 7994–8004, 1 nov. 2000.

NAKANO, H.; COLLI, B. O.; ROSELINO, J. E. DE S. Análise da respiração mitocondrial em tecido cerebral de gato após isquemia e reperfusão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, 2002.

NEHLIG, A.; DE VASCONCELOS, A. P.; BOYET, S. Quantitative

autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. **The Journal of neuroscience** □ : **the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 2321–33, jul. 1988.

NEHLIG, A.; PEREIRA DE VASCONCELOS, A. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. **Progress in Neurobiology**, v. 40, n. 2, p. 163–220, fev. 1993.

NEMATI, F.; KOLB, B. Recovery from medial prefrontal cortex injury during adolescence: implications for age-dependent plasticity. **Behavioural brain research**, v. 229, n. 1, p. 168–75, 1 abr. 2012.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 581–618, abr. 1998.

PAUL, S. M.; PURDY, R. H. Neuroactive steroids. **FASEB journal** □ : **official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, n. 6, p. 2311–22, mar. 1992.

PETERSON, B. L. et al. Sex-related differences in effects of progesterone following neonatal hypoxic brain injury. **Behavioural Brain Research**, 2015.

PLUCHINO, N. et al. Progesterone and progestins: effects on brain, allopregnanolone and beta-endorphin. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 102, n. 1-5, p. 205–13, dez. 2006.

PRANDINI, M. N. et al. Mild hypothermia reduces polymorphonuclear leukocytes infiltration in induced brain inflammation. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 63, n. 3B, p. 779–84, set. 2005.

PROCIANOY, R. S.; SILVEIRA, R. DE C. Síndrome hipóxico-isquêmica. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 1, p. 63–70, 2001.

REES, S.; HARDING, R.; WALKER, D. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. **International journal of developmental neuroscience** □ : **the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 6, p. 551–63, out. 2011.

RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Annals of neurology**, v. 9, n. 2, p. 131–41, fev. 1981.

RIMPILÄINEN, J. et al. Leukocyte filtration improves brain protection after a prolonged period of hypothermic circulatory arrest: A study in a chronic porcine model. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 120, n. 6, p. 1131–41, 2000.

ROSETO, A.; BRENNER, C. Apoptosis o la muerte celular programada. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 97, n. 4, p. 253–275, 1999.

RUPPRECHT, R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, n. 2, p. 139–168, fev. 2003.

SALMASO, N. et al. Neurobiology of premature brain injury. **Nature**

Neuroscience, v. 17, n. 3, p. 341–346, 25 fev. 2014.

SANCHES, E. F. et al. Are the consequences of neonatal hypoxia – ischemia dependent on animals' sex and brain lateralization? **Brain Research**, 2013a.

SANCHES, E. F. et al. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. **Neuroscience**, 2013b.

SARKAKI, A. R. et al. Time- and dose-dependent neuroprotective effects of sex steroid hormones on inflammatory cytokines after a traumatic brain injury. **Journal of neurotrauma**, v. 30, n. 1, p. 47–54, 1 jan. 2013.

SAYEED, I.; STEIN, D. G. Progesterone as a neuroprotective factor in traumatic and ischemic brain injury. **Progress in brain research**, v. 175, p. 219–37, 2009.

SCHUMACHER, M. et al. Progesterone: therapeutic opportunities for neuroprotection and myelin repair. **Pharmacology & therapeutics**, v. 116, n. 1, p. 77–106, out. 2007.

SHAHROKHI, N. et al. Effect of sex steroid hormones on brain edema, intracranial pressure, and neurologic outcomes after traumatic brain injury. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 414–21, abr. 2010.

SMITH, J. C. et al. Isoflurane with morphine is a suitable anaesthetic regimen for embryo transfer in the production of transgenic rats. **Laboratory animals**, v. 38, n. 1, p. 38–43, 1 jan. 2004.

STEIN, D. G. Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. **Brain research reviews**, v. 57, n. 2, p. 386–97, mar. 2008.

STEIN, D. G. Is progesterone a worthy candidate as a novel therapy for traumatic brain injury? **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 352–9, 2011.

SUN, H.-S. et al. Neuronal KATP channels mediate hypoxic preconditioning and reduce subsequent neonatal hypoxic–ischemic brain injury. **Experimental Neurology**, v. 263, p. 161–171, jan. 2015.

SUN, Y. et al. Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, v. 24, n. 2, p. 259–70, fev. 2004.

TANIGUCHI, H.; ANDREASSON, K. The hypoxic-ischemic encephalopathy model of perinatal ischemia. **Journal of visualized experiments** : **JVE**, n. 21, p. e955, 19 jan. 2008.

TARDINI, D. M. S. et al. Avaliação de dois modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral em ratos com oclusão temporária carotídea associada ou não à oclusão vertebral. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 6, p. 514–517, dez. 2003.

TATARANNO, M. L.; PERRONE, S.; BUONOCORE, G. Plasma Biomarkers of Oxidative Stress in Neonatal Brain Injury. **Clinics in Perinatology**, v. 42, n. 3,

p. 529–539, set. 2015.

THORNTON, C. et al. Molecular Mechanisms of Neonatal Brain Injury. **Neurology Research International**, v. 2012, p. 1–16, 2012.

TSUJI, M. et al. Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. **Experimental neurology**, v. 233, n. 1, p. 214–20, jan. 2012.

VANNUCCI, R. C. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. **Pediatric research**, v. 27, n. 4 Pt 1, p. 317–26, abr. 1990.

VANNUCCI, R. C.; VANNUCCI, S. J. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 835, p. 234–49, 19 dez. 1997.

VANNUCCI, R. C.; YAGER, J. Y.; VANNUCCI, S. J. Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. **Journal of cerebral blood flow and metabolism** : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, v. 14, n. 2, p. 279–88, mar. 1994.

VANNUCCI, S. J.; HAGBERG, H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. **The Journal of experimental biology**, v. 207, n. Pt 18, p. 3149–3154, 2004.

WANG, J. M. et al. Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 14, p. 6498–503, 6 abr. 2010.

WANG, X. et al. Progesterone attenuates cerebral edema in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage by inhibiting the expression of matrix metalloproteinase-9 and aquaporin-4. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 6, n. 1, p. 263–267, jul. 2013.

YAGER, J. Y.; BRUCKLACHER, R. M.; VANNUCCI, R. C. Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in immature rats. **The American journal of physiology**, v. 262, n. 3 Pt 2, p. H672–7, mar. 1992.

YANG, Y. et al. δ -opioid receptor activation and microRNA expression of the rat cortex in hypoxia. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51524, 2012.

YAO, X. et al. Reduced brain edema and infarct volume in aquaporin-4 deficient mice after transient focal cerebral ischemia. **Neuroscience Letters**, v. 584, p. 368–372, jan. 2015.

ZHU, C. et al. Post-ischemic hypothermia-induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. **Brain Research**, v. 996, p. 67–75, 2004.

ZIMMERBERG, B.; SHARTRAND, A. M. Temperature-dependent effects of maternal separation on growth, activity, and amphetamine sensitivity in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 25, n. 3, p. 213–226, abr. 1992.