

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

Janaína Zang

**EFEITO A CURTO PRAZO DA HIPOTERMIA TERAPÊUTICA EM RATOS
MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA
ENCEFÁLICA NEONATAL**

Porto Alegre
2022

Janaína Zang

**EFEITO A CURTO PRAZO DA HIPOTERMIA TERAPÊUTICA EM RATOS
MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA
ENCEFÁLICA NEONATAL**

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

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

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Zang, Janaína
EFEITO A CURTO PRAZO DA HIPOTERMIA TERAPÊUTICA EM
RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO MODELO DE
HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL / Janaína Zang.
-- 2022.
75 f.
Orientador: Luciano Stürmer de Fraga.

Coorientadora: Ana Helena da Rosa Paz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Hipóxia-isquemia neonatal . 2. Hipotermia
terapêutica . 3. Lesão encefálica . 4. Neuroproteção .
5. Neurodesenvolvimento . I. de Fraga, Luciano
Stürmer, orient. II. Paz, Ana Helena da Rosa,
coorient. III. Título.

Dedico essa dissertação aos meus pais, Eliana Zang e Olmiro Zang, por sempre me apoiarem e por todo suporte de sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Luciano Stürmer de Fraga, meu orientador, por toda a experiência que me foi passada, todo ensinamento, todo incentivo, por acreditar no meu potencial e me tornar uma aluna e pesquisadora melhor, tu me mostraste como o mundo da pesquisa é, como ser um pesquisador é lindo e importante, ainda mais com todas as adversidades que enfrentamos nesses últimos anos. Tu é e sempre vai ser um exemplo para mim. O melhor orientador do mundo.

Agradeço à professora Ana Helena Paz, minha coorientadora por aceitar ser minha coorientadora, abraçar o meu futuro projeto e dar todo suporte necessário. Obrigada por cada conversa e cada ensinamento. Que nossa parceria continue e que dela surjam muitos frutos.

Agradeço às minhas queridas e amadas professoras da UNIVATES, Andréa Horst, Gabriela Kniphoff da Silva Lawisch e Fernanda Rocha da Trindade, vocês foram essenciais para que eu chagasse até aqui. Obrigada por todo companheirismo, amizade e por me escutarem falar horas e horas do meu mestrado. Vocês são muito especiais na minha vida.

Agradeço imensamente meus pais Eliana Zang e Olmiro Zang por acreditarem desde sempre no meu potencial, por me incentivarem sempre a seguir meus sonhos e dar todo o apoio para que eu pudesse realizá-los. As conquistas nunca são só minhas, as conquistas são sempre nossas! Vocês são meu maior exemplo de humildade, de força, de afeto, de garra, de vida. Sem vocês nada seria possível.

Agradeço também meus queridos irmãos Alexandre e Gustavo, eu sempre me espelhei em vocês. A cada passo da minha trajetória vocês estiveram comigo, torcendo por mim, me dando suporte e incentivando a ser minha melhor versão.

Agradeço o apoio de toda minha família, principalmente da minha dinda Vânia Pohl e da minha dinda Tânia Dahlen, vocês são muito especiais, obrigada por sempre estarem do meu lado.

Agradeço à minha segunda família, Tatiana de Oliveira D'Ávila e Isadora Tassinari que me acolheram tão bem, com tanto amor e afeto. Vocês duas são um grande exemplo para mim. Não cabe em palavras tudo o que vocês

significam na minha vida. Isa, obrigada por cada palavra de carinho e de conforto, cada ajuda e cada momento que tu esteve comigo nesses dois anos, tu é e sempre vai ser minha dupla, minha melhor amiga, minha irmã.

Agradeço aos meus grandes amigos do grupo de pesquisa do professor Luciano, Neurobiologia e Metabolismo. Especialmente, para minha dupla de hipotermia Ricardo Ribeiro Nunes, obrigada por toda parceria durante os experimentos, análises, por ser esse amigo que me ajudou em diversos momentos sempre com piadas e muito companheirismo. E para minha outra dupla, Anna Clara Colucci, obrigada por abraçar esse projeto comigo, por todo companheirismo, toda discussão, toda troca, cada conversa, risada e por ser essa baita amiga que está sempre comigo me apoiando e entrando de cabeça nas minhas loucuras. Agradeço também à minha colega de graduação e agora de pós-graduação Francielle Spies, teu apoio e amizade são fundamentais para mim. Agradeço do fundo do coração a todos os membros desse grupo, Mariana Hoff, Mirella Andrade e Sofia Petri, obrigada por todo suporte e ajuda. Que nossa parceria continue para sempre.

Agradeço aos meus amigos, Gabriel Schirmbeck e Jeferson Jantsch por toda ajuda, ensinamentos e pela parceria.

Agradeço às minhas amigas, Dafner D'Avila e Natália Salini, por me apoiarem, comemorarem comigo cada conquista e serem minhas parceiras desde a graduação.

Agradeço aos meus colegas de mestrado por todas as trocas e por toda a parceria.

A todos os funcionários da Unidade de Experimentação Animal do HCPA que sempre foram muito solícitos.

Agradeço imensamente à professora Paula Rigon, por toda ajuda, todos ensinamentos e conversas. Ao técnico Maikel Rosa de Oliveira pelo auxílio nos cortes, colorações, por cada ensinamento e pela parceria.

Agradeço aos professores e alunos do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC). Agradeço ao professor Carlos Alexandre Netto e a todo laboratório 35 do Departamento de Bioquímica, principalmente à pós doc Luz Elena Durán Carabali por toda paciência e ajuda me ensinando como capturar no microscópio da Zeiss e a técnica de Fluoro-Jade.

Agradeço à equipe do LabFluor, por toda ajuda, pela disponibilidade e por toda troca de conhecimento.

Agradeço a todos os professores do PPG-Fisiologia pela oportunidade e ensinamentos.

Agradeço à professora Dra. Maria Flavia Marques Ribeiro, pela relatoria, disponibilidade e considerações. E aos demais membros da banca, professor Dr. Alexandre Luz de Castro e professora Dra. Márcia Giovenardi, pela disponibilidade, pelo aceite em participar da avaliação desta dissertação e pelas contribuições que virão.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado. E às demais agências de fomento, como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e a PROPESQ-UFRGS pelo apoio financeiro.

RESUMO

A hipóxia-isquemia (HI) é uma das principais causas de óbitos e sequelas neurológicas em recém-nascidos. Além disso, em modelos animais de HI, foram observadas diferenças entre machos e fêmeas em relação à gravidade da lesão cerebral. O único tratamento recomendado para a HI neonatal é a hipotermia terapêutica (HT), que consiste na redução da temperatura corporal para 33,5°C-34,5°C por 72 horas. Como a HT apresenta algumas limitações, um melhor entendimento de seus efeitos específicos em machos e fêmeas é importante para o aprimoramento de sua aplicação clínica. O presente estudo avaliou o efeito do tratamento com HT a curto prazo sobre a lesão cerebral e os desfechos comportamentais em ratos neonatos machos e fêmeas submetidos ao modelo de HI neonatal. Ratos Wistar machos e fêmeas com sete dias de idade (P7) foram distribuídos em três grupos experimentais: SHAM (animais submetidos à cirurgia fictícia), HI (animais submetidos ao procedimento HI) e HT (animais submetidos ao procedimento de HI e tratados com HT). Para a HI, os filhotes foram submetidos à cirurgia de oclusão unilateral da artéria carótida comum direita e expostos a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio) por 75 minutos. Após um período de recuperação, os animais do grupo HT foram submetidos à HT (temperatura corporal reduzida para 32°C) por 5 horas. Em P8, as respostas reflexas dos animais foram avaliadas usando os testes de reflexo de endireitamento, geotaxia negativa e aversão à borda. O teste de discriminação olfatória também foi realizado. Os animais foram eutanasiados em P9 e foram coletados os encéfalos, para as análises de volume de lesão, contagem de neurônios pela técnica de Nissl e avaliação da degeneração neuronal pela técnica de Fluoro-Jade B. Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas; os dados não-paramétricos foram avaliados por Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn. A significância aceita foi de $p < 0,05$. De forma geral, nos testes comportamentais não foram observadas diferenças significativas desencadeadas pela HI ou HT, apenas no reflexo de endireitamento, no qual as fêmeas do grupo HI apresentaram menor latência. Nas análises do volume de lesão encefálica indireta, a HT reduziu o % de lesão produzida pela HI nos machos. Nas contagens do número de neurônios, os animais do grupo HI tiveram uma redução no número total de neurônios, quando comparados ao grupo SHAM tanto em machos quanto em fêmeas, nas regiões de CA1 e giro denteado (GD) do hipocampo; entretanto, nos machos e nas fêmeas na região de CA1 a HT preveniu parcialmente a morte neuronal. Na contagem de células Fluoro-Jade+, na região de CA1, os animais do grupo HI tiveram mais células em degeneração, o que foi revertido pela HT nas fêmeas. No GD, os animais machos do grupo HI apresentaram uma maior quantidade de células Fluoro-Jade+, o que foi revertido pela HT. A partir desse trabalho foi possível concluir que o modelo utilizado de HI causou lesão encefálica nos animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal e que a HT atenuou a lesão encefálica. Embora a HT não tenha mostrado um impacto significativo nas análises comportamentais, fica claro que o tratamento é benéfico em nível celular/tecidual. Os resultados também deixam clara a importância da avaliação separada de machos e fêmeas com o intuito de traçar estratégias de tratamento específicas para cada um dos sexos.

ABSTRACT

Hypoxia-ischemia (HI) is one of the main causes of death and neurological sequelae in newborns. Furthermore, in animal models of HI, differences were observed between males and females regarding the severity of brain injury. The only recommended treatment for neonatal HI is therapeutic hypothermia (TH), which consists of reducing body temperature to 33.5°C-34.5°C for 72 hours. As TH has some limitations, a better understanding of its specific effects in males and females is important to improve its clinical application. The present study evaluated the effect of short-term TH treatment on brain injury and behavioral outcomes in male and female neonatal rats submitted to the neonatal HI model. Seven-day-old male and female Wistar rats (P7) were divided into three experimental groups: SHAM (animals submitted to sham surgery), HI (animals submitted to the HI procedure), and TH (animals submitted to the HI procedure and treated with TH). For HI, the pups underwent unilateral right common carotid artery occlusion surgery and were exposed to a hypoxic atmosphere (8% oxygen) for 75 minutes. After a recovery period, the animals in the TH group were submitted to TH (body temperature reduced to 32°C) for 5 hours. At P8, the animals' reflex responses were assessed using the righting reflex, negative geotaxis, and cliff avoidance. The olfactory discrimination test was also performed. The animals were euthanized at P9 and the brains were collected for analysis of lesion volume, neuron counting using the Nissl technique, and evaluation of neuronal degeneration using the Fluoro-Jade B technique. Parametric data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc for multiple comparisons; non-parametric data were evaluated by Kruskal-Wallis followed by the Dunn test. The accepted significance was $p < 0.05$. In general, in the behavioral tests, no significant differences were observed triggered by HI or TH, only in the righting reflex, in which the females of the HI group presented lower latency. In the analysis of the volume of indirect brain injury, TH reduced the % of injury produced by HI in males. In the counting of the number of neurons, the animals of the HI group had a reduction in the total number of neurons, when compared to the SHAM group in both males and females, in the CA1 and dentate gyrus (DG) regions of the hippocampus; however, in males and females in the CA1 region, TH partially prevented neuronal death. In the Fluoro-Jade+ cell count, in the CA1 region, the animals in the HI group had more degenerating cells, which was reversed by TH in females. In DG, male animals from the HI group had a greater amount of Fluoro-Jade+ cells, which was reversed by TH. Then, it was possible to conclude that the neonatal HI model lead to a brain injury and that TH attenuated the brain injury. Although TH did not show a significant impact in behavioral analyses, it is clear that the treatment is beneficial at a cellular/tissue level. The results clarify the importance of separate assessments of males and females to outline specific treatment strategies for both sexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Causas do evento hipóxico-isquêmico.....	16
Figura 2. Mecanismo básico da hipotermia terapêutica.....	22
Figura 3. Esquema representativo do modelo de HI neonatal.....	27
Figura 4. Esquema representativo do procedimento de HT.....	28
Figura 5. Desenho experimental.....	28
Figura 6. Representação do teste comportamental de geotaxia negativa.....	31
Figura 7. Representação do teste comportamental de aversão à borda.....	32
Figura 8. Representação do teste reflexo de endireitamento.....	33
Figura 9. Representação do teste comportamental de discriminação olfatória...34	
Figura 10. Medida de lesão cerebral.....	36
Figura 11 Controle da temperatura corporal.....	39
Figura 12. Controle do peso corporal.....	40
Figura 13. Latência para realização do teste de geotaxia negativa.....	41
Figura 14. Latência para realização do teste aversão à borda.....	42
Figura 15. Latência para realização do teste reflexo de endireitamento.....	43
Figura 16. Latência para realização do teste de discriminação olfatória.....	44
Figura 17. Volume de lesão encefálica.....	46
Figura 18. Imagens representativas Nissl.....	48
Figura 19. Contagem de neurônios.....	49
Figura 20. Imagens representativas Fluoro-Jade B.....	51
Figura 21. Contagem de neurônios em degeneração.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de mortalidade dos animais	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF: fator indutor de apoptose

ATP: trifosfato de adenosina

CA1: corno de ammon-1

EHI: encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal

GD: giro denteado

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

HI: hipóxia-isquemia

HT: hipotermia terapêutica

IL-1 β : interleucina-1 beta

IL-6: inteleucina-6

NF- κ B: fator nuclear-kappa B

P5: 5^o dia pós-natal

P7: 7^o dia pós-natal

P8: 8^o dia pós-natal

P9: 9^o dia pós-natal

P21: 21^o dia pós-natal

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA	15
3. HIPÓTESE	24
4. OBJETIVO GERAL.....	24
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5.1. Animais.....	24
5.2. Aspectos Éticos	25
5.3. Peso Corporal	25
5.4. Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal	25
5.5. Hipotermia Terapêutica	27
5.6. Grupos Experimentais	29
5.7. Desenho Experimental	29
5.8. Testes Comportamentais.....	31
5.8.1. Geotaxia Negativa.....	31
5.8.2. Aversão à Borda (“Cliff Aversion”).....	32
5.8.3. Reflexo de Endireitamento	32
5.8.4. Teste de Discriminação Olfatória	33
5.9. Análises Histológicas.....	34
5.9.1. Coloração de Nissl	35
5.9.2. Volume de Lesão Encefálica	35
5.9.3. Contagem das Células	36
5.9.4. Fluoro-Jade B	37
5.9.5. Contagem de Células Fluoro-Jade +	37
5.10. Análise Estatística.....	37
6. RESULTADOS	38
6.1. Taxa de Mortalidade	38
6.2. Controle da Temperatura.....	38
6.3. Controle do Peso Corporal	39
6.4. Testes Comportamentais.....	41
6.4.1. Geotaxia Negativa.....	41
6.4.2. Aversão à Borda (“Cliff Aversion”).....	42

6.4.3. Reflexo de Endireitamento	43
6.4.4. Teste de Discriminação Olfatória	43
6.5. Volume de Lesão.....	45
6.6. Contagem de Neurônios.....	47
6.7. Contagem de neurônios em degeneração	50
7. DISCUSSÃO	53
8. CONCLUSÕES	64
9. PERSPECTIVAS	64
10. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal (EHI) é decorrente de um evento hipóxico-isquêmico durante ou antes do nascimento (Ballot et al., 2020; Kurinczuk et al., 2010). Em países subdesenvolvidos, a hipóxia-isquemia (HI) atinge 2 a 26 em cada 1000 neonatos nascidos (Douglas-Escobar & Weiss, 2015; Johnston, 2001) e está associada a um alto risco de morte ou comorbidades em recém-nascidos (Jacobs et al., 2013; Kurinczuk et al., 2010); entre 10 e 60% dos neonatos afetados morrem e 25% dos sobreviventes apresentam sequelas, dentre as quais estão déficits sensoriais, dificuldades de aprendizado e paralisia cerebral (Shankaran et al., 2012).

O evento hipóxico-isquêmico é caracterizado pela restrição de fluxo sanguíneo (isquemia) e pela privação de oxigênio (hipóxia), o que leva a mudanças no metabolismo, que passa a ser anaeróbio, e isso resulta na redução da concentração de ATP intracelular, conforme observado na Figura 1. Qualquer evento que comprometa a oferta de oxigênio e de substratos energéticos para o encéfalo no momento perinatal é fator de risco para a HI (Gluckman et al., 2001; Rennie & Robertson, 2012). Uma falha energética primária ocorre logo após o início da HI. A redução de ATP irá resultar na falha do bombeamento dos íons sódio e cálcio e entrada de água na célula, o que acarreta a formação de edema citotóxico (Gluckman et al., 2001).

Dois mecanismos distintos estão envolvidos na lesão resultante de um evento hipóxico-isquêmico, sendo o primeiro a lesão hipóxica. O encéfalo é sensível à hipóxia, principalmente o hipocampo, núcleos da base, tálamo e tronco encefálico (Vannucci et al., 1998). Essa lesão leva a uma necrose neuronal seletiva e ao status marmoratus, que se refere aos danos nos núcleos da base e tálamo. O segundo mecanismo é a lesão isquêmica, esta é causada pelo infarto focal ou hipotensão. Em adultos, a isquemia normalmente está associada à interrupção do fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais anterior, média e posterior, assim como em seus ramos (Lee et al., 2021).

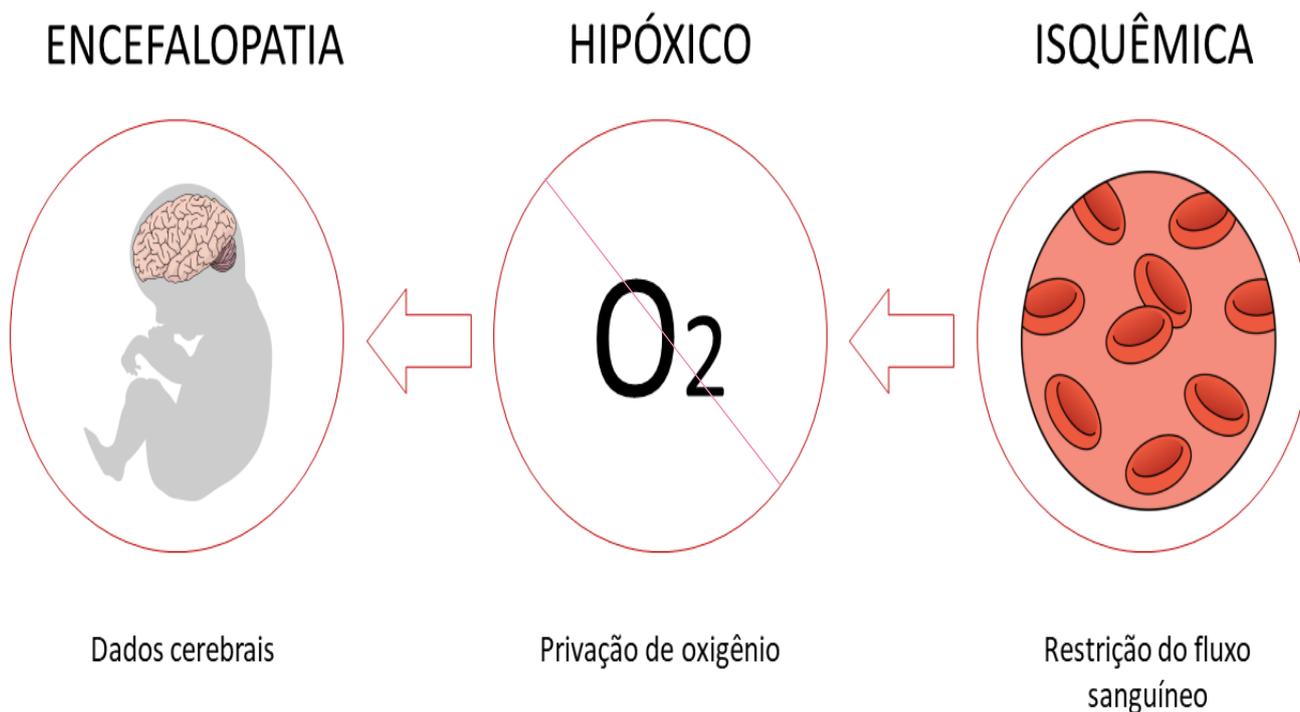


Figura 1. Causas do evento hipóxico-isquêmico. São mostradas na figura as causas dos danos cerebrais; a privação de oxigênio, juntamente com a restrição de fluxo sanguíneo cerebral são fatores de risco para a HI. Entretanto, cabe salientar que estes eventos podem se sobrepor e a própria restrição de fluxo sanguíneo leva a uma redução da disponibilização de oxigênio para o encéfalo (Figura de autoria própria).

Quando a lesão cerebral ocorre no início do desenvolvimento, ela tem como resultado a diminuição dos volumes cortical e hipocampal. O encéfalo imaturo é mais resistente à hipóxia e à falta de ATP do que o adulto; entretanto, apresenta uma maior suscetibilidade ao estresse oxidativo e à apoptose neuronal (Semple et al., 2013).

O modelo de Rice-Vannucci (Rice et al., 1981) é um modelo animal que induz uma lesão cerebral neonatal que mimetiza os danos decorrentes da HI em recém-nascidos humanos, permitindo analisar e avaliar os mecanismos neuropatológicos associados à HI neonatal, bem como delinear possíveis estratégias terapêuticas para o tratamento dessa condição. O modelo consiste na oclusão unilateral da artéria carótida comum direita ou esquerda, seguido de uma exposição do animal a uma atmosfera hipóxica contendo apenas 8% de oxigênio. A região cerebral mais afetada pela lesão hipóxico-isquêmica neste modelo animal é o hipocampo (Fabres et al., 2020; Vannucci et al., 1998).

A fisiopatologia da HI pode ser dividida em três fases, que estão descritas a seguir:

Fase aguda: essa primeira fase ocorre durante o evento hipóxico-isquêmico, tendo seu início com a interrupção do fluxo sanguíneo, seguida da redução da disponibilização de glicose e oxigênio ao encéfalo neonatal e consequente diminuição do ATP intracelular e mudanças no balanço dos gradientes eletroquímicos. Isso leva ao acúmulo de neurotransmissores, como o glutamato, no meio extracelular o que ocasiona a excitotoxicidade e o dano oxidativo (Rothman e Olney, 1995).

Fase latente: ocorre quando o fluxo sanguíneo é restaurado e por um breve momento o metabolismo cerebral se normaliza. Esse período varia de acordo com a gravidade do insulto hipóxico-isquêmico, ou seja, quanto maior o insulto, menor será o período de recuperação (Allen & Brandon, 2011; Shalak & Perlman, 2004).

Fase secundária: na qual ocorre uma segunda falha energética levando aos efeitos mais deletérios para o neurodesenvolvimento (LI et al., 1998), resultando em morte celular por apoptose ou necrose, sendo a apoptose mais predominante em lesões mais leves e a necrose em lesões mais graves (Tronnes et al., 2014; Martin et. al., 1998). Além disso, com a ruptura da membrana celular, ocorre a liberação do conteúdo celular, o que leva a um processo inflamatório adicional (Volpe & Zipurksy, 2001), o qual está associado à ativação das células da microglia. Estas células são macrófagos residentes, considerados como as células imunológicas do tecido nervoso (Wolf et al., 2017).

As células microgliais são células especializadas que possuem múltiplos papéis, como moldar e refinar a conectividade neuronal durante o desenvolvimento, assim como na plasticidade sináptica dependente da atividade, neurogênese e aprendizagem no sistema nervoso central totalmente maduro. A microglia mostra um dimorfismo sexual significativo no período neonatal e possui um papel central na masculinização do cérebro dos machos (Salter & Beggs, 2014).

A microglia possui uma enorme plasticidade em resposta a lesões (Fumagalli et al., 2018), o que pode levar à resolução ou à intensificação da lesão neural (Mallard et al., 2019). A ativação microglial se caracteriza por um espectro distinto de fenótipos, sendo os dois extremos o fenótipo M1, ou pró-inflamatório,

e o M2, ou anti-inflamatório, os quais são dependentes de sinais convergentes de estímulos inflamatórios e do ambiente celular (Vergadi et al., 2017).

No que diz respeito à lesão decorrente de um evento hipóxico-isquêmico, a microglia desempenha um papel importante tanto na formação quanto na progressão da lesão. A microglia libera diversos mediadores inflamatórios que desempenham um importante papel, tanto em condições fisiológicas, modulando o desenvolvimento normal do sistema nervoso central (SNC), quanto patológicas, na resposta do encéfalo a diversas formas de insultos ou danos. A interleucina-1 beta (IL-1 β), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6) estão entre as citocinas de resposta precoce à HI mais bem caracterizadas (Alvarez-Díaz et al., 2007; Saliba & Henrot, 2001). Elas desencadeiam a resposta inflamatória e ativam vias que levam à falha energética secundária, que ocorre de 6 a 48 horas após o evento hipóxico-isquêmico inicial (Albrecht et al., 2019).

Além da microglia, outras células gliais têm papel essencial na manutenção da homeostase do SNC. Os astrócitos, por exemplo, possuem diversas funções que vão desde manter a homeostase de água e íons e a reciclagem de neurotransmissores até a formação e manutenção da barreira hematoencefálica, sinalização imunológica e regulação da sinaptogênese neuronal (Giovannoni & Quintana, 2020).

Enquanto a microglia compreende em torno de 10% do número total de células do sistema nervoso central (SNC), os astrócitos somam em torno de 50% das células. Por fornecerem suporte trófico para os neurônios, os astrócitos são fundamentais para a formação, maturação e manutenção das sinapses (Liddel et al., 2020).

Da mesma forma que a microglia, os astrócitos respondem às mudanças que ocorrem no SNC por meio da reatividade ou ativação e com isso ocorrem as mudanças de fenótipo (Liddel et al., 2020). Os diferentes fenótipos levam à produção de diferentes mediadores pró-inflamatórios, citocinas e espécies reativas e oxigênio (Liu et al., 2012).

Quando ativados, os astrócitos podem ser tanto prejudiciais quanto benéficos na isquemia cerebral. Após um acidente vascular encefálico, o suporte de astrócitos pode ser mediado por diversos mecanismos, como a liberação de glutatona e superóxido dismutase (SOD), aumento da captação extra-sináptica

de glutamato (Bambrick et al., 2004; Sims et al., 2004) e a manutenção de gradientes de íons como o potássio (Juurlink & Walz, 2001). Além disso, uma vez ativados, os astrócitos também podem produzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, TNF- α , IL-1 α e β e interferon γ (Lau & Yu, 2004). Aumentos rápidos nos níveis dessas citocinas exacerbam uma lesão isquêmica por induzir diretamente a apoptose de células neuronais, o que leva à inibição da neurogênese (Monje et al., 2003). Além das citocinas, os astrócitos reativos também secretam quimiocinas após a isquemia, o que resulta na atração de células imunes para o sítio isquêmico e piora da lesão cerebral (Kim, 1996).

Após o insulto hipóxico-isquêmico, ocorre a formação de edema nos astrócitos, inicialmente nas extremidades, seguido de edema completo (Panickar & Noremborg, 2005). Também há a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , assim como na microglia (Melo et al., 2021).

A morte celular neuronal induzida por HI neonatal ocorre por necrose ou apoptose. A morte celular necrótica ocorre imediatamente após o insulto sendo o tipo de morte celular associada a danos irreversíveis ou graves. A apoptose ou morte celular programada é uma parte significativa da morte celular. A apoptose pode durar dias e até semanas após o insulto inicial (Mohsenpour et al., 2021). Essas alterações em nível celular podem acarretar déficits neurológicos ou até sistêmicos, que podem se manifestar como déficits cognitivos, motores e sensoriais. Portanto, os testes comportamentais se configuram como uma ferramenta útil para avaliar as respostas sensoriais e motoras e o atraso na maturação das respostas reflexas (Lubics et al., 2005; Volpe & Zipurksy, 2001) em animais submetidos ao modelo de HI neonatal e a tratamentos experimentais dessa condição.

Já foi observado que a HI contribui com o aumento da latência na execução das tarefas comportamentais em neonatos (Fan et al., 2005; Tassinari et al., 2020). Os testes de aversão à borda (ou "*cliff avoidance*"), geotaxia negativa e reflexo de endireitamento são utilizados para avaliar a integridade motora, proprioceptiva, sensorial e vestibular dos animais submetidos a modelos de lesão cerebral (Feather-Schussler & Ferguson, 2016). Além disso, o desempenho dos animais nos testes comportamentais mostra sua força e integridade neurológica (Fan et al., 2005). Outro teste utilizado é o de discriminação olfatória que avalia a capacidade do animal de reconhecer e

buscar a maravalha proveniente da caixa-moradia (Sullivan et al., 1990; Tonkiss et al., 1996).

Ao longo dos anos, diversos trabalhos vêm utilizando os testes comportamentais, porém analisando apenas animais do sexo masculino. Contudo, é de suma importância realizar essa avaliação em ambos os sexos, uma vez que as respostas à HI parecem apresentar um dimorfismo sexual (para revisão ver (Netto et al., 2017)).

Apesar da elevada prevalência de casos de encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal, as estratégias terapêuticas utilizadas na clínica ainda são bastante limitadas. Atualmente, a hipotermia terapêutica (HT) é o único tratamento preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o tratamento da HI. A HT consiste na redução da temperatura corporal e reduz o risco de morte em neonatos com encefalopatia hipóxico-isquêmica moderada a grave. O resfriamento seletivo da cabeça e o método de resfriamento de corpo inteiro são igualmente eficazes na redução da mortalidade de bebês com essa condição (Abate et al., 2021).

Acredita-se que o principal mecanismo pelo qual a HT desempenha efeitos neuroprotetores contra a lesão cerebral pós-HI seja a redução da taxa metabólica, o que evita a depleção de ATP e inibe a produção de citocinas inflamatórias (Drury et al., 2010; Roelfsema et al., 2004; Sung, 2017; Trescher & Johnston, 1997).

A HT já vem sendo usada há décadas em diferentes situações clínicas, como para evitar a proliferação de células cancerígenas e para reduzir as complicações durante cirurgias cardíacas. Nos últimos anos, o uso da HT aumentou significativamente, por se mostrar uma técnica vantajosa em diversas áreas da clínica (Algaza, 2006; Varon & Acosta, 2008). Barone e colaboradores afirmam que a hipotermia terapêutica é a abordagem mais potente para a redução da lesão cerebral isquêmica (Barone et al., 1997). Estima-se que a cada 1°C de redução na temperatura corporal, ocorra uma redução de 6% a 7% na taxa metabólica, mais especificamente no metabolismo cerebral (Alzaga et al., 2006).

Já se passou uma década desde que a HT se tornou o tratamento padrão para recém-nascidos acima das 36 semanas de gestação (Sabir et al., 2021a). A HT tem uma maior eficácia nos casos de lesão cerebral moderada, sendo que

a maioria dos estudos avalia esse grau de lesão. Porém, a HT possui algumas limitações para sua utilização, pois em neonatos com lesão severa, o tratamento possui uma baixa eficácia (Gluckman et al., 2001; Sabir et al., 2021). Além disso, ainda não se tem certeza sobre a segurança e eficácia da HT em casos de lesão cerebral leve, não sendo a mesma utilizada em pacientes com esse grau de lesão (Saw et al., 2019); o mesmo ocorre em neonatos prematuros, nos quais também não se tem certeza da eficácia da HT (Herrera et al., 2018). Considerando que a exposição à atmosfera hipóxica no presente estudo é de 75 minutos, a lesão causada é de leve a moderada.

A HT leve a moderada, ou seja, com redução da temperatura corporal para 32°C a 34°C, diminui o fluxo sanguíneo cerebral, por causar vasoconstrição. Esse mecanismo pode atuar como anticonvulsivante e diminuir a pressão intracraniana, além de auxiliar na manutenção do pH. Esse último fator é muito importante, pois durante a exposição a uma atmosfera hipóxica ocorre hiperventilação, levando à acidose metabólica (Hagberg et al., 2015). Para cada 1°C de diminuição da temperatura corporal, ocorre um aumento de 0,016 pontos no valor do pH (Alzaga et al., 2006).

O tratamento com HT em humanos deve ser iniciado em até 6 horas após o insulto hipóxico-isquêmico e deve-se reduzir a temperatura corporal do recém-nascido de 2 a 5°C durante 72 horas. A Figura 2 mostra o esquema básico da HT. Após o período de HT, deve ocorrer um reaquecimento lento, de cerca de 0,5°C por hora (Roehr et al., 2011; Shankaran et al., 2012).

COMO FUNCIONA A HIPOTERMIA TERAPÊUTICA?

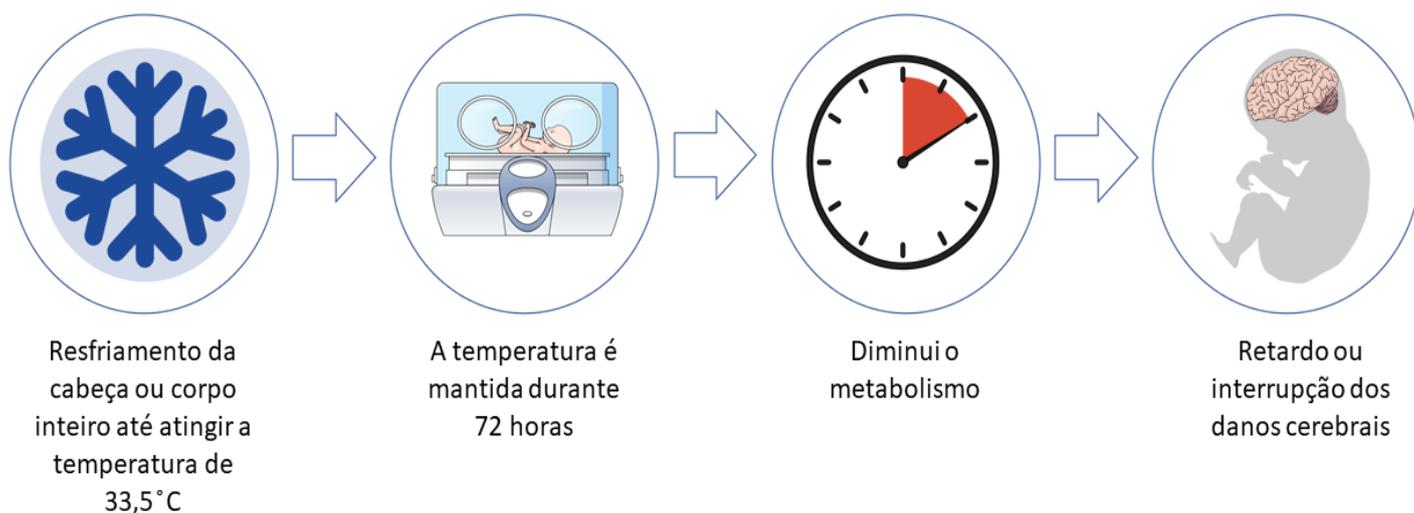


Figura 2. Mecanismo básico da hipotermia terapêutica. Representação das diferentes etapas do tratamento com a HT. Primeiramente, os neonatos são resfriados com o auxílio de uma touca térmica, para resfriar apenas a cabeça, ou com cobertores térmicos, para resfriamento do corpo inteiro, fazendo com que a temperatura corporal fique em torno de 33,5°C. Essa temperatura é mantida durante 72 horas, fazendo com que a taxa metabólica diminua e com isso o encéfalo se recupere e diminua ou interrompa a formação de danos cerebrais (Figura de autoria própria).

O dimorfismo sexual em modelos de HI é uma variável que deve ser avaliada. A hipoxia-isquemia neonatal ocorre com maior frequência em bebês do sexo masculino do que do feminino (Davidson et al., 2021). Além disso, diversos estudos utilizando o modelo animal de HI neonatal comprovaram que existem diferenças entre machos e fêmeas em diversos aspectos, como no grau de severidade da lesão e na ativação das vias de morte celular (Fabres et al., 2020; Kumar et al., 2019; Netto et al., 2017; Tassinari et al., 2020). O sexo influencia na morte celular, tanto na vulnerabilidade, quanto nos mecanismos de morte após a HI (Netto et al., 2017). Em relação à apoptose, a caspase-3 é mais ativa nas fêmeas, enquanto nos machos ocorre preferencialmente uma translocação do fator indutor de apoptose (AIF) (Zhu et al., 2006).

A eficácia do tratamento hipotérmico também apresenta relações sexualmente dimórficas. Um estudo de Wood e colaboradores (2020)

demonstrou que a HT reduziu significativamente a área de infarto, mas essa redução foi significativa apenas em fêmeas.

Dessa forma, fica claro que avaliar o dimorfismo sexual permitiria um tratamento mais adequado para cada sexo, bem como montar estratégias para que se obtenha melhores resultados na clínica.

Em um trabalho recente do nosso grupo de pesquisa, foi avaliado o efeito da hipotermia até P21 (14 dias após a lesão), com foco na avaliação comportamental. A partir desse trabalho, foi possível escolher e avaliar os melhores testes comportamentais para a idade (Nunes, 2021). A partir desses resultados a médio prazo, foi decidido avaliar o efeito agudo da hipotermia terapêutica (em P9, 48h após a indução da lesão hipóxico-isquêmica) na lesão cerebral. Isso é importante, tendo em vista que no encéfalo imaturo (P5 a P9) os principais mecanismos envolvidos na lesão hipóxico-isquêmica estão associados ao processo de apoptose (Semple et al., 2013).

Dessa forma, a avaliação em P9 permitiria verificar o papel da HT sobre a lesão aguda. A HT reduz a taxa metabólica, diminui a geração de radicais livres, evita a depleção de ATP e diminui a formação de edema. Assim, esses efeitos benéficos do tratamento com HT poderiam reduzir o volume de lesão cerebral, diminuindo a morte neuronal e, assim, melhorando os desfechos comportamentais dos animais submetidos à HI.

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a HT apresenta diversos benefícios, tais como redução da lesão cerebral, melhorando os desfechos neurológicos e reduzindo a mortalidade de neonatos após a HI. Contudo, o tratamento com hipotermia terapêutica ainda não é eficaz em todos os eventos hipóxico-isquêmicos em recém-nascidos. Além disso, as avaliações dos desfechos do tratamento a curto prazo, como avaliações histológicas de contagem de neurônios e de neurônios em degeneração são escassas na literatura, bem como a análise do dimorfismo sexual em modelos animais de HI neonatal. Considerando o acima exposto, o presente estudo integra a avaliação do efeito do tratamento com HT a curto prazo sobre a lesão encefálica, a morte neuronal e as respostas comportamentais em ratos neonatos de ambos os sexos submetidos ao modelo HI neonatal.

3. HIPÓTESE

O tratamento com HT reduzirá o volume de lesão encefálica e a morte neuronal e, conseqüentemente, produzirá melhoras nos desfechos comportamentais em ratos neonatos submetidos à HI. Os benefícios do tratamento serão mais eficazes em animais do sexo feminino.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos a curto prazo do tratamento com hipotermia terapêutica e o impacto do dimorfismo sexual sobre a lesão cerebral e o desempenho em testes comportamentais em animais neonatos submetidos à HI neonatal.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta comportamental nos testes de aversão à borda, geotaxia negativa, reflexo de endireitamento e discriminação olfatória em ratos submetidos ao modelo de HI e tratados com HT;
- Avaliar o volume de lesão cerebral a curto prazo (48 horas após a HI) em animais submetidos à HI e tratados com HT;
- Avaliar a morte celular utilizando a contagem de neurônios nas regiões CA1 e giro denteado do hipocampo em animais submetidos à HI e tratados com hipotermia terapêutica;
- Quantificar os neurônios em degeneração nas regiões CA1 e giro denteado do hipocampo em animais submetidos à HI e tratados com HT;
- Comparar os resultados obtidos entre os sexos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Neste estudo foram utilizados 112 ratos Wistar neonatos machos e fêmeas (14 ninhadas), sendo 56 de cada sexo com a idade de 7 dias (P7) e 14 ratas mães, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em caixas de polipropileno de 49 x 34 x 16 cm, com o assoalho forrado com maravalha. As ninhadas foram padronizadas após o nascimento, sendo compostas por 8

filhotes (4 machos e 4 fêmeas) mantidos com as suas respectivas ratas-mães. As mães receberam alimentação e água *ad libitum* e os animais foram mantidos sob períodos de 12 horas claro/12 horas escuro com temperatura média de 22°C e umidade relativa do ar controlada (40-60%).

5.2. Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do HCPA (nº 2019-0420) e registrado no Sistema Pesquisa da UFRGS (nº 38998). Todos os experimentos foram realizados de acordo com a resolução normativa nº13, de 20 de setembro de 2013 e a resolução normativa nº30, de 02 de fevereiro de 2016 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (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, *do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, 2011) do National Research Council of the National Academies*. As ratas-mães que não foram utilizadas no experimento (14 fêmeas adultas) foram eutanasiadas com sobredose anestésica de isoflurano na concentração de 5%, seguindo a RN nº 37 do CONCEA. Foram utilizados pontos finais humanitários conforme a resolução normativa nº 25 do CONCEA de 2015, para limitar qualquer sofrimento que não havia sido previsto e monitorar as condições gerais dos ratos filhotes. Para isso foram analisando os seguintes parâmetros: baixo peso, extremidades azuladas, cianose e condições gerais do animal. Caso necessário, era realizada a eutanásia do filhote com sobredose anestésica de isoflurano.

5.3. Peso Corporal

Os animais foram pesados em P7, P8 e P9. Para isso, os animais foram retirados das caixas-moradia e colocados em um recipiente transparente e pesados em uma balança de precisão (Marte® Ad1000).

5.4. Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal

Todo o procedimento de hipóxia-isquemia neonatal foi realizado na UEA do HCPA. Para isso, foi utilizado o modelo de Rice-Vannuci (Rice et al., 1981), previamente padronizado e descrito por outros trabalhos do grupo (Fabres et al.,

2020; Tassinari et al., 2020). Na idade de P7, os ratos neonatos foram retirados da sua caixa-moradia e mantidos em uma incubadora (Fanem®, CT186TS) até o momento da cirurgia. A incubadora era mantida na temperatura de 33°C, para que assim os ratos mantivessem sua temperatura corporal em torno de 37°C. Para os procedimentos cirúrgicos, os ratos neonatos foram colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida e anestesiados com isoflurano (5% para indução e 3-4% para manutenção). A seguir, os animais tiveram sua artéria carótida comum direita ocluída. Para isso, foi realizado um corte longitudinal com bisturi na porção ventral do pescoço, levemente à direita da linha média, com o auxílio de duas pinças cirúrgicas, anguladas em 45° os músculos foram afastados para facilitar o acesso e a visualização da carótida comum direita e permitir o isolamento do nervo vago. Após, a carótida foi ocluída permanentemente com o auxílio de dois nós feitos com fio de seda 4.0 e a incisão fechada também com fio de seda 4.0. Os ratos do grupo SHAM (ver item 5.5 para descrição dos grupos experimentais), passaram por uma cirurgia fictícia, ou seja, tiveram a manipulação, assim com os outros ratos, porém não tiveram a carótida ocluída. Todo o procedimento cirúrgico levou em torno de 5 minutos por animal. Após a cirurgia, os neonatos foram devolvidos a sua caixa-moradia, e mantidos na mesma durante 75 minutos para recuperação. Decorrido o tempo de recuperação, os ratos neonatos foram novamente retirados da sua caixa-moradia e colocados em uma câmara hipóxica, na qual foram expostos a uma atmosfera hipóxica contendo 8% de oxigênio e 92% de nitrogênio durante 75 minutos. Para isso, foi utilizado um frasco Kitasato de 2 litros, vedado com uma rolha de espuma que possuía um furo no centro para a passagem do gás, juntamente com o sensor do termômetro (Incoterm® 7664.01.0.00), para permitir o controle da temperatura ambiente do Kitasato, o qual era mantido dentro da incubadora (Fanem®, CT186TS). Como já visto anteriormente em trabalhos do grupo de pesquisa (Fabres et al., 2020; Tassinari et al., 2020), a temperatura ambiente deve ser mantida em torno de 33°C para que a temperatura dos animais se mantenha em torno de 37°C durante o período de exposição hipóxica. Decorridos os 75 minutos de exposição à atmosfera hipóxica, os neonatos foram retirados da câmara e sua temperatura foi aferida com o auxílio de um termômetro infravermelho (Incoterm® TC11000). Os neonatos do grupo SHAM

não passaram pela hipóxia e foram mantidos em uma incubadora separada, mantida em normoxia (Fanem®, CT186TS). Ao final do procedimento, os ratos neonatos voltaram para a caixa-moradia. A Figura 3 mostra um esquema do procedimento de HI neonatal.

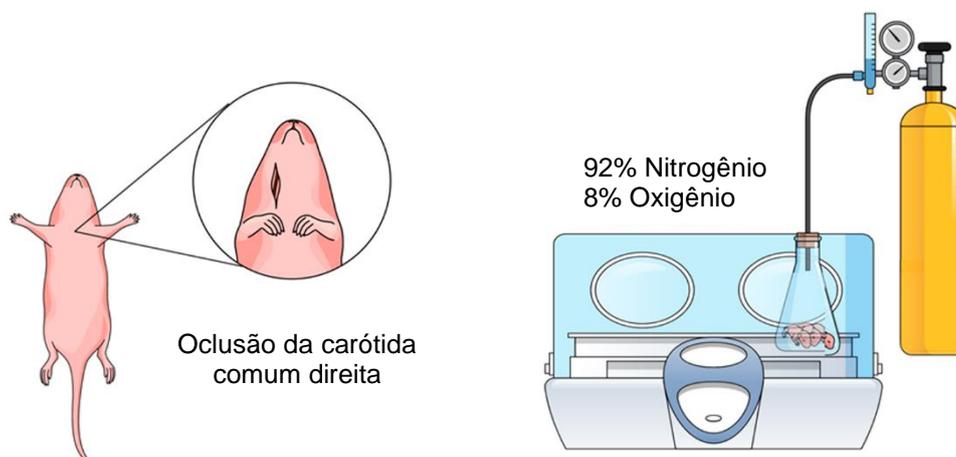


Figura 3. Esquema representativo do modelo de HI neonatal. Primeiramente é feita uma incisão na porção ventral do pescoço do animal (em P7) para o isolamento e oclusão permanente da artéria carótida comum direita. Após, os animais retornam para recuperação na sua caixa-moradia durante 75 minutos, e então são expostos a uma atmosfera hipóxica (92% de nitrogênio e 8% de oxigênio) por 75 minutos (Figura de autoria própria com base em (Tassinari., 2020).

5.5. Hipotermia Terapêutica

Para realizar o tratamento de hipotermia terapêutica, primeiramente os ratos neonatos (previamente submetidos à HI) foram resfriados com o auxílio de uma bolsa de gelo envolta por uma compressa de gaze por 10 minutos, até que atingissem a temperatura de 32°C. Após, os animais foram colocados em uma incubadora (Fanem®, CT186TS), onde havia uma caixa de acrílico com 8 divisórias e cada rato foi colocado individualmente em uma divisória, assim evitando que os animais se agrupassem (o que poderia elevar a temperatura corporal). O fundo da caixa foi forrado com maravalha proveniente da caixa moradia do animal. A HT foi realizada durante um período de 5 horas ininterruptas e a temperatura da incubadora permaneceu entre 21°C e 22°C, para que a temperatura corporal dos filhotes fosse mantida em torno de 32°C. A temperatura dos ratos neonatos foi aferida na cabeça a cada 15 minutos com o auxílio de um termômetro infravermelho (Incoterm® TCI1000). Caso a

temperatura dos ratos se aproximasse de 33°C, eram colocadas bolsas de gelo na incubadora para que a temperatura baixasse; caso a temperatura se aproximasse dos 31°C, a incubadora era ligada. Assim, foi possível manter a temperatura dos ratos em torno de 32°C. Os ratos neonatos que não foram tratados com HT foram colocados em outra incubadora mantida em 33°C para que os animais permanecessem em normotermia (temperatura corporal de 37°C; a temperatura destes animais também foi aferida a cada 15 minutos). Passadas as 5 horas de HT, os animais foram reaquecidos lentamente, em uma mesa aquecedora envolta por uma compressa de gaze, aumentando 1°C de temperatura corporal a cada 4 minutos, até atingirem a temperatura de 37°C. Assim que a temperatura de 37°C foi atingida, os animais foram devolvidos a sua caixa moradia, juntamente com os ratos que permaneceram em normotermia. A Figura 4 mostra as etapas do procedimento de hipotermia.

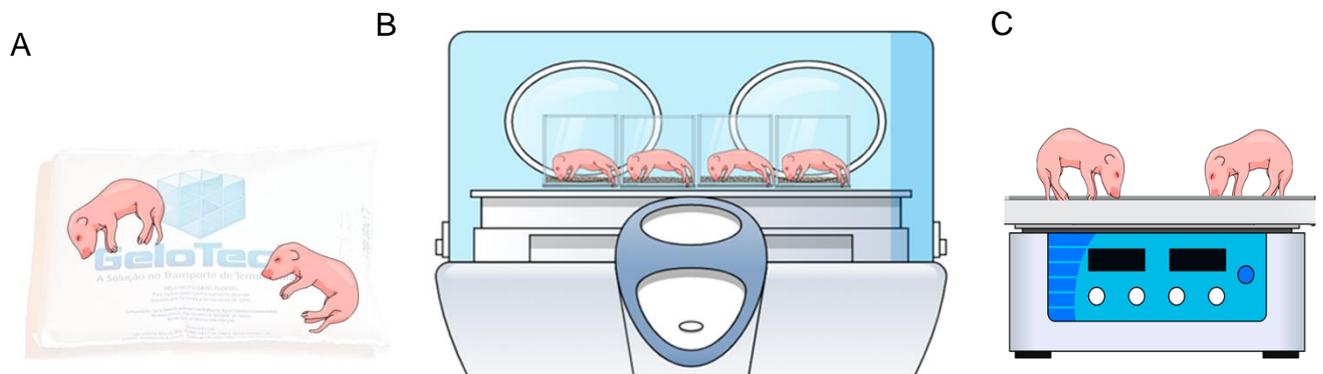


Figura 4. Esquema representativo do procedimento de HT. Primeiramente, os animais foram resfriados durante 10 minutos, até atingirem a temperatura corporal de 32°C (A); em seguida, foram alocados na incubadora (B) na qual permaneceram durante 5 horas ininterruptas, mantendo a temperatura corporal em torno de 32 °C (para isso, a temperatura da incubadora foi mantida em torno de 21°C a 22°C). A temperatura dos animais foi aferida de 15 em 15 minutos. Ao final da HT, os animais foram reaquecidos; os animais foram colocados sobre uma mesa aquecida (C) e permaneceram sobre a mesma até atingirem a temperatura de 37°C (Figura de autoria própria).

5.6. Grupos Experimentais

Para este trabalho, em P7, os ratos neonatos machos e fêmeas foram divididos em três grupos experimentais: SHAM, HI e HT (descritos abaixo).

Grupo SHAM: os animais foram submetidos a uma cirurgia fictícia, ou seja, foram anestesiados, sofreram a manipulação cirúrgica, porém não tiveram a artéria carótida ocluída, além de terem sido mantidos em normóxia e normotermia durante todo o período experimental.

Grupo HI: os animais foram submetidos ao procedimento de HI neonatal e foram mantidos em normotermia durante todo o período experimental.

Grupo HT: os animais foram submetidos ao procedimento de HI neonatal e, logo após, foram submetidos ao tratamento de hipotermia terapêutica.

5.7. Desenho Experimental

Para a realização deste trabalho, na idade de P7 os neonatos foram divididos em machos e fêmeas, pesados, marcados e distribuídos nos grupos experimentais SHAM, HI e HT. Os animais dos grupos HI e HT passaram pela cirurgia de oclusão da artéria carótida comum direita; já o grupo SHAM, passou pela cirurgia fictícia. Após a cirurgia, os neonatos foram devolvidos às suas respectivas caixas-mordida e permaneceram com a rata-mãe durante 75 minutos. Decorrido este tempo, os neonatos dos grupos HI e HT foram submetidos à hipóxia, em uma câmara com exposição a uma atmosfera contendo 8% de oxigênio durante 75 minutos, seguida de um período de recuperação de 90 minutos. Após esse tempo, os animais do grupo HT foram tratados com hipotermia terapêutica durante 5 horas. Em P8, foram realizados os testes comportamentais de geotaxia negativa, reflexo de endireitamento, aversão à borda e teste de discriminação olfatória. As eutanásias ocorreram em P9, quando os animais tiveram os encéfalos coletados. O desenho experimental está apresentado na Figura 5.

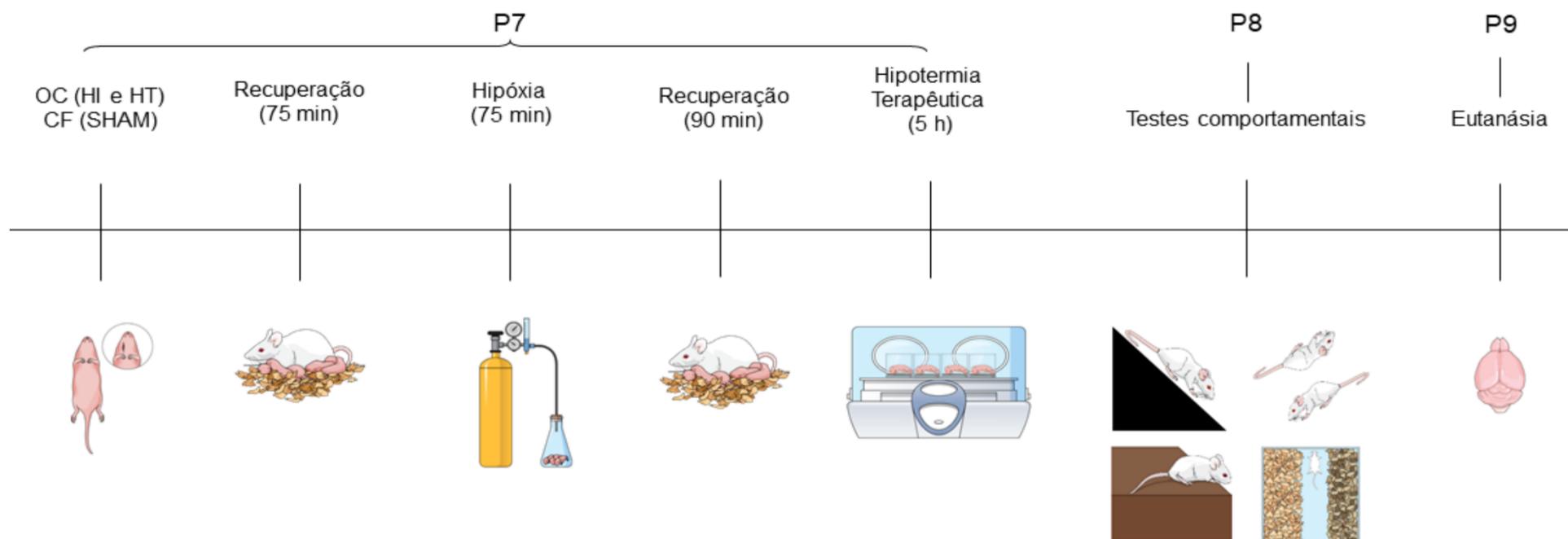


Figura 5. Desenho experimental. Em P7, primeiramente os animais dos grupos HI e HT passaram pela cirurgia de oclusão da artéria carótida comum direita (OC) e os animais do grupo SHAM passaram pela cirurgia fictícia (CF). Em seguida todos os animais foram para recuperação na sua caixa-moradia juntamente com as ratas-mães e então os animais dos grupos HI e HT foram expostos a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio) por 75 minutos (os animais do grupo SHAM foram mantidos em normóxia); após, foram para a recuperação durante 90 minutos. Posteriormente, os animais do grupo HT foram tratados com hipotermia terapêutica durante 5 horas (os animais dos grupos SHAM e HI foram mantidos em normotermia). Em P8, foram realizados os testes comportamentais de geotaxia negativa, aversão à borda, discriminação olfatória e reflexo de endireitamento. Todos os testes foram realizados no mesmo horário e na mesma ordem para todas as ninhadas. Em P9, os animais foram eutanasiados e tiveram seus encéfalos coletados para análises posteriores (Figura de autoria própria).

5.8. Testes Comportamentais

Com o objetivo de avaliar as respostas reflexas, motoras e a capacidade de reconhecer e se locomover dos neonatos, foram realizados quatro testes comportamentais.

Todos os testes foram realizados em P8, sempre no mesmo horário, das 15:00 às 19:00, iniciando pela geotaxia negativa, após a aversão à borda, seguido do reflexo de endireitamento e, por fim, do teste de discriminação olfatória.

O detalhamento dos testes está descrito nos itens, 5.8.1., 5.8.2., 5.8.3. e 5.8.4.

5.8.1. Geotaxia Negativa

Este teste avalia a coordenação motora dos neonatos (Feather-Schussler & Ferguson, 2016). Para este teste, os animais foram colocados em um plano inclinado com um ângulo de 35° , com a cabeça voltada para baixo e foi medida a latência para que o animal girasse 180° , ou seja, voltasse a cabeça para cima (conforme Figura 6), com o tempo máximo de 60 segundos (Feather-Schussler & Ferguson, 2016; Sanches et al., 2017). A estrutura inclinada possuía uma rede para que o animal conseguisse se agarrar; em caso de queda, o teste foi realizado mais uma vez ao final.

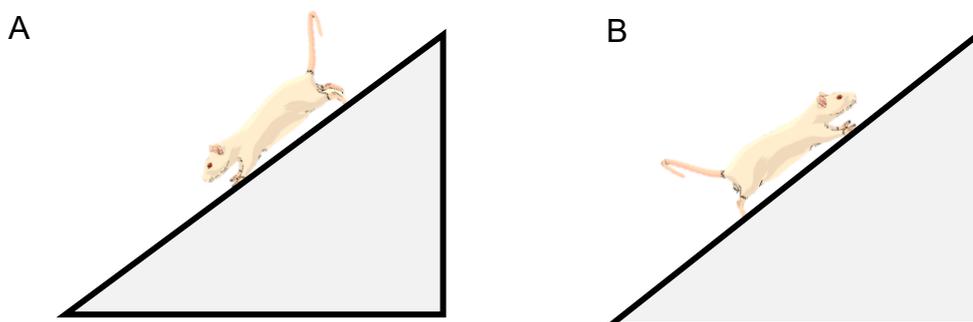


Figura 6. Representação do teste comportamental de geotaxia negativa. Imagem representativa da resposta reflexa. A é a posição inicial do animal e B a posição final (Figura de autoria própria).

5.8.2. Aversão à Borda (“Cliff Aversion”)

Este teste avalia a força e a capacidade reflexa do neonato de se afastar de uma borda elevada (Feather-Schussler & Ferguson, 2016). Para realizar este teste os animais foram posicionados com os dígitos das patas dianteiras e o focinho sobre a borda de uma caixa de 20 cm de altura (Figura 7), que foi colocada sobre a bancada. Assim como no teste anterior, a superfície sobre a qual o rato foi posicionado possuía uma rede, para que o mesmo se mantivesse firme e não caísse. Foi cronometrado o tempo que o rato levava para se afastar da borda e girar em 90°, com o tempo máximo de 30 segundos.

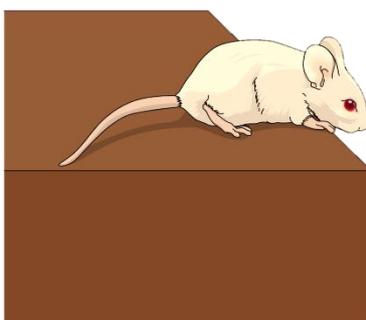


Figura 7. Representação do teste comportamental de aversão à borda. Imagem representativa da posição inicial do rato (Figura de autoria própria).

5.8.3. Reflexo de Endireitamento

Este teste avalia a resposta motora e a capacidade de reorientar a postura (Feather-Schussler & Ferguson, 2016). Para este teste, os animais foram posicionados sobre uma gaze que estava sobre a bancada, em decúbito dorsal (com as patas para cima) e então foi medida a latência para o animal retornar à posição de prona (apoiado sobre as quatro patas), conforme mostrado na Figura 8. O teste foi repetido três vezes, sendo que cada repetição ocorreu após todos os animais terem sido testados. Foi calculada a média das latências das três repetições.

A



B



Figura 8. Representação do teste do reflexo de endireitamento. Imagem representativa do teste: A representa a posição inicial do animal (em decúbito dorsal) e B a posição final, com o animal apoiada sobre as quatro patas (Figura de autoria própria).

5.8.4. Teste de Discriminação Olfatória

Este teste avalia a capacidade do animal de reconhecer e se locomover até a maravalha proveniente da caixa-moradia (Sanches et al., 2012). Os animais foram colocados em uma caixa de acrílico, com as medidas de 40 x 20 x 20 centímetros. Em um dos lados da caixa foi colocada maravalha limpa e do outro lado foi colocada maravalha proveniente da caixa-moradia do animal. A maravalha ficava disposta ocupando 12 centímetros em direção ao centro da caixa. Cada rato foi posicionado no centro da caixa (onde não havia maravalha), com a cabeça voltada para frente, e então foi medida a latência para que o rato subisse com as 4 patas em cima da maravalha. O tempo máximo para que o animal cumprisse o teste era de 120 segundos. Após a realização do teste em todos os animais, eles foram testados novamente, mas desta vez mudando o lado da maravalha proveniente da caixa-moradia: se no primeiro teste a maravalha estava posicionada à esquerda do animal, na segunda rodada a maravalha foi posicionada do lado direito (conforme Figura 9). Caso o animal subisse na maravalha limpa, foi atribuído o tempo máximo para o mesmo e, se decorridos os 120 segundos, foi considerado que o animal falhou no teste e foi atribuído 120 segundos para o mesmo também.

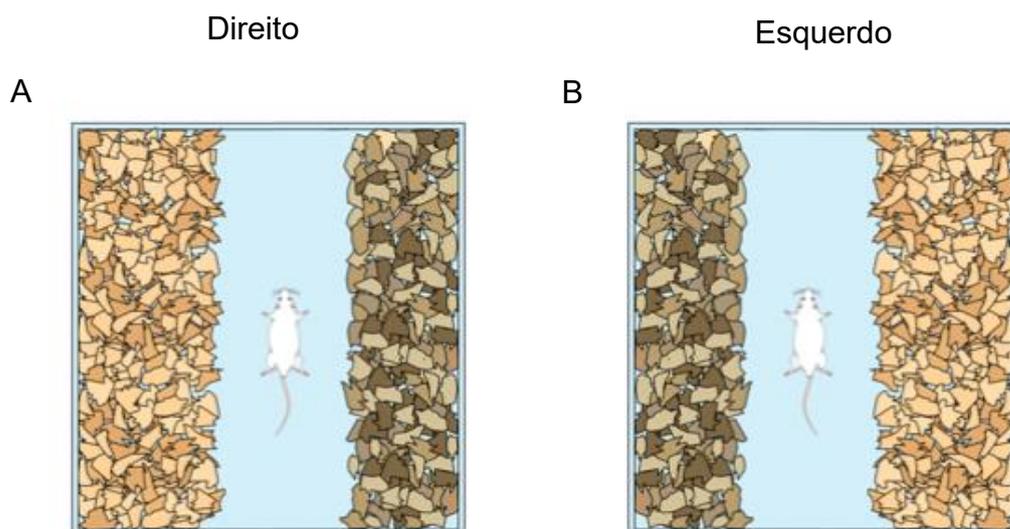


Figura 9. Representação do teste comportamental de discriminação olfatória. O teste é realizado duas vezes para cada animal, sendo que em uma delas a maravalha proveniente da caixa-moradia está posicionada do lado direito (A) e na outra a maravalha proveniente da caixa-moradia está posicionada do lado esquerdo (B) do animal (Figura de autoria própria).

5.9. Análises Histológicas

Para realizar a análise histológica, em P9 os animais foram anestesiados com isoflurano e submetidos ao processo de perfusão transcardíaca para lavagem da árvore vascular e fixação dos encéfalos. Para o procedimento de perfusão transcardíaca, os animais foram anestesiados profundamente com o auxílio de uma câmara de gás, forrada com algodão contendo isoflurano. Em seguida, foram posicionados em decúbito dorsal, e um cone nasal foi utilizado para a manutenção da anestesia (mantida com isoflurano 5%). Em seguida, os animais anestesiados foram submetidos à toracotomia para exposição do coração. Após, foi introduzido um cateter do ventrículo esquerdo até a aorta. Neste momento, foi infundida solução salina (NaCl 0,9%) com o auxílio de uma bomba peristáltica e foi feito um corte no átrio direito para que a solução saísse; em seguida, os animais foram perfundidos com paraformaldeído (PFA) 4%. O volume de solução foi calculado conforme o peso do animal, sendo utilizado 1 mL de NaCl por grama e 2 mL de PFA 4% por grama de peso corporal. Após a perfusão, os encéfalos foram dissecados e pós-fixados em PFA 4% por 24 horas;

passado esse tempo, os encéfalos foram mantidos em álcool 70% até a inclusão em parafina.

Para a inclusão em parafina, os encéfalos foram desidratados em série alcoólica crescente e, após, foram posicionados em formas plásticas e embebidos em parafina e levados à geladeira para que os blocos de parafina solidificassem. Assim que prontos, os blocos foram seccionados com o auxílio de um micrótomo (Thermo Scientific/Micron). Os cortes foram realizados a 7 µm de espessura e coletados de forma seriada em lâminas histológicas gelatinizadas com um intervalo de 105 µm entre um corte e outro (ou seja, foi coletado um corte a cada 15 cortes). Os encéfalos foram seccionados de Bregma +1,60 mm até o Bregma -4,20 mm (Khazipov et al., 2015). Os cortes foram corados conforme descrito a seguir.

5.9.1. Coloração de Nissl

A coloração de Nissl cora os corpúsculos de Nissl, que são estruturas granulares presentes nos neurônios (Junqueira & Carneiro, 2016; Li et al., 2015). Para esta coloração, as lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas 2 vezes com xilol, 5 minutos por vez, e em seguida foram colocadas em clorofórmio “overnight”. No dia seguinte, as lâminas foram reidratadas em imersão em álcool 10%, por 2 minutos, e em seguida passaram para o álcool 95% por 2 minutos. Após, as lâminas foram coradas com violeta de cresila 0,1% por 15 minutos a 40°C. Decorrido o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas com água destilada; em seguida, os cortes foram desidratados com álcool 100% por duas vezes de 5 minutos cada e, por fim, os cortes passaram por xilol, duas vezes de 5 minutos cada. As lâminas foram finalizadas com meio de montagem (Permount®) e cobertas com lamínulas.

5.9.2. Volume de Lesão Encefálica

Para a análise do volume de lesão encefálica, imagens dos cortes corados com Nissl foram capturadas utilizando um scanner com resolução de 1200 x 1200 dpi e as áreas dos hemisférios ipsilateral e contralateral foram medidas com o auxílio do software ImageJ (NIH, Bethesda, EUA). Para obter o volume de “lesão direta”, foi realizado o seguinte cálculo: Σ área da lesão x intervalo de cortes.

Para obter o percentual do volume de “lesão indireta”, isto é, o volume de lesão ipsilateral relativo ao volume do hemisfério contralateral (em percentual), foi aplicada a seguinte fórmula (Sun et al., 2015).

$$\text{Volume de lesão encefálica (\%)} = \frac{\text{volume do hemisfério contralateral} - \text{volume do hemisfério ipsilateral}}{\text{volume do hemisfério contralateral}} \times 100$$



Figura 10. Medida de lesão cerebral. A figura representa as áreas que foram delimitadas e utilizadas para os cálculos dos volumes. No primeiro corte temos o lado ipsilateral e o lado contralateral, no segundo temos a área de lesão, no terceiro o hemisfério ipsilateral e no último corte o hemisfério contralateral à lesão. Orientação da figura: Do, dorsal; V, ventral; D, direito, E, esquerdo. Barra de calibração 0,5 cm (Figura de autoria própria com base em Buscemi e colaboradores (Buscemi et al., 2021)).

5.9.3. Contagem das Células

Os cortes corados com Nissl também foram utilizadas para realizar as capturas das imagens nas áreas de CA1 e do giro denteado do hipocampo do Bregma -2,60 mm ao Bregma -3,00, com o objetivo de realizar a contagem dos neurônios piramidais. As imagens foram capturadas com um microscópio invertido (Zeiss) com o aumento de 400x. Foram contados todos os neurônios piramidais presentes no campo (área de 3800 μm^2). Para essa análise foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental e foram capturados cinco cortes por animal (para cada corte, foram capturadas 6 imagens, sendo elas: hipocampo ipsilateral e contralateral, CA1 ipsilateral e contralateral e GD ipsilateral e contralateral).

5.9.4. Fluoro-Jade B

Para avaliar a degeneração neuronal (Schmued et al., 1997), foi utilizada a técnica de Fluoro-Jade B. Para isso, as lâminas foram desparafinizadas 2 vezes com xilol, 5 minutos por vez, e em seguida, hidratadas por imersão em álcool, nas concentrações de 100%, 90%, 80% e 70%. Após, foram realizadas quatro lavagens, a primeira com água destilada por 2 minutos, a segunda com permanganato de potássio (0,06%) durante 10 minutos, a terceira com PBS três vezes, durante 5 minutos cada vez e, por fim, as lâminas foram lavadas novamente com água destilada. Após, as lâminas foram mergulhadas na solução contendo o corante Fluoro-Jade (0,0004%) por 20 minutos e lavadas com PBS três vezes, durante 5 minutos cada vez. Por fim, as lâminas foram lavadas com PBS três vezes, o excesso de líquido foi retirado e as lâminas foram montadas com meio de montagem (Fluoromount®) e cobertas com lamínulas.

5.9.5. Contagem de Células Fluoro-Jade+

Assim que coradas com Fluoro-Jade B, as lâminas foram utilizadas para realizar as capturas das imagens nas áreas do hipocampo de CA1 e giro denteado (Bregma -2,60 mm a -3,00 mm), com o objetivo de quantificar os neurônios em degeneração. As imagens foram capturadas com um microscópio invertido (Zeiss) com o aumento de 400x, utilizando o filtro verde para Fluoro-Jade. Foram contados todos os neurônios piramidais marcados com Fluoro-Jade B presentes no campo (área de 3800 μm^2). Foram capturados cinco cortes por animal (6 imagens por corte, sendo elas: hipocampo ipsilateral e contralateral, CA1 ipsilateral e contralateral e GD ipsilateral e contralateral).

5.10. Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Os dados não-paramétricos foram avaliados por Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn. Para o teste de discriminação olfatória foi utilizado ANOVA de duas vias (fatores avaliados: sexo e lado da maravalha proveniente da caixa-moradia ou grupo experimental e lado da maravalha), seguida de Tukey. A significância aceita foi de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Taxa de Mortalidade

Para esta dissertação foram usadas 14 ninhadas, cada uma com 8 neonatos, totalizando 112 animais. Destes, 8 morreram nos grupos HI (2 machos e 3 fêmeas) e HT (1 machos e 2 fêmeas), correspondendo a uma taxa de mortalidade de 7,14%. As mortes ocorreram durante a cirurgia ou durante a hipóxia, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Taxa de mortalidade dos animais ao longo dos experimentos

	Nº de animais	%
Total de animais	112	100%
Animais que morreram	8	7,14%
Causas da morte		
Rompimento da carótida	6	5,36%
Durante a hipóxia	2	1,78%

6.2. Controle da Temperatura

Durante as 5 horas do tratamento com hipotermia terapêutica, os animais dos grupos SHAM e HI foram mantidos em normotermia, ou seja, com a temperatura corporal em torno de 37°C; já nos animais do grupo HT, a temperatura corporal foi mantida em torno de 32°C. Na Figura 11, pode-se observar os valores da temperatura dos animais de todos os grupos experimentais ao longo das 5h de hipotermia, tanto em machos (A) quanto em fêmeas (B).

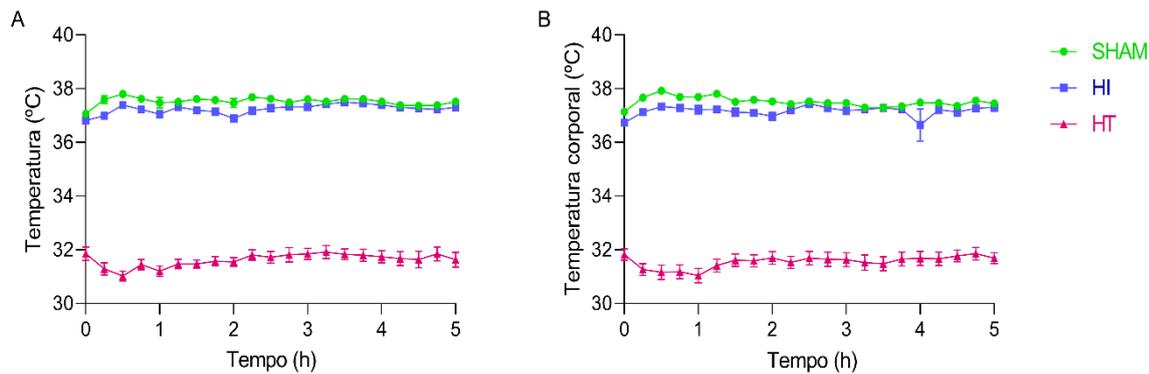


Figura 11. Temperatura corporal dos animais durante o procedimento de hipotermia. A temperatura corporal dos animais machos (A) e fêmeas (B) foi aferida a cada 15 minutos. A temperatura dos animais dos grupos SHAM e HI se manteve em torno dos 37°C e a temperatura do grupo HT se manteve em torno dos 32°C. Os resultados estão apresentados como média±erro padrão da média.

6.3. Controle do Peso Corporal

O peso corporal dos animais foi verificado nas idades de P7, P8 e P9 (ao longo de todo experimento). Conforme mostrado na Figura 10, todos os animais ganharam peso, porém isto não ocorreu na mesma proporção nos animais dos grupos HI e HT quando comparados ao grupo SHAM. Em P8 e P9, nos machos (Figura 10A) dos grupos HI e HT, o peso corporal foi menor em relação ao grupo SHAM e nas fêmeas. (Figura 10B) também foi observado um menor peso corporal no grupo HT em relação ao SHAM, tanto em P8 quanto em P9.

Para permitir uma análise do perfil do peso ao longo dos 3 dias de avaliação, foi analisada a área sob a curva (ASC) dos pesos dos animais, conforme mostrado na Figura 10. A ASC dos animais dos grupos HI e HT foi significativamente menor em relação ao grupo SHAM. Além disso, a ASC dos animais HT foi menor em relação aos animais do grupo HI, o que foi observado tanto em machos ($F_{(2,48)} = 0,67$; $p=0,515$) quanto em fêmeas ($F_{(2,46)} = 2,11$; $p=0,113$).

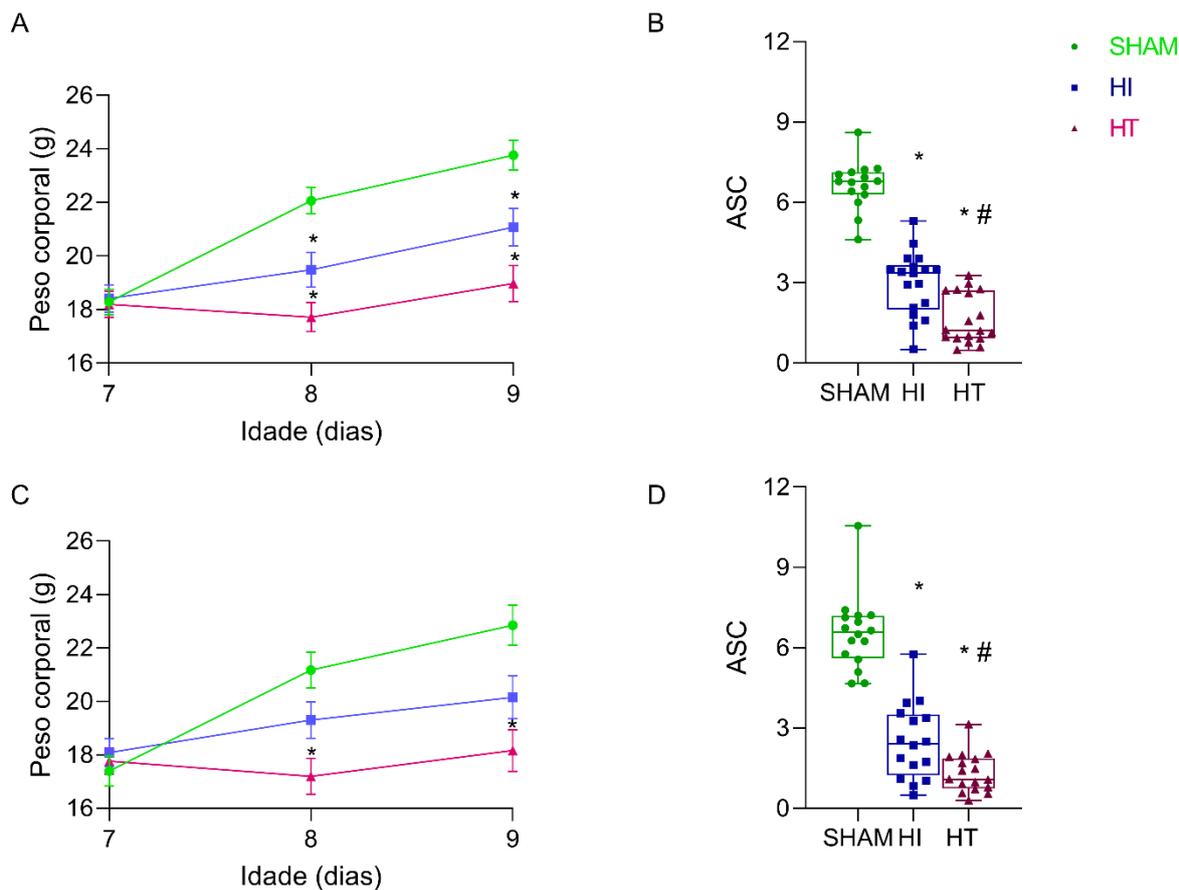


Figura 12. Peso corporal. Os animais foram pesados de P7 até P9. Nos machos dos grupos HI e HT (A), nas idades de P8 e P9, o peso corporal foi menor em relação ao grupo SHAM. Nas fêmeas do grupo HT (C), nas idades de P8 e P9, o peso corporal foi menor em relação ao grupo SHAM. (* $p < 0,05$, ANOVA seguida de Tukey). Em relação à área sob a curva (ASC), foi observada uma diferença nos grupos HI e HT em relação ao grupo SHAM. Além disso, um menor valor de ASC foi observado nos animais do grupo HT, em relação ao grupo HI, tanto em machos (B) quanto em fêmeas (D) (* $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM; # $p < 0,05$ em relação ao grupo HI).

6.4. Testes Comportamentais

6.4.1. Geotaxia Negativa

Conforme observado na Figura 12, na análise da geotaxia negativa, a ANOVA não demonstrou diferenças significativas entre os grupos na latência para a execução do teste, nem em machos (A) ($F_{(2,49)}= 4,09$; $p=0,022$), nem nas fêmeas (B) ($F_{(2,47)}= 2,68$; $p=0,078$).

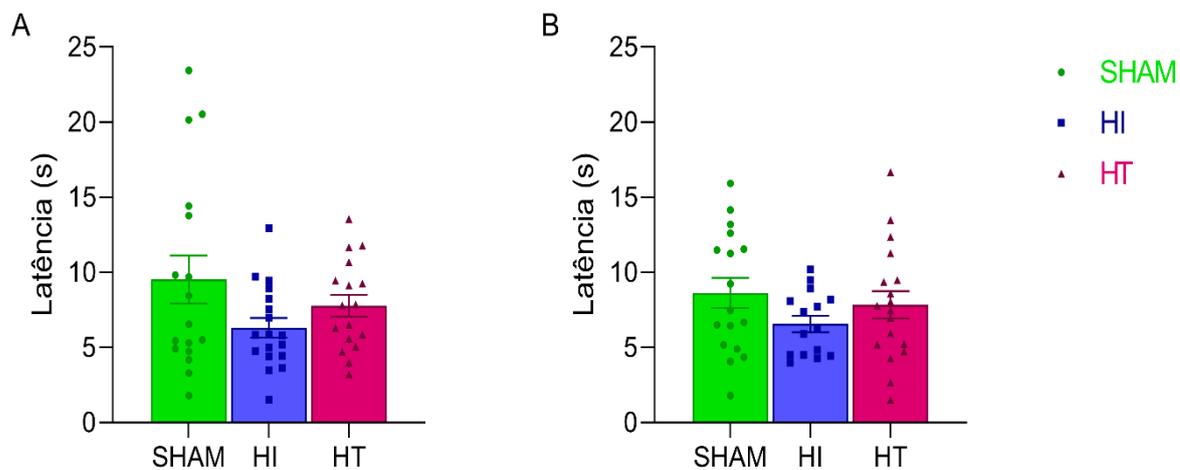


Figura 13. Latência para a realização do teste de geotaxia negativa. Não houve diferença significativa entre os grupos, tanto em machos (A), quanto em fêmeas (B). Resultados representados como média±erro padrão da média ($p<0,05$, ANOVA seguida de Tukey).

6.4.2. Aversão à Borda (“Cliff Aversion”)

Conforme mostrado na Figura 13, na análise do comportamento de aversão à borda, o teste de Kruskal-Wallis, não detectou diferenças significativas entre os grupos, tanto em machos (A), quanto em fêmeas (B) (machos: $H_{(2)}=24,05$; $p<0,001$; fêmeas: $H_{(2)}=28,85$; $p<0,001$).

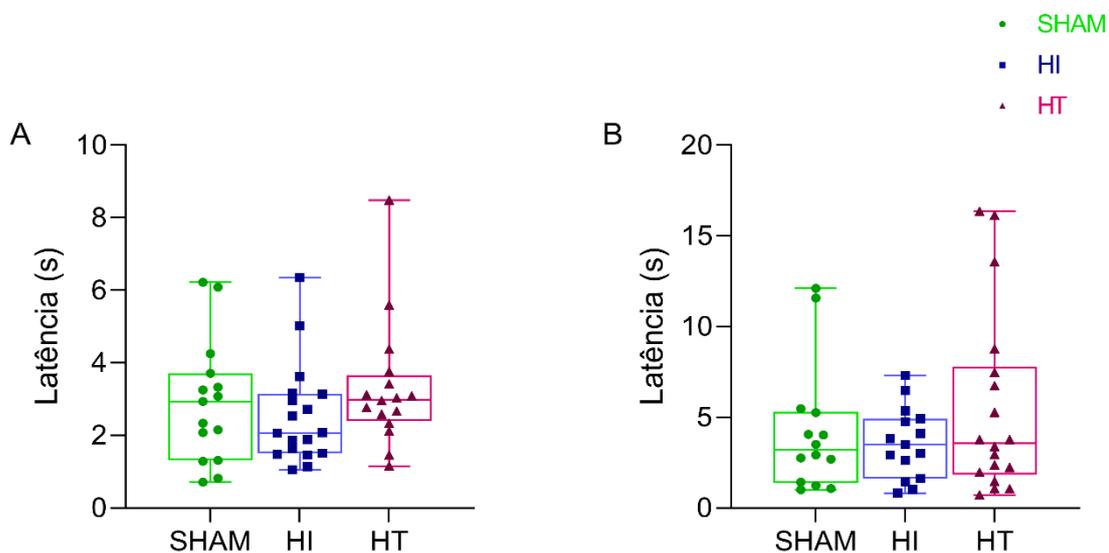


Figura 14. Latência para a realização do teste de aversão à borda. Não houve diferença significativa entre os grupos, em ambos os sexos, machos (A) e fêmeas (B). Resultados apresentados como mediana, intervalos interquartis (25º e 75º percentis) (caixas) e valores mínimo e máximo (barras). ($p>0,05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn).

6.4.3. Reflexo de Endireitamento

Conforme mostrado na Figura 14, no reflexo de endireitamento, a ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos na latência para completar o teste em machos (A) ($F_{(2,49)} = 4,09$, $p = 0,0226$). Entretanto, as fêmeas (B) do grupo HI tiveram uma menor latência em comparação ao grupo SHAM ($F_{(2,48)} = 1,94$, $p = 0,1551$).

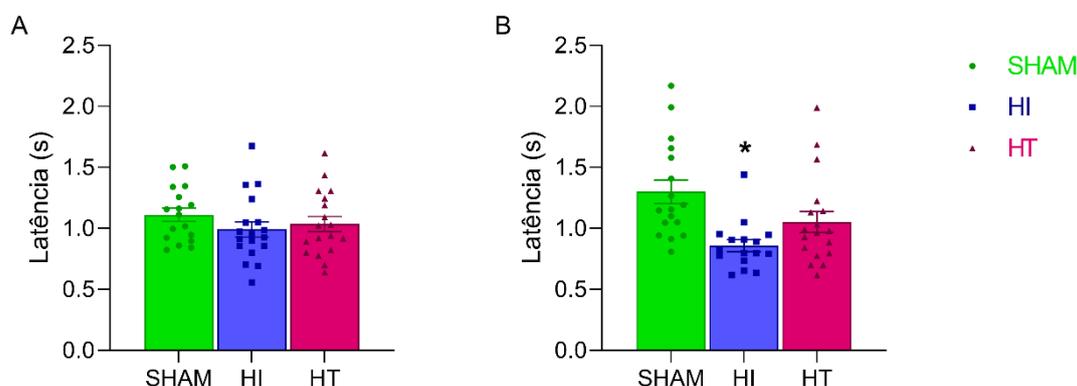


Figura 15. Latência para a realização do teste de reflexo de endireitamento. Não houve diferença significativa entre os grupos nos machos (A). Já nas fêmeas (B), os animais do grupo HI tiveram uma menor latência em comparação aos animais do grupo SHAM. Resultados representados como média \pm erro padrão da média (* $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM, ANOVA seguido de Tukey).

6.4.4. Teste de Discriminação Olfatória

Conforme mostrado na Figura 15, no teste de discriminação olfatória, a ANOVA de duas vias seguida de Tukey não demonstrou efeito dos fatores sexo e lado da maravalha proveniente da caixa-moradia (direito ou esquerdo), tanto em machos (A e C), quanto em fêmeas (B e D) (machos: $F_{(2,99)} = 0,153$; $p = 0,554$; fêmeas: $F_{(2,95)} = 0,225$; $p = 0,918$). Também não se observou interação entre os fatores (machos: $F_{(2,99)} = 0,153$; $p = 0,8577$; fêmeas: $F_{(2,95)} = 0,0855$; $p = 0,918$). Também não se observou efeito dos fatores grupo experimental e lado da maravalha (machos: $F_{(1,99)} = 0,351$; $p = 0,182$; fêmeas: $F_{(1,95)} = 1,124$; $p = 0,291$), os quais também não mostraram interação (machos: $F_{(2,99)} = 0,139$; $p = 0,870$; fêmeas: $F_{(2,95)} = 0,085$; $p = 0,798$).

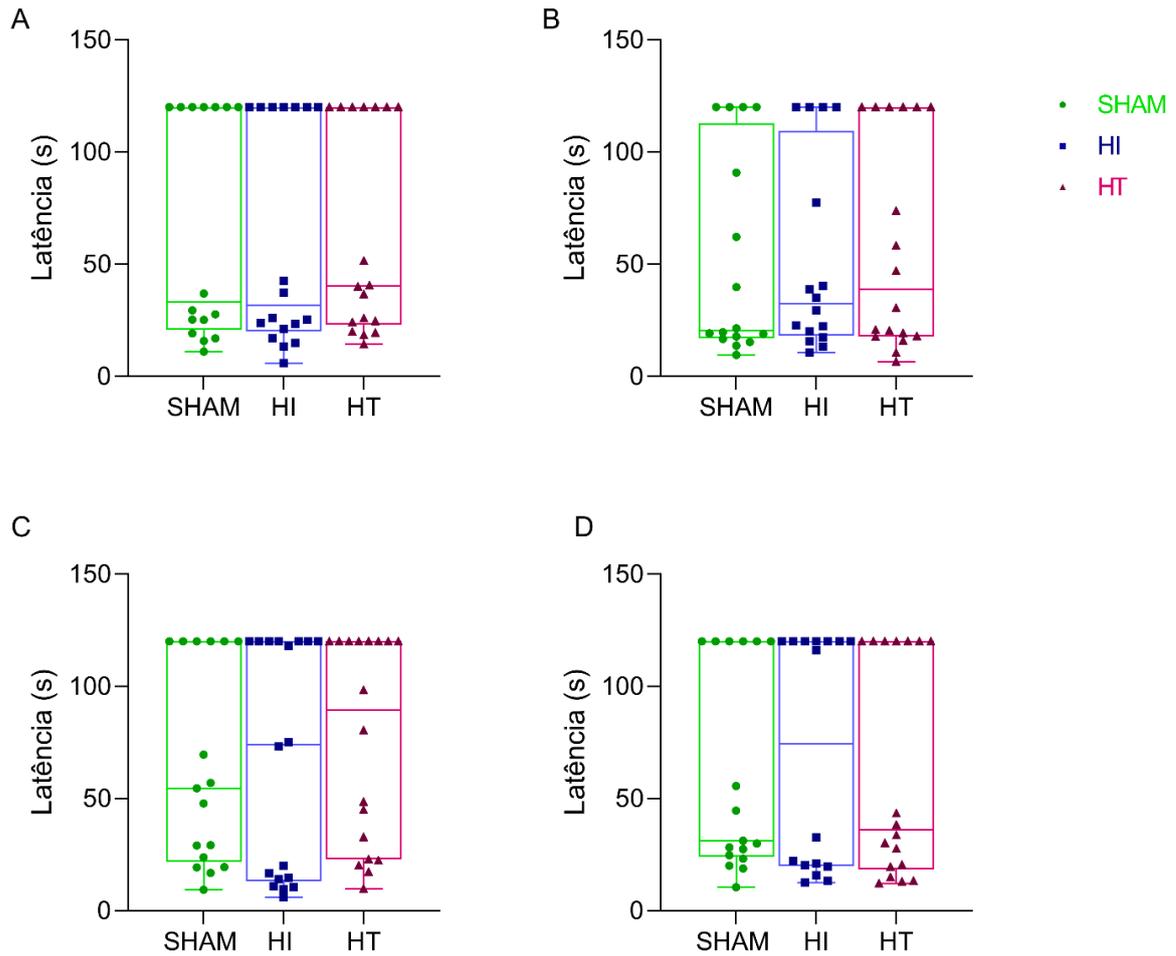


Figura 16. Latência para a realização do teste de discriminação olfatória. Não foram observadas diferenças significativas em machos (A e C) e em fêmeas (B e D), nem quanto a maravalha proveniente da moradia estava do lado direito (A e B), nem quando estava do lado esquerdo (B e D). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Dados expressos como mediana, intervalos interquartis (25º e 75º percentis) (caixas) e valores mínimo e máximo (barras). ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguida de Tukey).

6.5. Volume de Lesão

A Figura 17A mostra as imagens representativas de cortes dos encéfalos dos animais experimentais, nos quais é possível observar a lesão produzida pela HI. Em B e C, está apresentada a porcentagem do volume de lesão encefálica indireto, ou seja, expresso em relação ao volume do hemisfério contralateral, em machos (B) e fêmeas (C). Podemos observar que nos machos (B) os animais dos grupos HI e HT tiveram um maior volume (%) de lesão encefálica, quando comparados aos animais do grupo SHAM; entretanto quando comparados os animais dos grupos HI e HT, houve diferença significativa com uma redução do volume de lesão nos animais do grupo HT ($F_{(2,12)}=1,142$; $p=0,351$). Nas fêmeas, os animais dos grupos HI e HT tiveram um maior percentual de volume de lesão encefálica, quando comparados aos animais do grupo SHAM (C) ($F_{(2,12)}=0,4011$; $p=0,678$). Em D e E está apresentado o volume de lesão encefálica direto, sendo possível observar que nos machos (D) os animais dos grupos HI e HT tiveram uma lesão maior, quando comparados ao grupo SHAM ($F_{(2,12)}=1,838$; $p=0,201$). O mesmo padrão de resposta foi observado nas fêmeas (E), com os animais dos grupos HI e HT apresentando um maior volume de lesão em comparação ao grupo SHAM ($F_{(2,12)}=2,852$; $p=0,097$).

6.6. Contagem de Neurônios

A Figura 18 ilustra o resultado das contagens de neurônios corados com violeta cresila. As fotomicrografias representam os grupos SHAM, HI e HT em machos e fêmeas, mostrando o hipocampo ipsilateral à lesão no aumento de 50x e as respectivas regiões de interesse, CA1 e giro denteado (GD), no aumento de 400x. Nestas regiões, foi contado o número total de neurônios nos lados ipsilateral e contralateral à lesão. Na Figura 19, os gráficos de A-D apresentam os resultados das contagens de neurônios nas regiões de interesse, no aumento de 400x, na região de CA1. No lado ipsilateral à lesão, os animais machos (A) dos grupos HI e HT apresentaram um menor número de neurônios quando comparado aos animais do grupo SHAM; entretanto, os animais do grupo HT tiveram um número ligeiramente maior de neurônios em relação ao grupo HI ($F_{(2,71)}=5,636$; $p=0,053$). No lado contralateral à lesão, nos animais machos (B), não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($F_{(2,72)}=0,496$; $p=0,610$). As fêmeas dos grupos HI e HT apresentaram um menor número de neurônios em relação ao grupo SHAM no lado ipsilateral à lesão; quando comparados os animais dos grupos HI e HT, os animais do grupo HT tiveram um melhor desfecho, com um maior número de neurônios em relação ao grupo HI (C) ($F_{(2,72)}=1,977$; $p=0,145$). Não houve diferença significativa nas fêmeas no hemisfério cerebral contralateral à isquemia carotídea (D) ($F_{(2,72)}=3,745$; $p=0,028$). Os gráficos de E-H apresentam os resultados das contagens de neurônios nas regiões de interesse, no aumento de 400x, na região do GD. No lado ipsilateral à lesão, os animais machos dos grupos HI e HT tiveram um menor número de neurônios em relação ao grupo SHAM (E) ($F_{(2,69)}=0,869$; $p=0,423$); já no lado contralateral, não houve diferença significativa entre os grupos (F) ($F_{(2,72)}=0,718$; $p=0,490$). Nas fêmeas, no lado ipsilateral à lesão, os animais dos grupos HI e HT apresentaram um menor número de neurônios em comparação ao grupo SHAM (G) ($F_{(2,66)}=0,496$; $p=<0,0001$) e no hemisfério contralateral (H) não houve diferença significativa entre os grupos (H) ($F_{(2,70)}=3,836$; $p=0,026$).

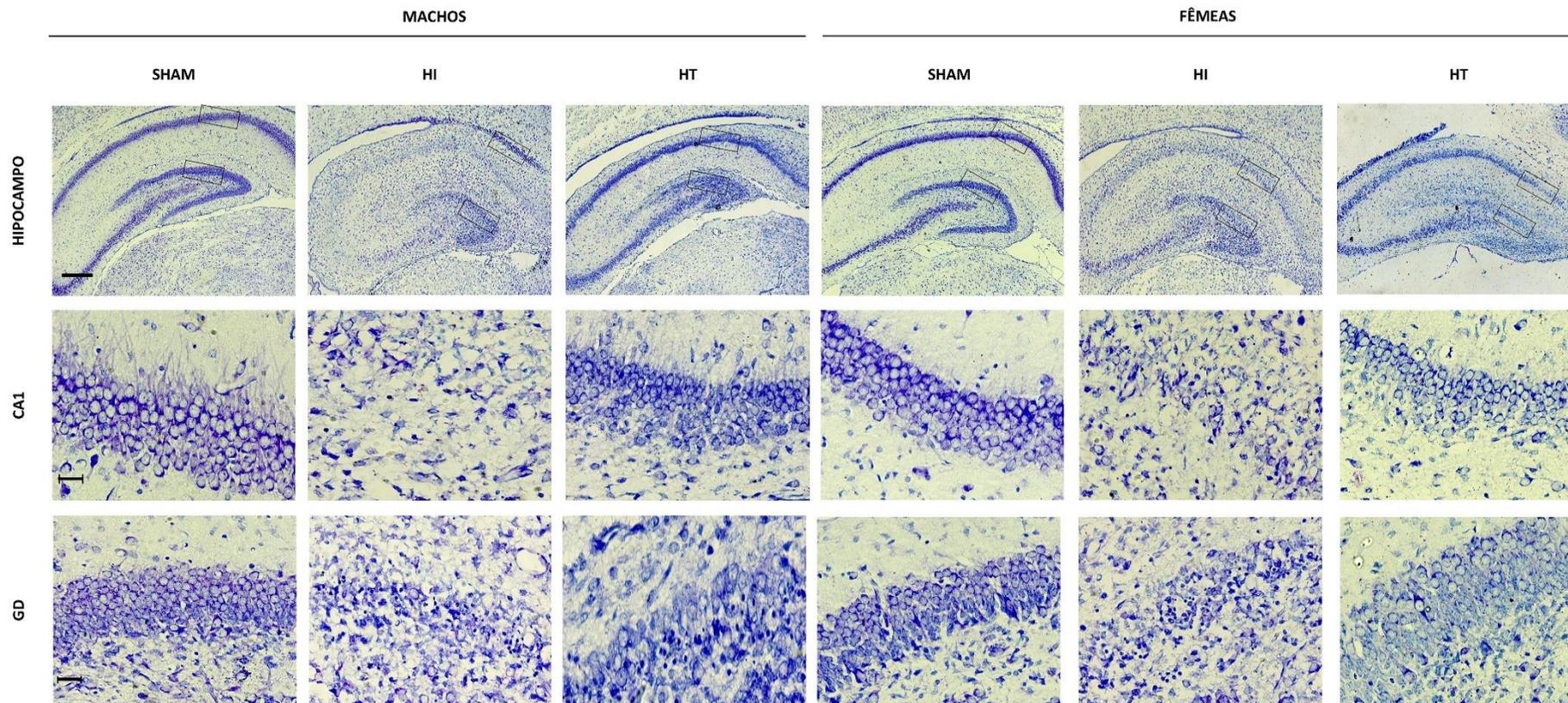


Figura 18. Imagens representativas dos cortes histológicos do hipocampo corados pela técnica de Nissl. A figura mostra fotomicrografias do hipocampo ipsilateral e as áreas representativas das regiões de interesse óptico utilizadas nas contagens de neurônios, sendo elas CA1 e GD. Na primeira linha horizontal está o hipocampo, com o aumento de 50x e nas linhas seguintes está a ampliação em 400x da área de interesse óptico das duas regiões (CA1 e GD). Barra de calibração 100µM.

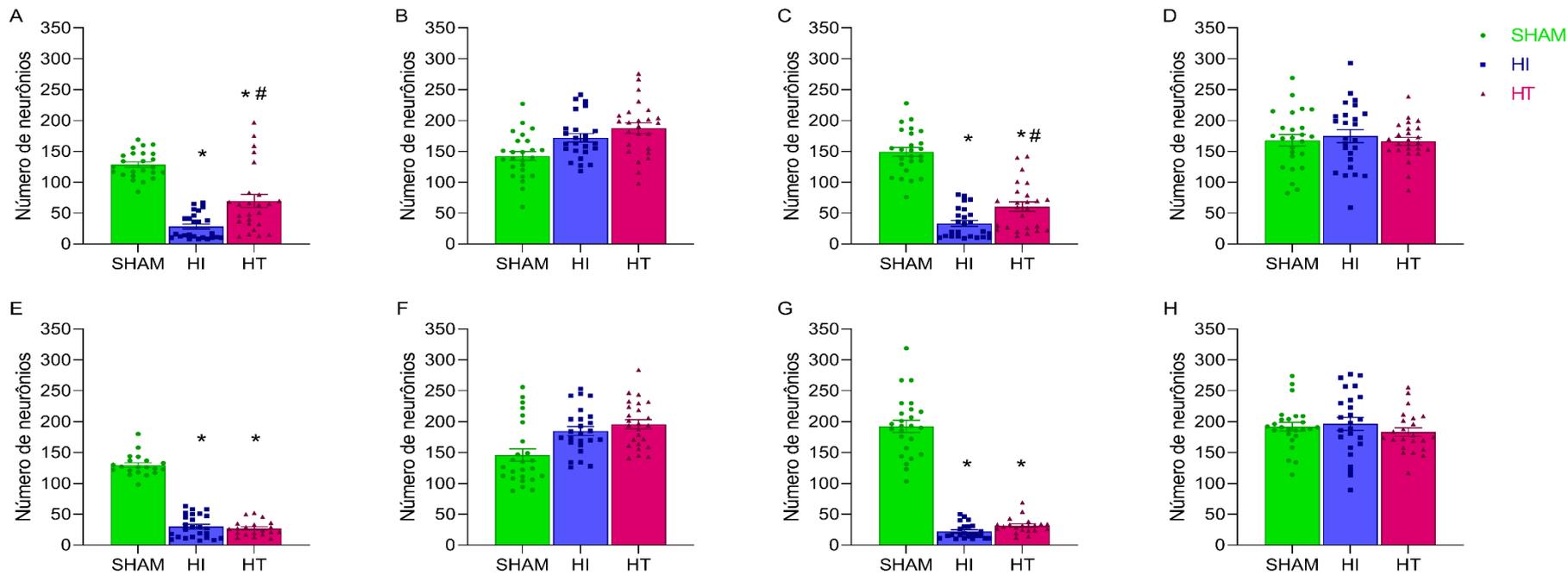


Figura 19. Contagem de neurônios: As figuras A-D representam as contagens na região de CA1 e as figuras E-H representam as contagens na região do GD. Em A os animais machos dos grupos HI e HT tiveram um menor número de neurônios no hemisfério ipsilateral quando comparados aos animais do grupo SHAM, enquanto os animais do grupo HT tiveram um maior número de neurônios em relação ao grupo HI. Em B, nos animais machos não houve diferença significativa entre os grupos no hemisfério contralateral. Em C, as fêmeas dos grupos HI e HT obtiveram um menor número de neurônios em relação ao grupo SHAM no hemisfério ipsilateral à lesão e quando comparados os animais dos grupos HI e HT, os animais do grupo HT obtiveram um maior número de neurônios. Na Figura D, não houve diferença significativa nas fêmeas no hemisfério contralateral à lesão. Em E, os animais machos dos grupos HI e HT tiveram um menor número de neurônios em relação ao grupo SHAM no lado ipsilateral. Em F, não houve diferença significativa entre os grupos nos animais do sexo masculino, no giro denteado contralateral. Em G, as fêmeas dos grupos HI e HT apresentaram um menor número de neurônios em comparação ao grupo SHAM no giro denteado ipsilateral à lesão. Em H, não houve diferença significativa entre os grupos nas fêmeas, no giro denteado contralateral. Resultados representados como média±erro padrão da média (* $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM; # $p < 0,05$ em relação ao grupo HI; ANOVA seguida de Tukey).

6.7. Contagem de neurônios em degeneração

A Figura 20 ilustra o resultado das contagens de neurônios em degeneração marcados com Fluoro-Jade B. São mostradas fotomicrografias dos grupos SHAM, HI e HT em machos e fêmeas, nas regiões de interesse CA1 e GD, no aumento de 400x nos lados ipsilateral e contralateral à lesão. Nestas regiões, foi contado o número de neurônios em degeneração. A Figura 21, mostra os gráficos com os resultados destas contagens. De A-D estão apresentados os resultados das contagens de neurônios em degeneração nas regiões de interesse, no aumento de 400x, na região de CA1. No lado ipsilateral à lesão, os animais machos do grupo HI tiveram um maior número de neurônios em degeneração quando comparados aos animais do grupo SHAM (A) ($F_{(2,12)}=2,510$; $p=0,122$), enquanto no lado contralateral à lesão, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (B) ($F_{(2,12)}=2,667$; $p=0,1101$). Nas fêmeas, no lado ipsilateral à lesão, os animais dos grupos HI e HT apresentaram um maior número de neurônios em degeneração, quando comparados ao grupo SHAM, e quando comparados os animais dos grupos HI e HT, os animais do grupo HT tiveram uma menor degeneração (C) ($F_{(2,12)}=3,418$; $p=0,066$); já no lado contralateral à lesão, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais na região de CA1 das fêmeas (D) ($F_{(2,12)}=6,000$; $p=0,015$). Os gráficos de E-H apresentam os resultados das contagens de neurônios marcados com Fluoro-Jade B nas regiões de interesse, no aumento de 400, na região do GD. No lado ipsilateral à lesão, os animais machos do grupo HI tiveram um maior número de neurônios em degeneração em relação ao grupo SHAM e quando comparados os animais dos grupos HI e HT, os animais do grupo HT tiveram um menor número de neurônios em degeneração (E) ($F_{(2,12)}=1,400$; $p=0,284$); já no lado contralateral, não houve diferença significativa (F) ($F_{(2,12)}=1,667$; $p=0,229$). Nas fêmeas, no lado ipsilateral à lesão, os animais dos grupos HI e HT apresentaram um maior número de neurônios em degeneração, quando comparados ao grupo SHAM (G) ($F_{(2,12)}=2,402$; $p=0,136$) e no lado contralateral não houve diferença significativa entre os grupos (H) ($F_{(2,70)}=6,000$; $p=0,015$).

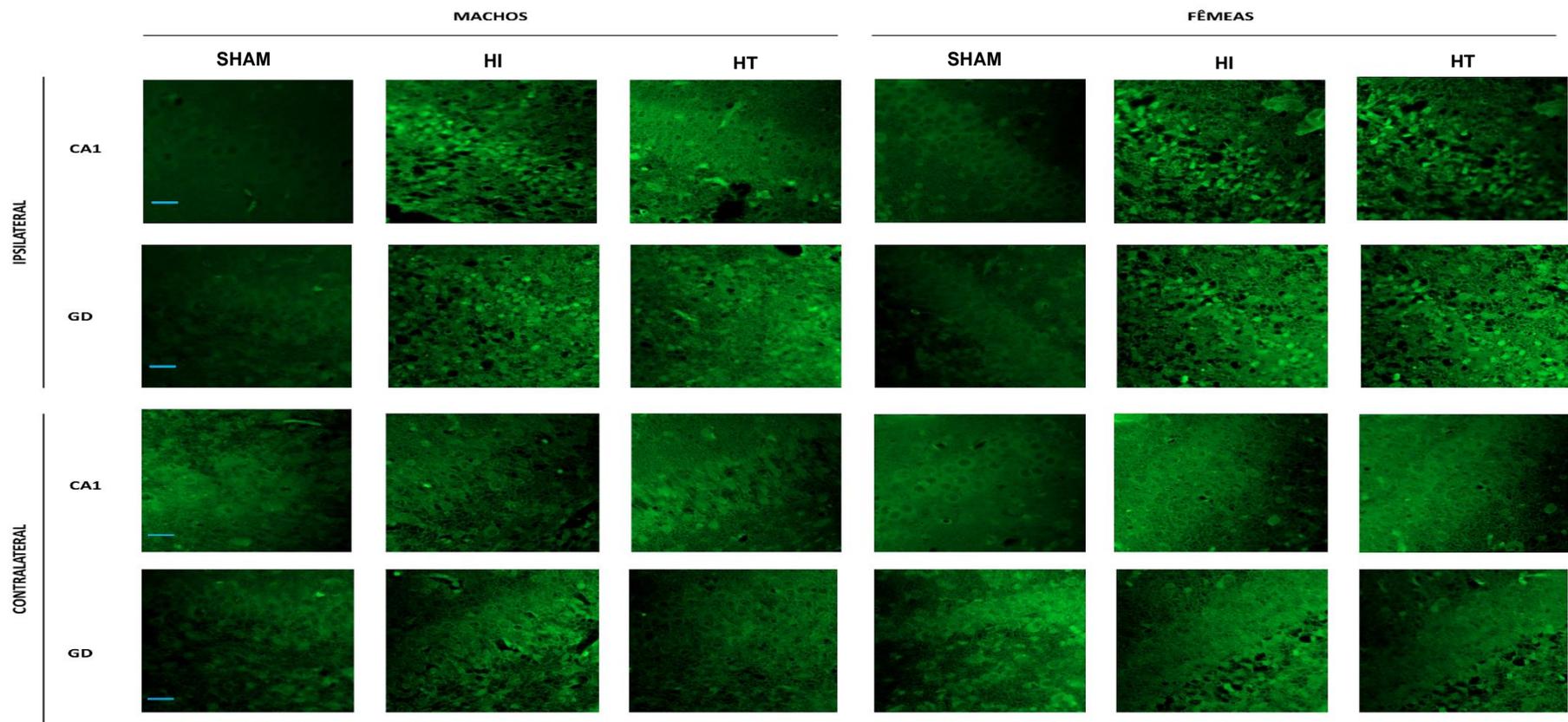


Figura 20. Contagem de neurônios em degeneração marcados com Fluoro-Jade B. A figura mostra fotomicrografias nos lados ipsilateral e contralateral à lesão e as áreas representativas das regiões de interesse óptico utilizadas nas contagens de neurônios corados pela técnica de Fluoro-Jade B, sendo elas CA1 e GD. Na primeira linha horizontal está a região de CA1, com o aumento de 400x e na segunda linha está representada a região do GD, com o aumento de 400x, ambas do lado ipsilateral à lesão. Na terceira e quarta linha as mesmas regiões, do lado contralateral à lesão. Barra de calibração 100µM.

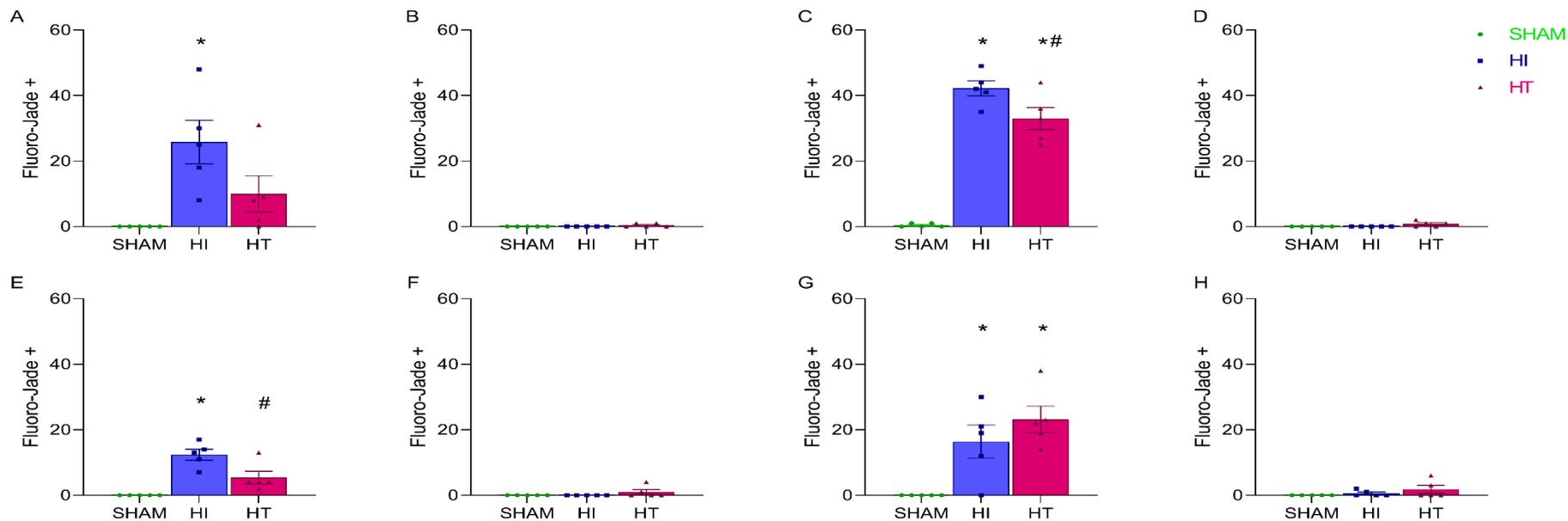


Figura 21. Contagem de neurônios marcados com Fluoro-Jade B: As figuras A-D representam as contagens na região de CA1 e as figuras E-H representam as contagens na região do GD. Em A os animais machos do grupo HI tiveram um maior número de neurônios em degeneração quando comparados aos animais do grupo SHAM. Em B, nos machos, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais no hemisfério contralateral. Em C, no lado ipsilateral, as fêmeas do grupo HI tiveram um maior número de neurônios em degeneração em relação ao grupo SHAM e quando comparados os animais dos grupos HI e HT, os animais do grupo HT tiveram uma menor quantidade de células Fluoro-Jade+. Em D, nas fêmeas, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais no hemisfério contralateral. Em E, os animais machos do grupo HI tiveram um maior número de neurônios em degeneração em relação ao grupo SHAM; quando comparados os animais dos grupos HI e HT, os animais do grupo HT tiveram um menor número de neurônios em degeneração no hemisfério ipsilateral. Em F, não houve diferença significativa entre os grupos nos animais do sexo masculino no hemisfério contralateral. Em G, nas fêmeas, os animais dos grupos HI e HT apresentaram um maior número de neurônios em degeneração em comparação ao grupo SHAM no lado ipsilateral. Em H, não houve diferença significativa entre os grupos nas fêmeas, no hemisfério contralateral. Resultados representados como média±erro padrão da média (*p<0,05 em relação ao grupo SHAM; #p<0,05 em relação ao grupo HI; ANOVA seguida de Tukey).

7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a curto prazo os efeitos da hipotermia terapêutica, bem como seu possível papel neuroprotetor, em ratos submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia neonatal. Foram avaliados o peso corporal, parâmetros comportamentais e o volume de lesão encefálica, além de ter sido realizada a contagem de neurônios hipocâmpais, bem como das células em processo de degeneração.

Para avaliar os efeitos da HI neonatal em animais, foi utilizado o modelo de Rice e Vannucci (Rice et al., 1981). No presente estudo, a mortalidade foi de 7,14%. Isso pode ser explicado em parte pelo tempo utilizado de hipóxia, que foi de 75 minutos, enquanto outros estudos utilizam tempos maiores de hipóxia, de 90 minutos a 120 minutos (Sabir et al., 2021; Wood et al., 2020). Já foi demonstrado que o tempo de hipóxia, assim como a temperatura e a umidade do ar atuam diretamente na severidade da lesão (Sabir et al., 2021; Wood et al., 2020). A taxa de mortalidade de trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa utilizando esse modelo foi em torno de 20% com o tempo de hipóxia de 90 minutos (Fabres et al., 2020) e de 13% com 60 minutos de hipóxia (Tassinari et al., 2020). Porém, nestes dois trabalhos anteriores, houve uma maior manipulação dos animais, pois os experimentos envolviam a administração (subcutânea ou intraperitoneal) de possíveis agentes neuroprotetores em diferentes momentos pós-HI, gerando uma maior estresse e perda de peso dos animais, fatores esses que podem contribuir para a mortalidade. Além do fato que o presente estudo só acompanhou os animais por 48 horas (P9), enquanto os trabalhos citados acima acompanharam até P21, sendo que nesse período de P9 até P21 pode ocorrer uma maior mortalidade.

De maneira geral, os animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal apresentam uma lesão no hemisfério ipsilateral à artéria carótida ocluída, sendo observados danos principalmente no córtex cerebral, substância branca periventricular, no estriado, no tálamo e no hipocampo. Esses danos não são observados no hemisfério contralateral (Vannucci & Hagberg, 2004). Esse mesmo padrão de lesão foi o resultado obtido com este trabalho, comprovando

assim que o modelo está bem padronizado e sendo executado de maneira correta.

Os danos causados pela HI variam de morte neuronal, por necrose e apoptose ao infarto generalizado na região, podendo ocorrer a associação destes (Johnston, 2001; Rice et al., 1981).

A HT é usada na prática clínica por possuir efeitos neuroprotetores em lesão cerebral após um evento hipóxico-isquêmico (Chakkarapani et al., 2021; Hobbs et al., 2008). Porém, ela possui algumas limitações: sua janela terapêutica é curta, devendo ser iniciada em até 6 horas após o evento hipóxico-isquêmico em humanos (Alzaga et al., 2006; Sabir et al., 2021; Varon & Acosta, 2008). Isso se torna um desafio para pacientes de localidades mais distantes de hospitais que realizam o tratamento. Sabendo dessa limitação, é importante que se entendam os mecanismos pós-HI desencadeados pela HT, para que assim haja um melhor direcionamento de pesquisas voltadas para terapias complementares e um aprimoramento na aplicação da HT em recém-nascidos humanos.

Para que esse atraso no início do tratamento hipotérmico fosse mimetizado em nosso modelo, após os 75 minutos de hipóxia os ratos neonatos permaneceram em recuperação durante 90 minutos, ou seja, o tempo que os ratos permaneceram com as ratas-mãe. Só após esse período de recuperação é que o procedimento de HT foi iniciado. Um trabalho prévio de nosso grupo já avaliou o início da HT em diferentes momentos (janelas terapêuticas) e mostrou que o tratamento hipotérmico é efetivo se iniciado em até 2 horas após a HI em ratos (Fabres et al., 2021). A partir desses resultados, o presente estudo iniciou o tratamento 1h30 minutos após a hipóxia e a HT teve duração de 5 horas. Na clínica humana, é recomendado um reaquecimento lento após a hipotermia, com uma taxa de 0,5°C por hora (Roehr et al., 2011). Contudo, na literatura, existem poucos estudos avaliando o efeito do reaquecimento e seus benefícios. Devido aos possíveis efeitos do reaquecimento, neste trabalho o reaquecimento (dos 32°C para os 37°C) durou em torno de 20 minutos.

O peso corporal pode fornecer informações sobre os efeitos protetores da HT, sabendo que a HI pode levar a déficits motores, que causam dificuldades de alimentação e afetam o ganho de peso dos animais (Fabres et al., 2020).

O resultado do peso corporal mostrou uma redução no ganho de peso nos animais dos grupos HI e HT quando comparados ao grupo SHAM. Trabalhos

anteriores do grupo também já observaram essa redução (Fabres et al., 2020; Nunes, 2021). Isso pode estar relacionado aos déficits motores causados pela HI (Lubics et al., 2005; Volpe & Zipurksy, 2001). Recentemente, um estudo observou que a exposição isolada de animais neonatos à HT, sem indução prévia de nenhum tipo de lesão, diminuiu o ganho de peso dos animais, sugerindo que a HT pode ter um efeito no ganho de peso. O estudo utilizou o modelo de anóxia, no qual não ocorre a oclusão da artéria carótida comum, e foram utilizados ratos neonatos com 30 horas de vida, ou seja, o equivalente a um recém-nascido humano prematuro (Matsuda et al., 2021). Estes dados estão de acordo com o presente estudo, onde se observa que a HT não é capaz de prevenir a perda de peso causada pela HI, provavelmente porque a própria HT tem um impacto sobre o ganho.

Para verificar se os déficits motores e cognitivos causados pela HI influenciam nas demais condições dos animais, foram realizados testes comportamentais. É importante que ao avaliar o resultado do tratamento para a lesão cerebral induzida pela HI, se avaliem as respostas comportamentais, não somente apenas a lesão cerebral em si (Fan et al., 1997).

Além disso, apesar de muitos estudos utilizarem apenas animais neonatos do sexo masculino, tem ficado cada vez mais clara a importância de se avaliar o dimorfismo sexual (Netto et al., 2017). Isso motivou a realização da avaliação comportamental separadamente em machos e fêmeas no presente estudo.

O reflexo de endireitamento foi o único teste comportamental que apresentou uma diferença significativa entre os grupos experimentais. Essa diferença foi observada nas fêmeas do grupo HI, que apresentaram uma menor latência para a execução do teste, em relação aos animais do grupo SHAM. Esse teste avalia a função e coordenação motora dos animais, é um reflexo rápido e seus resultados são conflitantes na literatura. Há relatos que as fêmeas do grupo HI são mais afetadas (Peterson et al., 2015) e outros que os machos são os mais prejudicados (Huang et al., 2016). Outros estudos sugerem que há uma maior latência neste reflexo nas idades iniciais em metodologias que utilizam de 90 a 120 minutos de hipóxia (Jatana et al., 2006; Roumes et al., 2021). Uma possível explicação para a redução da latência no grupo HI é que talvez o menor peso corporal possa facilitar a execução do comportamento motor. Entretanto,

isso não explica a ausência de alteração na latência nas fêmeas do grupo HT e nos machos dos grupos HI e HT (que também tiveram um menor peso em relação ao SHAM). Mais estudos são necessários para avaliar de maneira correta a contribuição de fatores neurológicos para os resultados comportamentais.

O teste de geotaxia negativa tem o objetivo de avaliar a coordenação motora dos neonatos (Feather-Schussler & Ferguson, 2016). Os machos têm uma maior tendência a serem vulneráveis aos danos analisados por este teste (Huang et al., 2016; Waddell et al., 2016). Porém, neste estudo, não houve diferença no desempenho dos animais entre os grupos experimentais nem entre os machos, nem entre as fêmeas. Na literatura, é discutida a utilização deste teste em roedores neonatos, uma vez que seus resultados são controversos. Alguns autores defendem que animais não-lesionados parecem desempenhar um comportamento oposto, que denominam de 'geotaxia positiva', orientando-se com a cabeça para a base do plano inclinado, ao invés de para o ápice, e que o comportamento pode ocorrer em resposta à instabilidade postural causada pela inclinação, e não à gravidade (Kreider & Blumberg, 1999; Motz & Alberts, 2005). Isso corrobora estudos basais que observaram que os animais nem sempre apresentavam a tendência a orientar-se com o focinho para cima no plano inclinado, sendo esse comportamento dependente da inclinação do plano, ou até mesmo do substrato (Kreider & Blumberg, 1999).

O "*cliff avoidance*" é um teste que avalia a força e a capacidade reflexa do neonato de se afastar de uma borda elevada (Feather-Schussler & Ferguson, 2016). Neste teste não foram observadas diferenças dimórficas entre os grupos. Estudos já demonstraram que animais que passaram pela HI levam mais tempo para desenvolver a resposta neste teste (Lubics et al., 2005; Rocha et al., 2021). O mesmo foi visto em um trabalho do grupo, onde foi observada uma menor latência nas fêmeas do grupos HI em P12 (Nunes, 2021), o que não foi observado em P8, no presente estudo. Em um modelo de hidrocefalia em camundongos neonatos, foi observado um aumento da latência no teste de aversão à borda (Femi-Akinlosotu & Shokunbi, 2020; Robinson et al., 2018).

O teste de discriminação olfatória tem o objetivo de avaliar a capacidade do animal de reconhecer e se locomover até a maravalha proveniente da caixa-moradia (Tonkiss et al., 1996). Buelke-Sam e colaboradores (1984) descreveram

que neonatos machos são mais sensíveis, ou seja, respondem melhor a estímulos olfatórios, quando comparados às fêmeas. No presente estudo, os neonatos foram testados duas vezes, com a finalidade de avaliar se o lado da maravalha proveniente da caixa-moradia influenciava na resposta dos ratos, uma vez que em cada teste a maravalha era posicionada do lado direito, ipsilateral, e do lado esquerdo, contralateral à lesão. Porém, não houve diferença significativa entre os animais dos grupos SHAM, HI e HT de ambos os sexos. Na literatura são encontrados dois estudos, ambos do mesmo grupo de pesquisa, que utilizam este comportamento para avaliar os efeitos da HI (Sanchez et al., 2012, 2015), nos os animais que passaram pela HI apresentaram a mesma latência, tanto em machos quanto em fêmeas.

De modo geral, os resultados comportamentais do presente estudo são consistentes com um trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa (Nunes, 2021), no qual foi feito um acompanhamento dos animais de P8 até P21. Foi observado que em P8 não houve diferença significativa nos testes comportamentais, nem em animais do grupo HI, nem em animais do grupo HT, de ambos os sexos. Um estudo mostra que os animais submetidos à HI tendem a ter um pior desempenho em testes comportamentais devido à integridade neurológica, assim como o baixo peso corporal nos animais que passaram pela HI, contudo, essas deficiências parecem ser recuperáveis (Fan et al., 2005). Além disso, a idade da realização do teste parece ser outro fator importante.

Os déficits sensório-motores observados nos testes comportamentais refletem o comprometimento da funcionalidade do sistema nervoso, sendo possível inferir o grau de dano a partir desses resultados. Contudo, é importante, também, realizar análises diretas de dano ao tecido encefálico, com a avaliação histopatológica da lesão (Schaar et al., 2010). Neste trabalho, os resultados confirmam que o procedimento de HI foi capaz de produzir lesão encefálica, observada no hemisfério ipsilateral à isquemia, quando comparado ao lado contralateral. A HT não reverteu totalmente a lesão causada pela HI a curto prazo. Em cortes corados com cresil violeta, pode-se observar, nos grupos HI e HT, qualitativamente, que o hemisfério contralateral apresentou coloração em todos os grupos, enquanto o lado ipsilateral dos grupos HI e HT apresentou uma perda dessa coloração (apresentando-se esbranquiçado), o que reflete a perda de células nessa região. Por outro lado, nos animais do grupo SHAM, o aspecto

do hemisfério ipsilateral é semelhante ao do contralateral, não lesionado, uma vez que esses animais passaram pelos procedimentos cirúrgicos de maneira fictícia, não tendo sua carótida ocluída e sendo mantidos em normoxia. Essa coloração é uma característica da técnica de Nissl, técnica que cora os corpúsculos de Nissl, estruturas granulares presentes em neurônios (Junqueira & Carneiro, 2016; Li et al., 2015), sendo essa técnica utilizada por diversos estudos para quantificar o volume de lesão e realizar a contagem de neurônios (Alonso-Alconada et al., 2012; Biran et al., 2006; Derugin et al., 2005; Hattori et al., 2015; Pathipati et al., 2021; Rocha-Ferreira et al., 2019; Teo et al., 2017).

Com o objetivo de se calcular o volume de lesão encefálica, foram feitas duas medidas, a direta e a indireta. A medida direta fornece o valor absoluto da lesão, enquanto a indireta é um percentual relativo ao lado contralateral à lesão, com isso é possível corrigir a diferença no tamanho dos hemisférios entre os animais e um possível edema (Sun et al., 2015).

Independentemente do sexo, todos os animais que passaram pelo procedimento hipóxico-isquêmico (ou seja, grupos HI e HT) apresentaram uma lesão evidente no hemisfério cerebral ipsilateral à oclusão carotídea. Quando avaliado o volume de lesão encefálica indireto (% do hemisfério ipsilateral), foi observado que nos animais machos a lesão do grupo HI foi parcialmente revertida pela HT. Contudo, nas fêmeas, a HT não reverteu os danos causados pela HI, não havendo diferença significativa entre os grupos HI e HT. Essas respostas distintas entre machos e fêmeas sugerem a existência de um dimorfismo sexual sobre o parâmetro avaliado, além de indicar um efeito neuroprotetor da hipotermia nos machos.

Por outro lado, na avaliação do volume de lesão encefálica de maneira direta, a lesão produzida pela HI não foi reduzida pelo tratamento com HT (embora nos machos seja possível observar uma tendência de reversão).

Em um estudo utilizando o modelo de HI neonatal em ratos Wistar, com a HT sendo realizada durante todo o período de hipóxia, foi avaliado o efeito do tratamento hipotérmico em ambos os sexos e foi observada uma tendência na redução do volume de lesão encefálica (Smith et al., 2016). O mesmo foi observado no presente estudo, no qual os animais machos tratados com hipotermia apresentaram uma redução no volume de lesão indireto e uma tendência à redução do volume de lesão encefálica direta.

Sabe-se que nas primeiras horas após a HI, ocorre uma resposta inflamatória, que contribui para a morte celular e para o aumento do volume de lesão (Lucas et al., 2006). Entretanto, a HT tem como principal mecanismo a redução da taxa metabólica, o que evita a depleção de ATP e inibe a produção de citocinas inflamatórias (Drury et al., 2010; Roelfsema et al., 2004; Sung, 2017; Trescher & Johnston, 1997).

Em relação ao processo inflamatório, em animais submetidos a HI, já foi observado que os animais machos têm maior ativação microglial, além de uma resposta inflamatória periférica maior em comparação às fêmeas (Mirza et al., 2015). Sabe-se que a infiltração de leucócitos, contribui para o aumento da lesão encefálica já nas fases iniciais (ElAli & LeBlanc, 2016; Mülling et al., 2021; Palmer et al., 2004). Tem sido descrito que, em comparação com as fêmeas, há um pior desfecho nos machos, que apresentam maior volume de lesão, bem como uma maior ativação inflamatória na fase inicial, com uma maior ativação microglial, maiores níveis de citocinas inflamatórias e maior infiltração de leucócitos no tecido nervoso (Al Mamun et al., 2018; Mirza et al., 2015a; Villapol et al., 2019). Entretanto, na avaliação a curto prazo, parece que a HT conseguiu reverter esse processo justamente nos machos. Pode-se sugerir que essa ativação inflamatória inicial, descrita na literatura como sendo mais marcante nos machos, possa ser justamente um processo inibido pela HT. Assim, a redução do volume de lesão foi observada apenas nos machos, no presente estudo. Nas fêmeas, que não apresentam uma resposta inicial tão intensa de ativação microglial, a HT acaba não demonstrando efeito protetor, pelo menos a curto prazo.

A lesão encefálica neonatal decorrente da HI causa danos aos neurônios do hipocampo (Johnston, 2005). A perda de neurônios piramidais ocorre de maneira precoce após o evento hipóxico-isquêmico, tanto em P7 quanto em P10 (Medhi et al., 2010; Ray & Maunsell, 2011; Stone et al., 2008). Essa lesão hipocampal das células piramidais é seguida por atrofia que evolui ao passar do tempo (Ray & Maunsell, 2011). A região de CA1 do hipocampo é sensível à hipóxia. A morte de neurônios piramidais começa cerca de 5 a 15 minutos após a reperfusão e segue por uma semana; já o GD é considerado uma região resistente à hipóxia (Kovalenko et al., 2006; Yang et al., 2011; Zhao et al., 2013).

Dessa forma, no presente trabalho, foi avaliada a perda de neurônios causada pela HI a partir da contagem de neurônios piramidais nas áreas

hipocampais de CA1 e GD corados com violeta de cresila, e o efeito do tratamento com a HT na atenuação desse dano. Foi observado nas contagens um padrão de resposta similar entre machos e fêmeas. O hipocampo foi escolhido para esta análise por ser a estrutura cerebral mais vulnerável no modelo animal de HI neonatal (Anand & Dhikav, 2012).

Na região de CA1, no lado ipsilateral à lesão encefálica, tanto em machos quanto em fêmeas, os animais do grupo HI apresentaram um menor número de neurônios piramidais quando comparados com o grupo SHAM. Entretanto, essa redução foi parcialmente revertida pela HT, mostrando que o tratamento foi eficaz em evitar a morte neuronal, demonstrando um possível efeito neuroprotetor conferido pela HT em animais de ambos os sexos. Os neurônios piramidais do hipocampo possuem uma maior sensibilidade à hipóxia, sendo que os neurônios piramidais de CA1 são os mais vulneráveis (Tokunaga et al., 1998). Matsuda e colaboradores (2021) observaram efeitos benéficos da HT na redução da degeneração neuronal induzida por anóxia. Esse dado corrobora os nossos resultados em que a HT atenuou a perda de neurônios causada pela HI.

Na região do GD ipsilateral à oclusão carotídea, os animais dos grupos HI e HT de ambos os sexos apresentaram uma perda neuronal significativa em comparação ao grupo SHAM. Entretanto, diferentemente da região de CA1, no giro denteado não foi possível observar nenhum papel neuroprotetor da HT sobre o número de neurônios.

Estudos já demonstraram que a isquemia causa morte neuronal nas células piramidais de CA1 do hipocampo após a reperfusão, enquanto os neurônios do GD permanecem com pouca morte e/ou intactos (Kirino, 1982; Pulsinelli, 1985). Esses dados corroboram o resultado obtido neste estudo, em que foi possível perceber que a região de CA1 foi mais afetada e o tratamento com HT atenuou essa morte neuronal. Talvez pela maior resistência intrínseca dos neurônios do GD, não seja possível observar um papel protetor da HT nessa região hipocampal.

O hemisfério contralateral do encéfalo, não apresentou diferença significativa na contagem de neurônios entre os grupos experimentais em nenhuma das regiões do hipocampo, mostrando o impacto principal do modelo

de Rice e Vanucci (Rice et al., 1981) sobre o hemisfério ipsilateral à oclusão carotídea (Vannucci & Hagberg, 2004).

Guo e colaboradores (2019) avaliaram a morte neuronal na região CA1 ao longo dos dias e, a partir disso, foi observado que no primeiro dia pós-HI foi encontrada pouca morte neuronal, já no segundo dia pós-HI, foi observado um grande aumento na morte, que persistiu durante 7 dias após a HI. Assim, como neste trabalho foi avaliado esse período inicial, existe a possibilidade de que a morte neuronal ainda possa aumentar nos animais em um período mais prolongado. Pensando nisso, foi decidido avaliar os neurônios em processo inicial de degeneração que, em P9, poderiam aparecer como células íntegras pela coloração de Nissl, mas que ao longo dos próximos dias poderiam vir a morrer.

Além disso, apesar da isquemia ser unilateral no modelo de HI utilizado, a hipoxia é sistêmica. Assim, a contagem das células em degeneração foi realizada em ambos os lados (ipsilateral e contralateral à lesão). Embora nenhuma diferença no hemisfério contralateral tenha sido detectada na contagem por Nissl, é possível que a hipóxia tenha um efeito mais lento (ou tardio) sobre o hemisfério contralateral. Por isso, também foram avaliados os neurônios em degeneração no lado contralateral. Foi utilizada a técnica de Fluoro-Jade B (Larsson et al., 2001) para realizar a contagem dos neurônios em degeneração no hipocampo de ratos neonatos submetidos ao modelo de HI.

A coloração com Fluoro-Jade é mais vantajosa em relação a colorações mais antigas como Nissl e hematoxilina e eosina (H&E), pois é específica para neurônios em degeneração. A técnica possui vantagens como o excelente contraste, pois as células em degeneração ficam na coloração verde fluorescente, enquanto as demais ficam com um tom fraco de verde, e suas limitações estão associadas à natureza trabalhosa da técnica (Schumed e Hopkins, 2000).

Os resultados do presente estudo mostraram que a HI induz degeneração neuronal principalmente no lado ipsilateral à lesão. Na região de CA1, no lado ipsilateral à lesão, foi possível observar um grande número de células Fluoro-Jade+ nos animais do grupo HI de ambos os sexos. Entretanto, nas fêmeas, a HT foi capaz de reduzir significativamente essa degeneração neuronal no hemisfério ipsilateral à lesão. No GD dos machos, no lado ipsilateral,

a HT foi capaz de reverter a degeneração neuronal causada pela HI. No GD das fêmeas, a degeneração neuronal causada pela HI no hemisfério ipsilateral não foi revertida pela HT. A mesma hipótese levantada na contagem com Nissl pode ser utilizada neste resultado, de que a região de CA1 é mais suscetível à morte celular, uma vez que avaliando os resultados, é possível observar que a região do GD foi menos afetada.

Embora alguns estudos que utilizaram o Fluoro-Jade observaram neurônios em degeneração no hemisfério contralateral, após um acidente vascular cerebral em ratos adultos (Adkins et al., 2006), no presente estudo isso não foi observado de maneira marcante nos neonatos.

Os resultados obtidos com a técnica de Fluoro-Jade B representam um estágio inicial de dano neuronal induzido pela HI. Schmued e colaboradores (Schmued & Hopkins, 2000) utilizaram ratos Sprague-Dawley machos adultos, com lesão cerebral induzida por ácido caínico e observaram neurodegeneração nas células piramidais nas regiões CA1 e GD do hipocampo. Em comparação com os dados encontrados nas contagens com Nissl, que representam uma morte aguda, na técnica de Fluoro-Jade foi visto que os neurônios estão em processo de morte, ou seja, degenerando.

Os aumentos substanciais de neurônios em degeneração nas regiões CA1 e DG (células Fluoro-Jade+) mostram a conhecida vulnerabilidade do hipocampo à privação de oxigênio (Kirino, 1982; Pimentel-Coelho et al., 2010; Zhao et al., 2013), principalmente na região de CA1 (Daval & Vert, 2004; Zhao et al., 2013), o que foi confirmado em nosso modelo utilizando animais neonatos.

O melhor momento para detectar neurodegeneração com a técnica de Fluoro-Jade B é 24 horas após a HI (Poirier et al., 2000), sendo essa uma marcação apropriada para avaliar a degeneração aguda, porém ela pode subestimar a quantidade de células, pois a fluorescência desaparece rapidamente (Liu et al., 2009). Devido a este fato, neste trabalho, as lâminas foram coradas e armazenadas no escuro até que secassem (em torno de 24 horas após a coloração), e em seguida, foram imediatamente analisadas, todas no mesmo dia, para que não houvesse variação de marcação entre as lâminas.

A partir desta análise foi possível avaliar a morte celular/tecidual a curto prazo e foi possível observar o efeito da HT. De maneira geral, esses resultados histológicos do presente estudo trazem uma contribuição para melhor

compreensão do efeito agudo da hipotermia terapêutica, reduzindo o % de volume de lesão, aumentando o número total de neurônios piramidais e revertendo a degeneração neuronal. Bem como a morte e a degeneração neuronais no hipocampo. Visto que a HT é o único tratamento preconizado pela OMS para neonatos que passaram pelo evento hipóxico-isquêmico, os resultados encontrados tornam-se bastante interessantes.

Nas avaliações relacionadas ao sexo, nossos resultados mostraram diferenças entre machos e fêmeas no teste comportamental do reflexo de endireitamento, no qual as fêmeas do grupo HI apresentaram uma menor latência; nas análises histológicas de volume de lesão, os machos tiveram um melhor resultado na medida indireta de lesão; na contagem das células Fluoro-Jade+, ocorreu uma resposta dimórfica entre regiões, em CA1 com um melhor resultado nas fêmeas e no GD com um melhor resultado nos machos. Dessa forma, fica claro que avaliar o dimorfismo sexual permitiria um tratamento mais adequado para cada sexo, bem como a definição de estratégias específicas para que se obtenham melhores resultados na prática clínica.

Ainda faltam estudos avaliando os mecanismos subjacentes ao dano encefálico causado pela HI. Devido a isso, não há muitos progressos na clínica para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para complementar o tratamento com hipotermia terapêutica (Zhang et al., 2019). Assim, a continuidade da pesquisa básica com modelos animais de HI neonatal é importante, sempre levando em consideração a existência de possíveis diferenças sexuais.

8. CONCLUSÕES

A partir deste trabalho foi possível concluir que o modelo utilizado de HI causou lesão encefálica nos animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal, gerando danos encefálicos em animais neonatos machos e fêmeas, os quais foram parcialmente revertidos pelo tratamento com HT. A HT foi capaz de atenuar a lesão encefálica, sendo eficaz também na redução da morte neuronal (avaliada pela contagem do número total de neurônios piramidais) e na redução das células em degeneração no hipocampo. O tratamento com HT não mostrou um impacto protetor sobre as avaliações comportamentais, que devem ser realizadas também em outras idades, para uma melhor compreensão do tratamento hipotérmico.

Os resultados da presente dissertação mostraram que a HT possui efeitos neuroprotetores observados ao nível tecidual/celular, além de produzir uma resposta diferente entre animais machos e fêmeas (mesmo sendo neonatos). Assim, este trabalho mostrou a importância de se avaliar o dimorfismo sexual em ratos neonatos e com isso permitir um melhor direcionamento das estratégias terapêuticas utilizadas na prática clínica.

9. PERSPECTIVAS

-Avaliar a resposta astrocitária e microglial após a HI e o tratamento hipotérmico utilizando uma análise imuno-histoquímica para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a molécula adaptadora ligadora de cálcio ionizado-1 (Iba-1);

-Avaliar as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e a IL-1 β , por meio da técnica ELISA, no encéfalo dos animais submetidos à HI e tratados com HT;

-Acompanhar os animais por períodos mais longos após a HI para verificar se a HT produz um efeito neuroprotetor mais significativo a longo prazo.

REFERÊNCIAS

- Abate, B. B., Bimerew, M., Gebremichae, B., Kassie, A. M., Kassaw, M., Gebremeskel, T., & Bayih, W. A. (2021). Effects of therapeutic hypothermia on death among asphyxiated neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *PloS One*, *16*(2).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0247229>
- Adkins, D. A. L., Campos, P., Quach, D., Borromeo, M., Schallert, K., & Jones, T. A. (2006). Epidural cortical stimulation enhances motor function after sensorimotor cortical infarcts in rats. *Experimental Neurology*, *200*(2), 356–370. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2006.02.131>
- Al Mamun, A., Yu, H., Romana, S., & Liu, F. (2018). Inflammatory Responses are Sex Specific in Chronic Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. *Cell Transplantation*, *27*(9), 1328–1339.
<https://doi.org/10.1177/0963689718766362>
- Allen, K. A., & Brandon, D. H. (2011). Hypoxic Ischemic Encephalopathy: Pathophysiology and Experimental Treatments. *Newborn and Infant Nursing Reviews : NAINR*, *11*(3), 125–133.
<https://doi.org/10.1053/J.NAINR.2011.07.004>
- Alonso-Alconada, D., Álvarez, A., Lacalle, J., & Hilario, E. (2012). Histological study of the protective effect of melatonin on neural cells after neonatal hypoxia-ischemia. *Histology and Histopathology*, *27*(6), 771–783.
<https://doi.org/10.14670/HH-27.771>
- Alvarez-Díaz, A., Hilario, E., Goñi De Cerio, F., Valls-I-Soler, A., & Alvarez-Díaz, F. J. (2007). Hypoxic-ischemic injury in the immature brain--key vascular and cellular players. *Neonatology*, *92*(4), 227–235.
<https://doi.org/10.1159/000103741>
- Alzaga, A. G., Cerdan, M., & Varon, J. (2006). Therapeutic hypothermia. *Resuscitation*, *70*(3), 369–380.
<https://doi.org/10.1016/J.RESUSCITATION.2006.01.017>
- Anand, K., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, *15*(4), 239.
<https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>
- Ballot, D. E., Rakotsoane, D., Cooper, P. A., Ramdin, T. D., Chirwa, T., & Pepper, M. S. (2020). A prospective observational study of developmental outcomes in survivors of neonatal hypoxic ischaemic encephalopathy in South Africa. In *South African Medical Journal* (Vol. 110, Issue 4, pp. 308–312). South African Medical Association.
<https://doi.org/10.7196/SAMJ.2020.V110I4.14311>
- Bambrick, L., Kristian, T., & Fiskum, G. (2004). Astrocyte Mitochondrial Mechanisms of Ischemic Brain Injury and Neuroprotection. *Neurochemical Research* *2004* *29*:3, *29*(3), 601–608.
<https://doi.org/10.1023/B:NERE.0000014830.06376.E6>
- Barone, F. C., Feuerstein, G. Z., & White, R. F. (1997). Brain Cooling During Transient Focal Ischemia Provides Complete Neuroprotection. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *21*(1), 31–44.
[https://doi.org/10.1016/0149-7634\(95\)00080-1](https://doi.org/10.1016/0149-7634(95)00080-1)
- Biran, V., Joly, L. M., Héron, A., Vernet, A., Véga, C., Mariani, J., Renolleau, S., & Charriaut-Marlangue, C. (2006). Glial activation in white matter following

- ischemia in the neonatal P7 rat brain. *Experimental Neurology*, 199(1), 103–112. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2006.01.037>
- Buscemi, L., Blochet, C., Magistretti, P. J., & Hirt, L. (2021). Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1 and Neuroprotection in a Mouse Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.689239>
- Chakkarapani, A. A., Aly, H., Benders, M., Cotten, C. M., El-Dib, M., Gressens, P., Hagberg, H., Sabir, H., Wintermark, P., & Robertson, N. J. (2021). Therapies for neonatal encephalopathy: Targeting the latent, secondary and tertiary phases of evolving brain injury. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2021.101256>
- Daval, J. L., & Vert, P. (2004). Apoptosis and neurogenesis after transient hypoxia in the developing rat brain. *Seminars in Perinatology*, 28(4), 257–263. <https://doi.org/10.1053/J.SEMPERI.2004.08.002>
- Davidson, J. O., Gonzalez, F., Gressens, P., & Gunn, A. J. (2021). Update on mechanisms of the pathophysiology of neonatal encephalopathy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 26(5), 101267. <https://doi.org/10.1016/J.SINY.2021.101267>
- Derugin, N., Dingman, A., Wendland, M. F., Fox, C., Bollen, A., & Vexler, Z. S. (2005). Magnetic resonance imaging as a surrogate measure for histological sub-chronic endpoint in a neonatal rat stroke model. *Brain Research*, 1066(1–2), 49–56. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2005.10.043>
- Douglas-Escobar, M., & Weiss, M. D. (2015). Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatrics*, 169(4), 397–403. <https://doi.org/10.1001/JAMAPEDIATRICS.2014.3269>
- Drury, P. P., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2010). Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15(5), 287–292. <https://doi.org/10.1016/J.SINY.2010.05.005>
- EIAli, A., & LeBlanc, N. J. (2016). The role of monocytes in ischemic stroke pathobiology: New avenues to explore. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(FEB), 29. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2016.00029/BIBTEX>
- Fabres, R. B., Montes, N. L., Camboim, Y. de M., de Souza, S. K., Nicola, F., Tassinari, I. D., Ribeiro, M. F. M., Netto, C. A., & de Fraga, L. S. (2020). Long-Lasting Actions of Progesterone Protect the Neonatal Brain Following Hypoxia-Ischemia. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 40(8), 1417–1428. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00827-0>
- Fabres, R. B., Nunes, R. R., de Medeiros De Mattos, M., Kielek, M., Andrade, G., Paula, A., Martini, R., Farias Sanches, E., D', I., Tassinari, Á., Stürmer De Fraga, L., & Netto, C. A. (n.d.). *Therapeutic hypothermia for the treatment of neonatal hypoxia-ischemia: sex-dependent modulation of reactive astrogliosis*.
- Fan, L. W., Lin, S., Pang, Y., Lei, M., Zhang, F., Rhodes, P. G., & Cai, Z. (2005). Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *Behavioural Brain Research*, 165(1), 80–90. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2005.06.033>
- Fan, X. D., Zhang, X., Yu, P. H., Li, X. M., & Juorio, A. v. (1997). Induction of preconvulsive behavior and Fos expression by dopamine-induced nigral lesion in the rat. *Brain Research*, 751(1), 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01386-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01386-8)

- Feather-Schussler, D. N., & Ferguson, T. S. (2016). A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2016(117). <https://doi.org/10.3791/53569>
- Femi-Akinlosotu, O. M., & Shokunbi, M. T. (2020). Changes in Neuronal Density of the Sensorimotor Cortex and Neurodevelopmental Behaviour in Neonatal Mice with Kaolin-Induced Hydrocephalus. *Pediatric Neurosurgery*, 55(5), 244–253. <https://doi.org/10.1159/000510603>
- Fumagalli, M., Lombardi, M., Gressens, P., & Verderio, C. (2018). How to reprogram microglia toward beneficial functions. *Glia*, 66(12), 2531–2549. <https://doi.org/10.1002/GLIA.23484>
- Giovannoni, F., & Quintana, F. J. (2020). The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. *Trends in Immunology*, 41(9), 805–819. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.07.007>
- Gluckman, P. D., Pinal, C. S., & Gunn, A. J. (2001). Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: Pathophysiology and potential strategies for intervention. *Seminars in Neonatology*, 6(2), 109–120. <https://doi.org/10.1053/siny.2001.0042>
- Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D. M., Vannucci, S. J., Levison, S. W., Vexler, Z. S., & Gressens, P. (2015). The role of inflammation in perinatal brain injury. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 11, Issue 4, pp. 192–208). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.13>
- Han, X., Li, Q., Lan, X., EL-Mufti, L., Ren, H., & Wang, J. (2019). Microglial Depletion with Clodronate Liposomes Increases Proinflammatory Cytokine Levels, Induces Astrocyte Activation, and Damages Blood Vessel Integrity. *Molecular Neurobiology*, 56(9), 6184–6196. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1502-9>
- Hattori, T., Sato, Y., Kondo, T., Ichinohashi, Y., Sugiyama, Y., Yamamoto, M., Kotani, T., Hirata, H., Hirakawa, A., Suzuki, S., Tsuji, M., Ikeda, T., Nakanishi, K., Kojima, S., Blomgren, K., & Hayakawa, M. (2015). Administration of umbilical cord blood cells transiently decreased hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Developmental Neuroscience*, 37(2), 95–104. <https://doi.org/10.1159/000368396>
- Herrera, T. I., Edwards, L., Malcolm, W. F., Smith, P. B., Fisher, K. A., Pizoli, C., Gustafson, K. E., Goldstein, R. F., Cotten, C. M., Goldberg, R. N., & Bidegain, M. (2018). Outcomes of preterm infants treated with hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Early Human Development*, 125, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.EARLHUMDEV.2018.08.003>
- Hobbs, C., Thoresen, M., Tucker, A., Aquilina, K., Chakkarapani, E., & Dingley, J. (2008). Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. *Stroke*, 39(4), 1307–1313. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.499822>
- Huang, H. Z., Wen, X. H., & Liu, H. (2016a). Sex differences in brain MRI abnormalities and neurodevelopmental outcomes in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *The International Journal of Neuroscience*, 126(7), 647–657. <https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1047016>
- Huang, H. Z., Wen, X. H., & Liu, H. (2016b). Sex differences in brain MRI abnormalities and neurodevelopmental outcomes in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *The International Journal of Neuroscience*, 126(7), 647–657. <https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1047016>

- Jacobs, S. E., Berg, M., Hunt, R., Tarnow-Mordi, W. O., Inder, T. E., & Davis, P. G. (2013). Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(1).
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD003311.PUB3>
- Jatana, M., Singh, I., Singh, A. K., & Jenkins, D. (2006). Combination of Systemic Hypothermia and N-acetylcysteine Attenuates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Pediatric Research* 2006 59:5, 59(5), 684–689. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000215045.91122.44>
- Johnston, M. v. (2001). Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 7(4), 229–234.
<https://doi.org/10.1002/MRDD.1032>
- Junqueira & Carneiro. (2016). *Histologia Básica, Texto e Atlas* (3ª edição).
- Juurink, B. H. J., & Walz, W. (n.d.). *Neural Cell Culture Techniques*.
- Khazipov, R., Zaynutdinova, D., Ogievetsky, E., Valeeva, G., Mitrukina, O., Manent, J. B., & Represa, A. (2015). Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(DEC), 161.
<https://doi.org/10.3389/FNANA.2015.00161/BIBTEX>
- Kim, J. S. (1996). Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 137(2), 69–78.
[https://doi.org/10.1016/0022-510X\(95\)00338-3](https://doi.org/10.1016/0022-510X(95)00338-3)
- Kirino, T. (1982). Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Research*, 239(1), 57–69. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90833-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90833-2)
- Kovalenko, T., Osadchenko, I., Nikonenko, A., Lushnikova, I., Voronin, K., Nikonenko, I., Muller, D., & Skibo, G. (2006). Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus*, 16(10), 814–825. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20211>
- Kreider, J. C., & Blumberg, M. (1999). Geotaxis in 2-week-old Norway rats (*Rattus norvegicus*): A reevaluation. *Undefined*.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199907\)35:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199907)35:1)
- Kumar, A. J., Motta-Teixeira, L. C., Takada, S. H., Yonamine-Lee, V., Machado-Nils, A. V., Xavier, G. F., & Nogueira, M. I. (2019). Behavioral, cognitive and histological changes following neonatal anoxia: Male and female rats' differences at adolescent age. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 73, 50–58.
<https://doi.org/10.1016/J.IJDEVNEU.2018.12.002>
- Kurinczuk, J. J., White-Koning, M., & Badawi, N. (2010). Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. In *Early Human Development* (Vol. 86, Issue 6, pp. 329–338).
<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010>
- Larsson, E., Lindvall, O., & Kokaia, Z. (2001). Stereological assessment of vulnerability of immunocytochemically identified striatal and hippocampal neurons after global cerebral ischemia in rats. *Brain Research*, 913(2), 117–132. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02762-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02762-7)
- Lau, L. T., & Yu, A. C. H. (2004). Astrocytes Produce and Release Interleukin-1, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor Alpha and Interferon-Gamma Following Traumatic and Metabolic Injury. <https://Home.Liebertpub.Com/Neu>, 18(3), 351–359.
<https://doi.org/10.1089/08977150151071035>

- Lee, I. C., Yang, J. J., & Liou, Y. M. (2021). Early Blood Glucose Level Post-Admission Correlates with the Outcomes and Oxidative Stress in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Antioxidants* 2022, Vol. 11, Page 39, 11(1), 39. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11010039>
- Li, J., Wen, P. Y., Li, W. W., & Zhou, J. (2015a). Upregulation effects of Tanshinone IIA on the expressions of NeuN, Nissl body, and I κ B and downregulation effects on the expressions of GFAP and NF- κ B in the brain tissues of rat models of Alzheimer's disease. *NeuroReport*, 26(13), 758–766. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000419>
- Li, J., Wen, P. Y., Li, W. W., & Zhou, J. (2015b). Upregulation effects of Tanshinone IIA on the expressions of NeuN, Nissl body, and I κ B and downregulation effects on the expressions of GFAP and NF- κ B in the brain tissues of rat models of Alzheimer's disease. *NeuroReport*, 26(13), 758–766. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000419>
- Liddelow, S. A., Marsh, S. E., & Stevens, B. (2020). Microglia and Astrocytes in Disease: Dynamic Duo or Partners in Crime? *Trends in Immunology*, 41(9), 820–835. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.07.006>
- Liu, C., Kuei, C., Zhu, J., Yu, J., Zhang, L., Shih, A., Mirzadegan, T., Shelton, J., Sutton, S., Connelly, M. A., Lee, G., Carruthers, N., Wu, J., & Lovenberg, T. W. (2012). 3,5-Dihydroxybenzoic acid, a specific agonist for hydroxycarboxylic acid 1, inhibits lipolysis in adipocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(3), 794–801. <https://doi.org/10.1124/JPET.112.192799>
- Liu, F., Schafer, D. P., & McCullough, L. D. (2009). TTC, Fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods*, 179(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.12.028>
- Lubics, A., Reglodi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., & Lengvári, I. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioural Brain Research*, 157(1), 157–165. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2004.06.019>
- Lucas, S. M., Rothwell, N. J., & Gibson, R. M. (2006). The role of inflammation in CNS injury and disease. *British Journal of Pharmacology*, 147(S1), S232–S240. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0706400>
- Mallard, C., Tremblay, M. E., & Vexler, Z. S. (2019). Microglia and Neonatal Brain Injury. In *Neuroscience* (Vol. 405, pp. 68–76). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.023>
- Matsuda, V. D. V., Tejada, M. B., Motta-Teixeira, L. C., Ikebara, J. M., Cardoso, D. S., Machado-Nils, A. V., Lee, V. Y., Diccini, I., Arruda, B. P., Martins, P. P., Dias, N. M. M., Tessarotto, R. P., Raeisossadati, R., Bruno, M., Takase, L. F., Kihara, A. H., Nogueira, M. I., Xavier, G. F., & Takada, S. H. (2021). Impact of neonatal anoxia and hypothermic treatment on development and memory of rats. *Experimental Neurology*, 340, 113691. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2021.113691>
- Medhi, B., Aggarwal, R., & Chakrabarti, A. (2010). Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(6), 731–737. <https://doi.org/10.1211/JPP.60.6.0008>
- Mirza, M. A., Ritzel, R., Xu, Y., McCullough, L. D., & Liu, F. (2015a). Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic

- encephalopathy. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), 32.
<https://doi.org/10.1186/s12974-015-0251-6>
- Mirza, M. A., Ritzel, R., Xu, Y., McCullough, L. D., & Liu, F. (2015b). Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1).
<https://doi.org/10.1186/S12974-015-0251-6>
- Mohsenpour, H., Pesce, M., Patrino, A., Bahrami, A., Pour, P. M., & Farzaei, M. H. (2021). A Review of Plant Extracts and Plant-Derived Natural Compounds in the Prevention/Treatment of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 833, 22(2)*, 833. <https://doi.org/10.3390/IJMS22020833>
- Monje, M. L., Toda, H., & Palmer, T. D. (2003). Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science*, 302(5651), 1760–1765.
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1088417/SUPPL_FILE/MONJE.SOM.PDF
- Motz, B. A., & Alberts, J. R. (2005). The validity and utility of geotaxis in young rodents. *Neurotoxicology and Teratology*, 27(4), 529–533.
<https://doi.org/10.1016/J.NTT.2005.06.005>
- Mülling, K., Fischer, A. J., Siakaeva, E., Richter, M., Bordbari, S., Spyra, I., Köster, C., Hermann, D., Gunzer, M., Felderhoff-Müser, U., Bendix, I., Jablonska, J., & Herz, J. (2021). Neutrophil dynamics, plasticity and function in acute neurodegeneration following neonatal hypoxia-ischemia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 92, 234–244.
<https://doi.org/10.1016/J.BBI.2020.12.012>
- Netto, C. A., Sanches, E., Odorcyk, F. K., Duran-Carabali, L. E., & Weis, S. N. (2017). Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. *Journal of Neuroscience Research*, 95(1–2), 409–421.
<https://doi.org/10.1002/JNR.23828>
- Nunes, R. R. (2021). *Efeito da hipotermia terapêutica sobre parâmetros do desenvolvimento e comportamentais e a imunidade periférica em ratos submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia encefálica neonatal*.
<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/221721>
- Palmer, C., Roberts, R. L., & Young, P. I. (2004). Timing of neutrophil depletion influences long-term neuroprotection in neonatal rat hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatric Research*, 55(4), 549–556.
<https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000113546.03897.FC>
- Panickar, K. S., & Norenberg, M. D. (2005). Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations. In *GLIA* (Vol. 50, Issue 4, pp. 287–298). <https://doi.org/10.1002/glia.20181>
- Pathipati, P., Lecuyer, M., Faustino, J., Strivelli, J., Phinney, D. G., & Vexler, Z. S. (2021). Mesenchymal Stem Cell (MSC)–Derived Extracellular Vesicles Protect from Neonatal Stroke by Interacting with Microglial Cells. *Neurotherapeutics*, 18(3), 1939–1952. <https://doi.org/10.1007/S13311-021-01076-9/FIGURES/5>
- Peterson, B. L., Won, S., Geddes, R. I., Sayeed, I., & Stein, D. G. (2015). Sex-related differences in effects of progesterone following neonatal hypoxic brain injury. *Behavioural Brain Research*, 286, 152–165.
<https://doi.org/10.1016/J.BBR.2015.03.005>

- Pimentel-Coelho, P. M., Magalhães, E. S., Lopes, L. M., Deazevedo, L. C., Santiago, M. F., & Mendez-Otero, R. (2010). Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: Functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells and Development*, *19*(3), 351–358. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0049>
- Poirier, J. L., Čapek, R., & de Koninck, Y. (2000). Differential progression of Dark Neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience*, *97*(1), 59–68. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00026-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00026-9)
- Pulsinelli, W. A. (1985). Selective Neuronal Vulnerability: Morphological and Molecular Characteristics. *Progress in Brain Research*, *63*(C), 29–37. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61973-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61973-1)
- Rafael Bandeira Fabres. (n.d.). *Efeitos da administração de progesterona e da hipotermia terapêutica sobre a lesão neural, a reatividade astrocitária e o comportamento em ratos Wistar submetidos à hipóxia-isquemia neonatal Porto Alegre 2020*.
- Ray, S., & Maunsell, J. H. R. (2011a). Different Origins of Gamma Rhythm and High-Gamma Activity in Macaque Visual Cortex. *PLOS Biology*, *9*(4), e1000610. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000610>
- Ray, S., & Maunsell, J. H. R. (2011b). Different Origins of Gamma Rhythm and High-Gamma Activity in Macaque Visual Cortex. *PLOS Biology*, *9*(4), e1000610. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000610>
- Rennie, J. M., & Robertson, N. R. C. (n.d.). *Rennie and Robertson's textbook of neonatology*.
- Rice, J. E., Vannucci, R. C., & Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology*, *9*(2), 131–141. <https://doi.org/10.1002/ANA.410090206>
- Robinson, S., Conteh, F. S., Oppong, A. Y., Yellowhair, T. R., Newville, J. C., Demerdash, N. el, Shrock, C. L., Maxwell, J. R., Jett, S., Northington, F. J., & Jantzie, L. L. (2018). Extended Combined Neonatal Treatment With Erythropoietin Plus Melatonin Prevents Posthemorrhagic Hydrocephalus of Prematurity in Rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 322. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00322/BIBTEX>
- Rocha, R., Andrade, L., Alves, T., Sá, S., Pereira, P. A., Dulce Madeira, M., & Cardoso, A. (2021). Behavioral and brain morphological analysis of non-inflammatory and inflammatory rat models of preterm brain injury. *Neurobiology of Learning and Memory*, *185*, 107540. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2021.107540>
- Rocha-Ferreira, E., Sisa, C., Bright, S., Fautz, T., Harris, M., Contreras Riquelme, I., Agwu, C., Kurulday, T., Mistry, B., Hill, D., Lange, S., & Hristova, M. (2019). Curcumin: Novel Treatment in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Frontiers in Physiology*, *10*, 1351. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.01351/BIBTEX>
- Roehr, C. C., Hansmann, G., Hoehn, T., & Bühner, C. (2011). The 2010 Guidelines on Neonatal Resuscitation (AHA, ERC, ILCOR): similarities and differences--what progress has been made since 2005? *Klinische Padiatrie*, *223*(5), 299–307. <https://doi.org/10.1055/S-0031-1280750>
- Roelfsema, V., Bennet, L., George, S., Wu, D., Guan, J., Veerman, M., & Gunn, A. J. (2004). Window of opportunity of cerebral hypothermia for postischemic white matter injury in the near-term fetal sheep. *Journal of*

- Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(8), 877–886.
<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000123904.17746.92>
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., Chateil, J. F., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A. K. (2021). Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 41(2), 342–358.
<https://doi.org/10.1177/0271678X20908355>
- Sabir, H., Bonifacio, S. L., Gunn, A. J., Thoresen, M., & Chalak, L. F. (2021a). Unanswered questions regarding therapeutic hypothermia for neonates with neonatal encephalopathy. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 26(5). <https://doi.org/10.1016/J.SINY.2021.101257>
- Sabir, H., Bonifacio, S. L., Gunn, A. J., Thoresen, M., & Chalak, L. F. (2021b). Unanswered questions regarding therapeutic hypothermia for neonates with neonatal encephalopathy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 26(5), 101257. <https://doi.org/10.1016/J.SINY.2021.101257>
- Saliba, E., & Henrot, A. (2001). Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biology of the Neonate*, 79(3–4), 224–227.
<https://doi.org/10.1159/000047096>
- Salter, M. W., & Beggs, S. (2014). Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell*, 158(1), 15–24.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.06.008>
- Sanches, E. F., Arteni, N., Nicola, F., Aristimunha, D., & Netto, C. A. (2015). Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats. *Neuroscience*, 290, 581–593.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.12.074>
- Sanches, E. F., Arteni, N. S., Spindler, C., Moysés, F., Siqueira, I. R., Perry, M. L., & Netto, C. A. (2012). Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic–ischemic rats. *Brain Research*, 1438, 85–92.
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2011.12.024>
- Sanches, E. F., Durán-Carabali, L. E., Tosta, A., Nicola, F., Schmitz, F., Rodrigues, A., Siebert, C., Wyse, A., & Netto, C. (2017). Pregnancy swimming causes short- and long-term neuroprotection against hypoxia–ischemia in very immature rats. *Pediatric Research* 2017 82:3, 82(3), 544–553. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.110>
- Saw, C. L., Rakshasbhuvankar, A., Rao, S., Bulsara, M., & Patole, S. (2019). Current Practice of Therapeutic Hypothermia for Mild Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Journal of Child Neurology*, 34(7), 402–409.
<https://doi.org/10.1177/0883073819828625>
- Schaar, K. L., Brenneman, M. M., & Savitz, S. I. (2010). Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental and Translational Stroke Medicine*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-13/FIGURES/4>
- Schmued, L. C., Albertson, C., & Slikker, W. (1997). Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Research*, 751(1), 37–46.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01387-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01387-X)

- Schmued, L. C., & Hopkins, K. J. (2000). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. In *Brain Research* (Vol. 874). www.elsevier.com/locate/bres
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, *106–107*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2013.04.001>
- Shalak, L., & Perlman, J. M. (2004). Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Human Development*, *80*(2), 125–141. <https://doi.org/10.1016/J.EARLHUMDEV.2004.06.003>
- Shankaran, S., Pappas, A., McDonald, S. A., Vohr, B. R., Hintz, S. R., Yolton, K., Gustafson, K. E., Leach, T. M., Green, C., Bara, R., Huitema, C. M. P., Ehrenkranz, R. A., Tyson, J. E., Das, A., Hammond, J., Peralta-Carcelen, M., Evans, P. W., Heyne, R. J., Wilson-Costello, D. E., ... Higgins, R. D. (2012). Childhood Outcomes after Hypothermia for Neonatal Encephalopathy. *New England Journal of Medicine*, *366*(22), 2085–2092. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1112066/SUPPL_FILE/NEJMOA1112066_DISCLOSURES.PDF
- Sims, N. R., Nilsson, M., & Muyderman, H. (2004). Mitochondrial Glutathione: A Modulator of Brain Cell Death. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* *2004 36:4*, *36*(4), 329–333. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000041763.63958.E7>
- SM, R., & JW, O. (1995). Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. *Trends in Neurosciences*, *18*(2), 57–58. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)93869-Y](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93869-Y)
- Smith, A. L., Rosenkrantz, T. S., & Fitch, R. H. (2016). Effects of sex and mild intransult hypothermia on neuropathology and neural reorganization following neonatal hypoxic ischemic brain injury in rats. *Neural Plasticity*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/2585230>
- Sullivan, R. M., Wilson, D. A., Wong, R., Correa, A., & Leon, M. (1990). Modified behavioral and olfactory bulb responses to maternal odors in preweanling rats. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *53*(2), 243–247. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90013-O](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90013-O)
- Sun, H. S., Xu, B., Chen, W., Xiao, A., Turlova, E., Alibraham, A., Barszczyk, A., Bae, C. Y. J., Quan, Y., Liu, B., Pei, L., Sun, C. L. F., Deurloo, M., & Feng, Z. P. (2015). Neuronal K(ATP) channels mediate hypoxic preconditioning and reduce subsequent neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Experimental Neurology*, *263*, 161–171. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2014.10.003>
- Sung, I. K. (2017). Therapeutic Hypothermia for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Newborn Infants. *Neonatal Medicine*, *24*(4), 145–156. <https://doi.org/10.5385/NM.2017.24.4.145>
- Tassinari, I. D. Á., Andrade, M. K. G., da Rosa, L. A., Hoff, M. L. M., Nunes, R. R., Vogt, E. L., Fabres, R. B., Sanches, E. F., Netto, C. A., Paz, A. H., & de Fraga, L. S. (2020). Lactate Administration Reduces Brain Injury and Ameliorates Behavioral Outcomes Following Neonatal Hypoxia–Ischemia. *Neuroscience*, *448*, 191–205. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.006>

- Teo, J. D., Morris, M. J., & Jones, N. M. (2017). Maternal obesity increases inflammation and exacerbates damage following neonatal hypoxic-ischaemic brain injury in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, *63*, 186–196. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2016.10.010>
- Tokunaga, H., Hiramatsu, K., & Sakaki, T. (1998). Effect of preceding in vivo sublethal ischemia on the evoked potentials during secondary in vitro hypoxia evaluated with gerbil hippocampal slices. *Brain Research*, *784*(1–2), 316–320. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01237-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01237-7)
- Tonkiss, J., Harrison, R. H., & Galler, J. R. (1996). Differential effects of prenatal protein malnutrition and prenatal cocaine on a test of homing behavior in rat pups. *Physiology & Behavior*, *60*(3), 1013–1018. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(96\)00152-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(96)00152-7)
- Trescher A*, W. H., & Johnston, M. v. (1997). Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia neonatal brain injury markedly delays. In *Brain & Development* (Vol. 19).
- Vannucci, R. C., Towfighi, J., & Vannucci, S. J. (1998). Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat: Pathologic and metabolic correlates. *Journal of Neurochemistry*, *71*(3), 1215–1220. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1998.71031215.X>
- Vannucci, S. J., & Hagberg, H. (2004). Hypoxia–ischemia in the immature brain. *Journal of Experimental Biology*, *207*(18), 3149–3154. <https://doi.org/10.1242/JEB.01064>
- Varon, J., & Acosta, P. (2008a). Therapeutic Hypothermia. *Chest*, *133*(5), 1267–1274. <https://doi.org/10.1378/CHEST.07-2190>
- Varon, J., & Acosta, P. (2008b). Therapeutic Hypothermia. *Chest*, *133*(5), 1267–1274. <https://doi.org/10.1378/CHEST.07-2190>
- Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K., & Tsatsanis, C. (2017). Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *The Journal of Immunology*, *198*(3), 1006–1014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601515>
- Villapol, S., Faivre, V., Joshi, P., Moretti, R., Besson, V. C., & Charriaut-Marlangue, C. (2019). Early Sex Differences in the Immune-Inflammatory Responses to Neonatal Ischemic Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(15), 3809. <https://doi.org/10.3390/ijms20153809>
- Volpe, J. J., & Zipurksy, A. (2001). Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatric Research*, *50*(5), 553–562. <https://doi.org/10.1203/00006450-200111000-00003>
- Waddell, J., Hanscom, M., Sharon Edwards, N., McKenna, M. C., & McCarthy, M. M. (2016). Sex differences in cell genesis, hippocampal volume and behavioral outcomes in a rat model of neonatal HI. *Experimental Neurology*, *275*(0 2), 285. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2015.09.003>
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, *79*(1), 619–643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- Wood, T. R., Gundersen, J. K., Falck, M., Maes, E., Osredkar, D., Løberg, E. M., Sabir, H., Walløe, L., & Thoresen, M. (2020). Variability and sex-dependence of hypothermic neuroprotection in a rat model of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury: a single laboratory meta-analysis. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-67532-2>

- Yang, J. L., Sykora, P., Wilson, D. M., Mattson, M. P., & Bohr, V. A. (2011). The excitatory neurotransmitter glutamate stimulates DNA repair to increase neuronal resiliency. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(8–9), 405–411. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2011.06.005>
- Zhang, Y., Xu, N., Ding, Y., Doycheva, D. M., Zhang, Y., Li, Q., Flores, J., Haghghiabyaneh, M., Tang, J., & Zhang, J. H. (2019). Chemerin reverses neurological impairments and ameliorates neuronal apoptosis through ChemR23/CAMKK2/AMPK pathway in neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy. *Cell Death and Disease*, 10(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1374-y>
- Zhao, Y. D., Ou, S., Cheng, S. Y., Xiao, Z., He, W. J., Zhang, J. H., & Ruan, H. Z. (2013). Dendritic development of hippocampal CA1 pyramidal cells in a neonatal hypoxia–ischemia injury model. *Journal of Neuroscience Research*, 91(9), 1165–1173. <https://doi.org/10.1002/JNR.23247>
- Zhu, C., Xu, F., Wang, X., Shibata, M., Uchiyama, Y., Blomgren, K., & Hagberg, H. (2006). Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. *Journal of Neurochemistry*, 96(4), 1016–1027. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2005.03639.X>