

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

DIORLON NUNES MACHADO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE BUMETANIDA EM ANIMAIS
SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL EM DOIS
PERÍODOS DO NEURODESENVOLVIMENTO**

Porto Alegre

2022

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE BUMETANIDA EM ANIMAIS
SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL EM DOIS
PERÍODOS DO NEURODESENVOLVIMENTO**

DIORLON NUNES MACHADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Porto Alegre

2022

“Melhor acrescentar vida aos dias do que dias à vida.”

Rita Levi-Montalcini

Agradecimentos

Agradeço enormemente ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto por compartilhar seu vasto conhecimento de tudo e mais um pouco, pelo seu voto de confiança em mim, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa e laboratório, e por ser uma peça fundamental para todos nós. Por sua orientação e mentoria enriquecedoras!

À minha coorientadora Dra. Luz Elena Durán Carabali pelos seus ensinamentos, auxílio, apoio, planejamento e paciência. Aos colegas de pesquisa do Laboratório de Isquemia Cerebral e Neuroproteção pelo grande apoio, aprendizado e companheirismo que possibilitaram a construção deste trabalho de forma responsável e prazerosa, em especial ao Andrey, Ana Paula, Livia, Felipe e Marcel.

À UFRGS, ao ICBS, ao Departamento de Bioquímica, ao PPG Bioquímica, por serem minha segunda casa e espaço de descobertas e produções durante essa etapa importante da minha vida. Ao corpo docente, discente, técnico e administrativo por constituírem um ambiente harmonioso e estimulante.

Ao CNPq e à CAPES pelos recursos oferecidos que permitiram a execução desse trabalho.

A minha eterna gratidão à minha querida mãe – Dona Maria, pelo seu amor, carinho, apoio incondicional e confiança em mim. É meu alicerce para todos meus projetos na vida. À minha família e amigos por acreditarem em mim e oferecerem apoio em todos os momentos.

Ao meu parceiro e companheiro de vida, Volnei, por acreditar na minha capacidade de ser humano e cientista, pelo apoio total em todos os momentos e por seu amor que torna meus dias mais alegres e coloridos.

Uma enorme gratidão e profundo respeito aos animais que serviram de base para este trabalho e para a ciência como um todo.

Um sincero agradecimento por todos aqueles que me inspiraram em cada palavra escrita nesta dissertação.

Sumário

1. Introdução.....	11
1.1 Hipóxia-Isquemia Neonatal	11
1.2 Modelo Experimental de Hipóxia-Isquemia de Rice-Vannucci.....	16
1.3 Neurotransmissor GABA.....	17
1.4 Homeostase de Cloreto em Neurônios	18
1.5 Cotransportadores de Cloreto	20
1.6 Hipóxia-Isquemia e maturação GABAérgica	22
1.7 Bumetanida	24
1.8 Justificativa.....	25
1.9 Hipótese	25
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1 Aspectos Éticos.....	27
3.2 Animais	27
3.3 Delineamento Experimental	28
3.3.1 Experimento 1: Dosagem de Bumetanida	28
3.3.2 Experimento 2: Avaliação Comportamental, Histológica e Bioquímica.....	28
3.4 Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal.....	29
3.5 Administração da Bumetanida	30
3.6 Grupos Experimentais.....	31
3.7 Análise Neuromotora durante o Período Lactacional.....	31
3.7.1 Reflexo de Geotaxia Negativa	31
3.7.2 Reflexo de Endireitamento	32
3.8 Análise Comportamental na Fase Adulta.....	32
3.8.1 Campo Aberto.....	32
3.8.2 Reconhecimento de Objetos	32
3.8.3 Labirinto Aquático de Morris	33
3.9 Análise Histológica.....	34
3.9.1 Coloração de 2,3,5-Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC)	34
3.9.2 Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE)	34

3.9.3	Contagem de Células	35
3.10	Análise Bioquímica.....	36
3.10.1	<i>Western Blot</i>	36
3.11	Análise Estatística	37
4.	Resultados.....	39
4.1	Efeito neuroprotetor da bumetanida após a HI.....	39
4.2	Taxa de Mortalidade.....	40
4.3	A bumetanida preveniu a perda de peso 48h após a lesão.	41
4.4	Avaliação Neuromotora durante o Período Lactacional	42
4.4.1	A bumetanida reduziu o prejuízo no teste de geotaxia negativa. .	42
4.4.2	A bumetanida reduziu o prejuízo no teste de endireitamento.	44
4.5	Avaliação Comportamental na Fase Adulta	45
4.5.1	A bumetanida inibiu a hiperlocomoção no teste de campo aberto em animais no DPN3.....	45
4.5.2	A bumetanida reduziu os prejuízos no teste de reconhecimento de objetos em animais DPN11.	47
4.5.3	A bumetanida protegeu a capacidade de aprendizado e de memória espacial dos animais de ambos os períodos do desenvolvimento.	49
4.6	Análise Histológica.....	51
4.6.1	A bumetanida preveniu a atrofia nas estruturas encefálicas pós-HI.....	51
4.6.2	A bumetanida preveniu a degeneração de neurônios na camada CA1 do hipocampo.	54
4.7	Análises Bioquímicas	57
4.7.1	Expressão de Cotransportadores de Cloreto.....	57
4.7.2	Expressão de Proteínas Sinaptogênicas	59
5.	Discussão	61
6.	Conclusão.....	72
7.	Perspectivas	72
8.	Referências.....	74

Lista de Abreviaturas

AMPA	A-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHE	Barreira Hematoencefálica
BUM	Bumetanida
CA1	Subcampo 1 do Corno de Amon
Ca ²⁺	Cátion Cálcio
[Ca ²⁺] _i	Concentração de Cálcio Interna
[Cl ⁻] _i	Concentração de Cloreto Interna
[Cl ⁻] _e	Concentração de Cloreto Externa
CO ₂	Gás Carbônico
DPN	Dia Pós-Natal
EPM	Erro Padrão Médio
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GABAR	Receptor de Ácido Gama-Aminobutírico
GEE	Equações de Estimativas Generalizadas
HE	Hematoxilina-Eosina
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanossulfônico
HI	Hipóxia-Isquemia
IL	Interleucina
K ⁺	Cátion Potássio
KCC2	Cotransportador K-Cl 2
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
N ₂	Gás Nitrogênio
Na ⁺	Cátion Sódio
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Bomba Sódio e Potássio ATPase
NKCC1	Cotransportador Na-K-Cl 1

NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Gás Oxigênio
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PFA	Paraformaldeído
PSD-95	Proteína de Densidade Pós-Sináptica 95
SNC	Sistema Nervoso Central
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
VLE	Volume de Lesão Encefálico

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração da lesão encefálica gerada pela HI neonatal	12
Figura 2. Eventos fisiopatológicos da lesão hipóxico-isquêmica	16
Figura 3. Ilustração do modelo modificado de HI de Rice-Vannucci	17
Figura 4. O GABA e a maturidade neuronal	19
Figura 5. Os cotransportadores de cloreto e a maturidade neuronal	21
Figura 6. Delineamento Experimental	29
Figura 7. Volume de Lesão - TTC	39
Figura 8. Volume de Lesão - TTC (Imagens Representativas).....	40
Figura 9. Peso Corporal dos Animais e Ganho de Peso	42
Figura 10. Reflexo de Geotaxia Negativa	43
Figura 11. Reflexo de Endireitamento	44
Figura 12. Campo Aberto	46
Figura 13. Campo Aberto (Imagens Representativas)	47
Figura 14. Reconhecimento de Objetos	48
Figura 15. Labirinto Aquático de Morris	50
Figura 16. Labirinto Aquático de Morris (Imagens Representativas)	51
Figura 17. Volume de Lesão - HE	53
Figura 18. Volume de Lesão – HE (Imagens Representativas)	54
Figura 19. Células Degenerativas na camada CA1 do hipocampo	55
Figura 20. Células Degenerativas na camada CA1 do hipocampo (Imagens Representativas)	56
Figura 21. Imunoconteúdos de KCC2 e NKCC1 no hipocampo	58
Figura 22. Razão entre imunoconteúdos de KCC2 e NKCC1 no hipocampo...59	
Figura 23. Imunoconteúdos de PSD-95 e Sinaptofisina no hipocampo	60

Lista de Tabelas

Tabela 1. Idades experimentais e seus respectivos grupos	31
Tabela 2. Descrição detalhada dos testes estatísticos e análises realizadas nos experimentos	38
Tabela 3. Relação entre o número de animais e a mortalidade por experimento realizado	41
Tabela 4. Reconhecimento de Objetos	48

Resumo

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) é um dos principais fatores de risco causadores de distúrbios ao sistema nervoso central (SNC). A patogenia da HI se manifesta quando há uma insuficiência no fluxo sanguíneo ao SNC, causando lesão tecidual, morte celular, neuroinflamação, edema, estresse oxidativo e perturbações neurofisiológicas como o desequilíbrio entre excitação e inibição neuronal e perda sináptica. O GABA, neurotransmissor inibitório do SNC em adultos, é excitatório no início do neurodesenvolvimento e sua ação dependente da homeostase de cloreto neuronal, regulada pelos cotransportadores de cloreto NKCC1 (importa Cl⁻) e KCC2 (exporta Cl⁻). Em condições normais, a razão NKCC1/KCC2 reduz com o neurodesenvolvimento, mas a condição de HI pode alterar a expressão de NKCC1 e/ou KCC2 e a razão entre eles, resultando em distúrbios neurológicos e psiquiátricos. Clinicamente, a hipotermia é a única terapia aprovada no tratamento da HI, porém possui várias limitações que incidem na eficácia, tornando conveniente a busca de tratamentos alternativos. A bumetanida, um inibidor de NKCC1, tem se destacado por seus efeitos neuroprotetores em vários distúrbios do SNC. Nesse sentido, este estudo avaliou os efeitos da bumetanida sobre os prejuízos da HI em dois períodos do neurodesenvolvimento. Ratos neonatos machos de 3 (DPN3) e 11 (DPN11) dias de vida, foram submetidos à cirurgia para a indução da HI, visando mimetizar neonatos humanos prematuros e nascidos a termo. A HI consiste na oclusão permanente da artéria carótida comum direita, seguida pela exposição à atmosfera hipóxica (92% de N₂ e 8% de O₂) por 120 minutos em ratos DPN3 e 60 minutos em ratos DPN11. Os animais foram divididos em dois grupos considerando a idade de indução do modelo: DPN3 e DPN11, com três subgrupos em cada: SHAM, HI-SAL e HI-BUM. A bumetanida (0,5 mg/kg) ou a solução salina (NaCl 0,9%) foi administrada via intraperitoneal 1h, 24h, 48h e 72h após a HI. Analisaram-se as proteínas NKCC1, KCC2, PSD-95 e sinaptofisina no hipocampo ipsilateral por *Western blot*. Executaram-se testes de reflexos neurológicos de geotaxia negativa e de endireitamento no período lactacional, e testes comportamentais de campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris na fase adulta. Posteriormente, avaliou-se a atrofia tecidual e a morte celular por histologia. A HI induziu prejuízos nos reflexos neurológicos, na memória declarativa, na memória espacial, além de induzir um aumento na atividade locomotora, entretanto esses prejuízos foram atenuados pela bumetanida. A bumetanida preveniu a atrofia tecidual nas estruturas avaliadas e reduziu a morte de neurônios hipocampais, protegendo o tecido encefálico dos danos causados pela HI. A HI provocou uma redução no imunoconteúdo de KCC2, mas não alterou o imunoconteúdo de NKCC1, gerando uma razão NKCC1/KCC2 favorável à hiperexcitação GABAérgica. Houve redução no imunoconteúdo de PSD-95 atribuída à HI, porém não houve alteração no imunoconteúdo de sinaptofisina. Não houve diferenças significativas no efeito da HI e da bumetanida entre as idades. A bumetanida contribuiu na manutenção do tônus GABAérgico e na qualidade das sinapses, tornando-as mais próximas das condições fisiológicas basais. Os resultados sugerem que a bumetanida protegeu os animais contra os efeitos HI nos aspectos comportamentais, morfofisiológicos e bioquímicos. A bumetanida parece exercer um papel terapêutico importante sobre o SNC.

Palavras-chave: hipóxia-isquemia neonatal, bumetanida, NKCC1, KCC2, sinaptogênese, neurodesenvolvimento.

Abstract

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is one of the main risk factors causing central nervous system (CNS) disorders. The pathogenesis of HI manifests when there is an insufficiency in blood flow to the CNS, causing tissue damage, cell death, neuroinflammation, edema, oxidative stress and neurophysiological disturbances such as the imbalance between neuronal excitation and inhibition and synaptic loss. GABA, an inhibitory neurotransmitter of the CNS in adults, is excitatory at the onset of neurodevelopment and its action depends on neuronal chloride homeostasis, regulated by the chloride cotransporters NKCC1 (imports Cl⁻) and KCC2 (exports Cl⁻). Under normal conditions, the NKCC1/KCC2 ratio decreases with neurodevelopment, but the HI condition can alter the expression of NKCC1 and/or KCC2 and the ratio between them, resulting in neurological and psychiatric disorders. Clinically, hypothermia is the only therapy approved for the treatment of HI, but it has several limitations that affect its efficacy, making it convenient to search for alternative treatments. Bumetanide, an NKCC1 inhibitor, has been highlighted for its neuroprotective effects in several disorders of the CNS. In this sense, this study evaluated the effects of bumetanide on HI impairments in two neurodevelopmental periods. Male neonate rats, 3 (DPN3) and 11 (DPN11) days old, were submitted to surgery for the induction of HI, aiming to mimic premature and full-term human neonates. HI consists of permanent occlusion of the right common carotid artery, followed by exposure to a hypoxic atmosphere (92% N₂ and 8% O₂) for 120 minutes in DPN3 rats and 60 minutes in DPN11 rats. The animals were divided into two groups considering the age of induction of the model: DPN3 and DPN11, with three subgroups in each: SHAM, HI-SAL and HI-BUM. Bumetanide (0.5 mg/kg) or saline solution (NaCl 0.9%) was administered intraperitoneally 1h, 24h, 48h and 72h after HI. NKCC1, KCC2, PSD-95 and synaptophysin proteins from the right hippocampus were analyzed by Western blot. Negative geotaxis and righting neurological reflex tests were performed in the lactational period, and open field behavioral tests, object recognition and Morris water maze in adulthood. Subsequently, atrophy and cell death were evaluated by histology. HI induced impairments in neurological reflexes, declarative memory, spatial memory, in addition to inducing an increase in locomotor activity, however these impairments were attenuated by bumetanide. Bumetanide prevented tissue atrophy in the evaluated structures and reduced the death of hippocampal neurons, protecting the brain tissue from the damage caused by HI. HI caused a reduction in KCC2 immunocontent, but did not alter NKCC1 immunocontent, generating an NKCC1/KCC2 ratio favorable to GABAergic hyperexcitation. There was a reduction in PSD-95 immunocontent attributed to HI, but there was no change in synaptophysin immunocontent. There were no significant differences in the effect of HI and bumetanide between ages. Bumetanide contributed to the maintenance of GABAergic tone and the quality of synapses, making them closer to baseline physiological conditions. The results suggest that bumetanide protected the animals against HI effects in behavioral, morphophysiological and biochemical aspects. Bumetanide appears to play an important therapeutic role in the CNS.

Keywords: neonatal hypoxia-ischemia, bumetanide, NKCC1, KCC2, synaptogenesis, neurodevelopment.

1. Introdução

1.1 Hipóxia-Isquemia Neonatal

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) é um dos principais fatores de risco de distúrbios fisiopatológicos do sistema nervoso central (SNC), sendo capaz de perturbar profundamente várias funções neurais. A HI acomete entre 1,5 e 3 a cada 1.000 recém-nascidos a termo (Kurinczuk *et al.*, 2010; Hagberg *et al.*, 2015) e cerca de 7 a cada 1.000 recém-nascidos prematuros (Chalak *et al.*, 2012). Cerca de 40% dos recém-nascidos com lesão cerebral hipóxico-isquêmica não sobrevivem ao período neonatal e, quando sobrevivem, 30% desenvolvem distúrbios neurológicos, como paralisia cerebral, convulsões, epilepsias, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), deficiência visual, retardo mental e dificuldades de aprendizado e de memória, além de anomalias cognitivas e comportamentais (Volpe *et al.*, 2001; Vannucci *et al.*, 2004; Rocha-Ferreira e Hristova, 2015, 2016). A encefalopatia pode ser causada durante a gestação, durante o parto e até mesmo após o nascimento, em virtude de fatores como hipóxia materna, insuficiência placentária, descolamento prematuro da placenta, compressão do cordão umbilical, restrições do crescimento intrauterino, dificuldades na expulsão do feto e sofrimento fetal, conduzindo à asfixia fetal e HI neonatal (Ferriero, 2001; Jensen, 2002; Volpe, 2009; Weiss *et al.*, 2013; Procianoy *et al.*, 2015).

A HI neonatal acarreta dificuldade no intercâmbio de gases, levando a um déficit no aporte de oxigênio (O₂), excesso de dióxido de carbono (CO₂) e redução do suprimento sanguíneo ao tecido nervoso (Volpe *et al.*, 2009) (Figura 1). Além disso, a HI também deprime rapidamente a atividade neuronal e a transmissão sináptica em roedores (Pena e Ramirez, 2005; Ben-Ari, 2017) devido ao alto custo metabólico desses processos, uma vez que a geração e a propagação do potencial de ação consomem cerca de 50% do ATP disponível e que os potenciais pós-sinápticos consomem 34% desse ATP na substância cinzenta (Attwell e Laughlin, 2001; Pena e Ramirez, 2005). Lesões neonatais oriundas da HI são fatores que causam alterações na diferenciação morfológica de neurônios GABAérgicos e a perda significativa de células que expressam receptores de GABA (Robinson *et al.*, 2006). Também podem levar à morte

neuronal rápida por necrose, caso a lesão seja grave; ao passo que a lesão menos grave ou duradoura causa morte neuronal por apoptose (Nakajima *et al.*, 2000). O déficit de suprimento sanguíneo para o cérebro causado pela HI gera uma cascata de eventos celulares que altera a homeostase iônica neuronal. Gallefi e colaboradores (2004), em um modelo de isquemia *in vitro*, demonstraram que a concentração de cloreto intracelular ($[Cl^-]_i$) aumenta em neurônios hipocâmpais de ratos em resposta à privação de glicose e oxigênio.

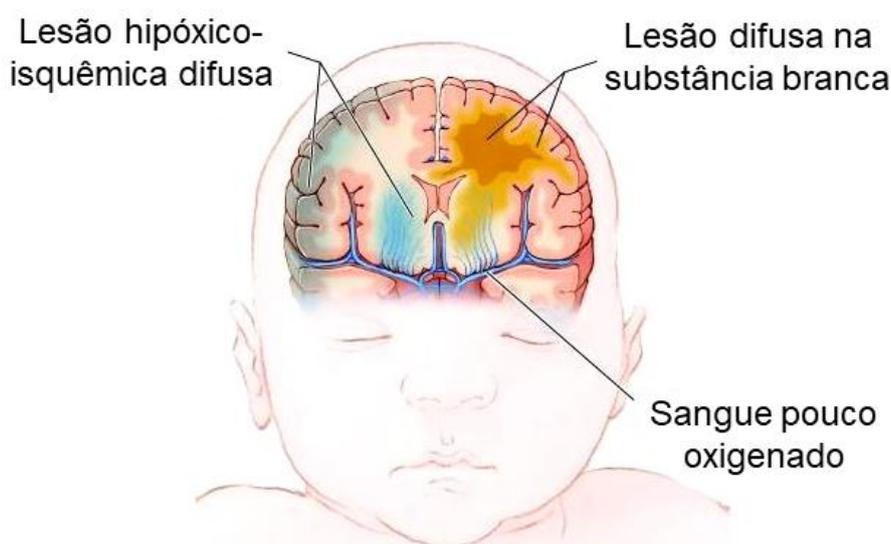


Figura 1. Ilustração da lesão encefálica gerada pela HI neonatal. Observa-se a lesão difusa oriunda do evento hipóxico-isquêmico, bem com lesão na substância branca. Adaptado de Silbereis *et al.*, 2010.

As injúrias causadas pela encefalopatia hipóxico-isquêmica diferem tanto na idade gestacional e pós-natal do neonato, quanto na natureza e duração do insulto e nos tipos de intervenção (Roelfsema *et al.*, 2005; Bock *et al.*, 2014). Alterações no metabolismo energético cerebral têm maior relevância em razão de janelas de vulnerabilidade celular e tecidual, dependendo do período em que ocorrem (Ming-Chi e San-Nan, 2011; Bock *et al.*, 2014; Odorcyk *et al.*, 2021). Por exemplo, a homeostase do cloreto nos neurônios sofre grande transformação entre os períodos fetal e neonatal em roedores, podendo implicar na resposta desencadeada pelo GABA em condições normais de nascimentos ou atípicas, como a prematuridade e a pós-maturidade (Ben-Ari *et al.*, 1994; Dzhalala *et al.*, 2009). O período neonatal apresenta desenvolvimento de diferentes estruturas cerebrais, como o hipocampo e neocórtex em diferentes etapas (Yanger e

Ashwal, 2009), ocorrendo intensa sinaptogênese e uma alta taxa de diferenciação celular (Bock *et al.*, 2007).

A redução de oferta de substratos energéticos acarreta falhas na atividade da bomba Na^+/K^+ dependente de ATP, culminando no acúmulo de água (edema), seguido de despolarização da membrana e aumento na liberação de neurotransmissores excitatórios (Ming-Chi e San-Nan, 2011). A liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, promove excitotoxicidade que altera a estabilidade sináptica, a plasticidade neuronal, a excitabilidade do hipocampo e do córtex cerebral, estruturas relacionadas ao aprendizado e memória (Hagberg *et al.*, 2002).

A HI também pode promover grandes mudanças estruturais e funcionais na comunicação entre neurônios, afetando proteínas que protagonizam a formação de sinapses e contribuindo para déficits neurológicos, cognitivos e mnemônicos (Mattson, 2004; Xiong *et al.*, 2011). A sinaptofisina e a proteína da densidade pós-sináptica 95 (PSD-95) são proteínas sinápticas abundantes, implicadas na neuroplasticidade ao regular a exocitose de vesículas e a estabilidade na transmissão sináptica entre neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos, respectivamente (Ujike *et al.*, 2002; Pagnussat *et al.*, 2012). A expressão e a função de PSD-95 estão deprimidas logo após a HI, indicando uma disfunção sináptica aguda e temporária (Xiong *et al.*, 2018), observada mesmo após 2 meses da lesão HI, representando um prejuízo crônico da plasticidade sináptica (Xiong *et al.*, 2019). A recuperação funcional após a HI parece estar intimamente relacionada com alterações na expressão de PSD-95. A reconstrução sináptica após o evento hipóxico-isquêmico aumenta significativamente sua expressão, o que promove o surgimento axonal e a nova formação de sinapses (Hou *et al.*, 2008). Atualmente, sabe-se que a função excitatória do GABA é essencial na formação e estabilização sináptica durante o neurodesenvolvimento no início da vida, e qualquer transtorno nessa fase pode representar prejuízos na elaboração de circuitos importantes para o funcionamento do SNC (Pugh *et al.*, 2011).

A HI não é apenas um evento pontual, mas um processo marcado por uma série de alterações progressivas que se originam a partir do momento em

que o fluxo de sangue ao tecido encefálico é interrompido e se prolonga mesmo após o restabelecimento do fornecimento de sangue (reperfusão). O grau de severidade da lesão causada depende de múltiplos fatores, entre eles o período de neurodesenvolvimento em que ocorre, o tempo de duração do insulto e os mecanismos adaptativos do feto e/ou neonato (Sherman *et al.*, 1998; Brekke *et al.*, 2017). Notavelmente, pode-se destacar três momentos distintos do processo hipóxico-isquêmico, caracterizados pelo perfil de lesão apresentado pelo tecido afetado (Figura 2):

Fase Primária: nesta fase ocorrem as lesões primárias no tecido nervoso acometido pelo insulto hipóxico-isquêmico, decorrentes da redução no fluxo sanguíneo e suprimento de oxigênio, conduzindo o tecido a uma falência energética. A falência energética é o fenômeno caracterizado por uma drástica depleção dos níveis de ATP intracelular e extracelular em virtude do comprometimento da fosforilação oxidativa. A escassez de ATP afeta muitos aspectos bioquímicos da célula, entre eles a atividade da bomba de Na⁺/K⁺-ATPase, que está fortemente relacionada com a manutenção do potencial da membrana neuronal (Lorek *et al.*, 1994; Dugan *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 2013; Artega *et al.*, 2017; Sanches *et al.*, 2017). Distúrbios atrelados ao potencial de membrana em neurônios podem representar perigos, como a deflagração exacerbada de despolarização neuronal, que favorece a liberação exagerada de neurotransmissores excitatórios como os aminoácidos glutamato e glicina que, por sua vez, conferem excitotoxicidade aos grupos neuronais atingidos (Erecińska *et al.*, 1994; Haberny *et al.*, 2002; Ordieres *et al.*, 2014; Davidson *et al.*, 2015). Elevações nos níveis de glutamato e glicina não só contribuem para a excitabilidade em excesso, mas também para o influxo desenfreado de Ca²⁺ nos neurônios ao se ligarem aos receptores de glutamato do tipo N-metil D-aspartato (NMDA), aos receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato (AMPA) e aos receptores cainato (Johnston *et al.*, 2001; Perlman *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2005). O Ca²⁺ é um elemento central em cascatas de sinalização celular que são primordiais para a regularidade da atividade celular; entretanto o aumento anormal da concentração de Ca²⁺ intracelular pode levar à neurotoxicidade, edema, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, lise celular, apoptose e necroptose, neuroinflamação,

ativação da microglia e de astrócitos (Kohlhauser *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2001; McLean *et al.*, 2004; Hagberg *et al.*, 2009; Hassell *et al.*, 2015; Zhong *et al.*, 2022). Apesar dos danos sofridos pelas populações neuronais diante do insulto conferido pela HI, muitos neurônios podem se recuperar parcialmente logo após a reperfusão e reoxigenação gerados pelo restabelecimento do fluxo sanguíneo – evento característico da *fase latente* (Cho *et al.*, 2020).

Fase Secundária: essa fase é marcada pelo ápice da neuroinflamação e do estresse oxidativo iniciados na lesão primária e que representam os principais fatores da mortalidade neuronal após a HI, seja por necrose, por apoptose ou por necroptose (Huang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014; Rumajogee *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2022). As células gliais ativas, como astrócitos e microglias, deflagram reações imunológicas adaptativas e agudas no SNC através de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 – fenômeno conhecido por gliose reativa (Liu *et al.*, 2013). A neuroinflamação também é capaz de comprometer a integridade da barreira hematoencefálica, tornando-a mais permeável para facilitar o recrutamento leucocitário ao local lesionado; em contrapartida também facilita a passagem de elementos nocivos à homeostase neural (Puurunen *et al.*, 2001; Baburamani *et al.*, 2012; Daneman *et al.*, 2012; Obermeier *et al.*, 2013;). A injúria mitocondrial gerada pela crise energética aumenta o desbalanço entre as enzimas antioxidantes e espécies reativas de oxigênio, promovendo estresse oxidativo (Saito *et al.*, 2005; Anastácio *et al.*, 2014; Odorcyk *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2022).

Fase Terciária: a última fase da hipóxia-isquemia é encenada por lesões terciárias que perduram por semanas, meses e até anos. Essa etapa é configurada pela remodelação tecidual, com presença de neuroinflamação crônica, morte celular e gliose (Sofroniew *et al.*, 2014). O tecido reconstruído é composto por células neurais anômalas, cujas funções são comprometidas e, portanto, com sinapses aberrantes. Além disso, o tecido encefálico pode sofrer atrofia e apresentar cicatriz glial arquitetada por astrócitos (Arteni *et al.*, 2003; Davidson *et al.*, 2015). Essas lesões fisiopatológicas da HI são determinantes no desenvolvimento de distúrbios funcionais no SNC.

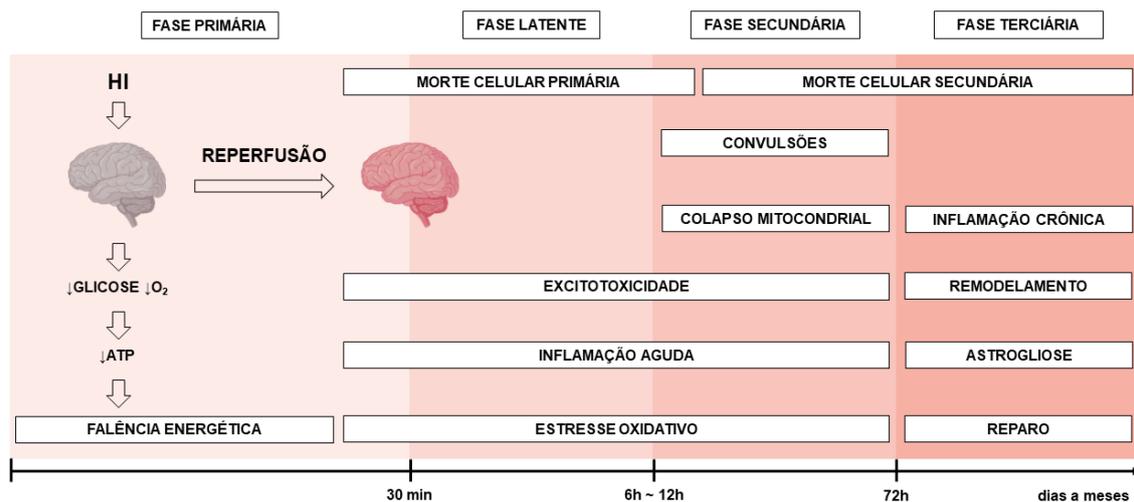


Figura 2. Eventos fisiopatológicos da lesão hipóxico-isquêmica. Adaptado e modificado de Weiss, 2014 e Davidson *et al.*, 2015.

1.2 Modelo Experimental de Hipóxia-Isquemia de Rice-Vannucci

A HI causa diferentes impactos de acordo com as circunstâncias em que ocorre, como diferenças etárias, de sexo e grau de severidade. Com isso, é conveniente o constante aperfeiçoamento de modelos animais e técnicas de intervenção que se aproximem da realidade fisiológica humana. O modelo animal de Rice-Vannucci (Rice *et al.*, 1981) está bem estabelecido como ferramenta experimental para o estudo da HI neonatal; mimetizando em roedores no DPN7, o dano observado em neonatos humanos a termo, tanto em relação às lesões nas estruturas cerebrais, edema cerebral e distúrbios celulares, quanto em relação aos déficits cognitivos e sensorio-motores (Netto *et al.*, 2017). O modelo consiste na oclusão permanente de uma das artérias carótidas comuns, combinada com a exposição do animal à atmosfera hipóxica (composta de 8% de O₂ e 92% de N₂) (Figura 3), resultando em lesões no córtex cerebral, núcleos da base e no hipocampo do hemisfério ipsilateral à carótida ocluída (Pereira *et al.*, 2007). Uma das estruturas mais vulneráveis à lesão por esse modelo em animais neonatos é o hipocampo, onde é observada redução no número de neurônios piramidais, na arborização dendrítica, atrofia tecidual e alterações na barreira hematoencefálica (Vannucci *et al.*, 1999; Sutherland *et al.*, 2004; Duman *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2016). Para mimetizar a HI em bebês muito prematuros (entre 28 e 32 semanas de gestação), utiliza-se o modelo no dia pós-natal 3 (DPN3) em roedores (Sanches *et al.*, 2015; Durán *et al.*, 2017; Odorczyk

et al., 2020). No entanto, para simular a HI em nascidos a termo (entre 37 e 41 semanas de gestação) é realizada em ratos no DPN11 (Semple *et al.*, 2013; Odorcyk *et al.*, 2020). As diferenças na severidade da lesão hipóxico-isquêmica entre as idades podem estar relacionadas com os diferentes tempos de maturação dos neurônios GABAérgicos ou diferentes formas de metabolismo energético (Ben-Ari, 2007; Manley, 2013; Odorcyk *et al.*, 2020). Ratos no DPN11 têm maiores chances de apresentarem déficits cognitivos tangíveis à memória e aprendizado, além de apresentarem lesões encefálicas mais exacerbadas em relação aos ratos que sofreram HI no DPN3 (Alexander *et al.*, 2014; Sanches *et al.*, 2015; Odorcyk *et al.*, 2020).

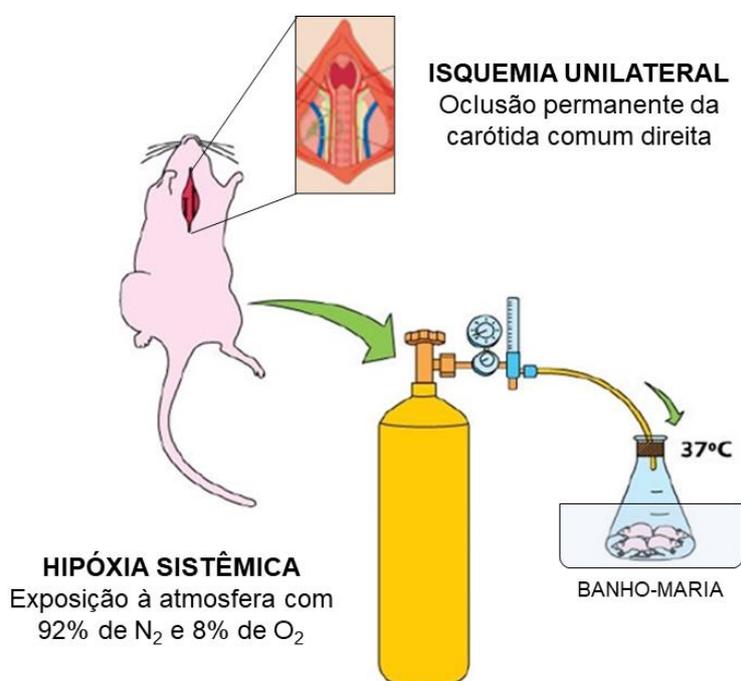


Figura 3. Ilustração do modelo modificado de HI Rice-Vannucci. Primeiramente, os animais anestesiados e submetidos à cirurgia para oclusão da artéria carótida comum direita (isquemia unilateral). Em seguida, após 2h de recuperação, os animais foram colocados dentro de uma câmara hipóxica (hipóxia sistêmica), em uma temperatura corporal controlada a 37°C.

1.3 Neurotransmissor GABA

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos adultos. Entretanto, em estágios iniciais do desenvolvimento neural, o GABA assume um papel excitatório. Já foi

demonstrado que o GABA despolariza neurônios imaturos em várias regiões do SNC de diversas espécies animais (Ben-Ari *et al.*, 2002, Owens *et al.*, 2002; Ben-Ari, 2012).

O GABA exerce sua atividade, tanto como agente excitatório quanto inibitório, por meio de sua ligação aos receptores GABAérgicos (GABARs). Sabe-se que há pelo menos três tipos de receptores de GABA distribuídos pelo SNC: o GABA_A, o GABA_B e o GABA_C. Ao se ligar aos receptores GABA_A e GABA_C, a molécula de GABA provoca a abertura de um canal iônico de cloreto (Cl⁻), portanto esses receptores são considerados ionotrópicos. Os receptores GABA_B são receptores heterodiméricos acoplados à proteína G que afetam as correntes iônicas neuronais através de segundos mensageiros, portanto são considerados metabotrópicos (Watanabe *et al.*, 2002; Jelitai e Madarasz, 2005). O fluxo de Cl⁻ ativado pelo GABA é passivo e depende do potencial de equilíbrio da célula para este ânion (Ben-Ari *et al.*, 2012). No cérebro imaturo, os progenitores neuronais expressam o receptor GABA_A desde os estágios iniciais do neurodesenvolvimento. Em roedores, estes receptores estão presentes nas células-tronco neuronais (LoTurco *et al.*, 1995; Owens *et al.*, 1996) e nos neuroblastos migratórios (Manent *et al.*, 2005), antes mesmo do início da sinaptogênese GABAérgica (Wisden e Franks, 2017).

1.4 Homeostase de Cloreto em Neurônios

A ação excitatória do GABA é encontrada na maioria dos neurônios em desenvolvimento em todas as regiões do SNC, incluindo hipotálamo, hipocampo, bulbo olfatório, medula espinal, estriado, cerebelo e córtex (Connor *et al.*, 1987; Cherubini *et al.*, 1990, 1991; Yuste e Katz, 1991; Ben-Ari *et al.*, 1994; LoTurco *et al.*, 1995; Obrietan e van den Pol, 1995; Serafini *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2016). A capacidade de troca de função da sinalização GABAérgica de excitatória para inibitória, ou vice-versa, depende, em parte, da concentração de cloreto intracelular ([Cl⁻]_i), a qual é a determinante chave da resposta neuronal ao GABA (Ben-Ari *et al.*, 2012). Como os receptores GABA_A são canais de Cl⁻ controlados por ligantes, existe uma relação direta entre as concentrações de Cl⁻ intracelular e a resposta produzida pela sinalização GABAérgica (Tsukahara *et al.*, 2015). O receptor GABA_A permite a entrada ou a saída passiva de íons Cl⁻

de acordo com o potencial de equilíbrio do neurônio para este íon, isto é, o ânion fluirá pelo canal em qualquer direção, dependendo do seu gradiente eletroquímico. Quando a $[Cl^-]_i$ é alta, como no caso de neurônios imaturos em condições normais, o potencial de equilíbrio do Cl^- é positivo em relação ao potencial da membrana em repouso e, conseqüentemente, a ativação do receptor $GABA_A$ resulta no efluxo líquido de Cl^- , o que facilita a despolarização neuronal. Quando a $[Cl^-]_i$ é baixa, como no caso de neurônios maduros em condições normais, o potencial de equilíbrio do Cl^- é negativo em relação ao potencial de membrana em repouso e, conseqüentemente, a ativação do receptor $GABA_A$ resulta no influxo líquido de Cl^- , facilitando a hiperpolarização neuronal (Figura 4). Sabe-se que as chances de ocorrência de um potencial de ação aumentam com a despolarização e diminuem com a hiperpolarização da membrana neuronal. Dessa forma, uma baixa $[Cl^-]_i$ facilita a inibição pós-sináptica mediada pelo GABA, ao passo que a alta $[Cl^-]_i$ facilita a excitação (Ben-Ari *et al.*, 2012).

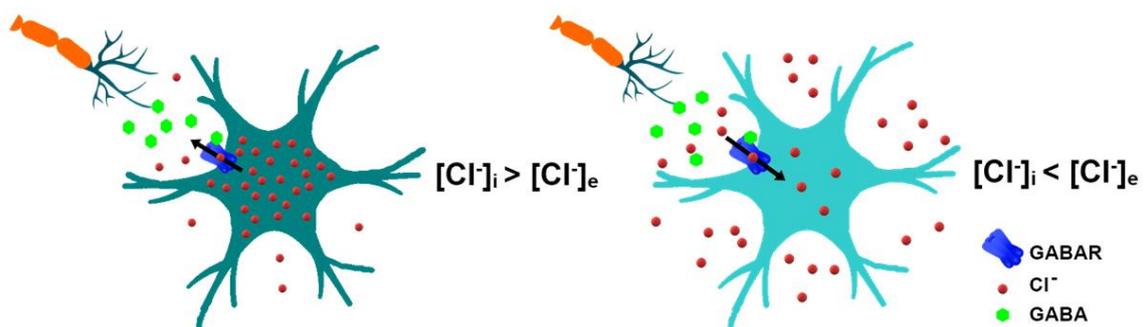


Figura 4. Neurônio imaturo à esquerda e neurônio maduro à direita. Em neurônios imaturos, a concentração de $[Cl^-]_i$ é maior do que $[Cl^-]_e$ e, portanto, a sinalização GABAérgica gera um efluxo de cloreto no neurônio, despolarizando-o e favorecendo a excitação. Entretanto, em neurônios maduros, a concentração de $[Cl^-]_i$ é menor do que $[Cl^-]_e$ e, portanto, a sinalização GABAérgica gera um influxo de cloreto no neurônio, hiperpolarizando-o e favorecendo a inibição. Fonte do autor.

O equilíbrio entre inibição e excitação neuronal é crítico para o funcionamento adequado do sistema nervoso (Haider *et al.*, 2006; Buzsaki *et al.*, 2007), e os neurônios regulam as $[Cl^-]_i$ para garantir respostas elétricas apropriadas (Ben-Ari *et al.*, 2012). A $[Cl^-]_i$ basal é relativamente baixa – em torno de 5 mM – ao passo que a concentração extracelular de Cl^- está em torno de

110 mM, no SNC maduro. Aumentos relativamente pequenos da $[Cl^-]_i$ destes neurônios podem tornar o GABA excitatório e aumentos exacerbados, podem tornar o GABA hiperexcitatório, comumente associado a distúrbios do SNC como a própria HI neonatal (Raimondo *et al.*, 2017).

1.5 Cotransportadores de Cloreto

A homeostase dos íons cloreto não é regulada exclusivamente pelos receptores GABAérgicos, mas também por outras proteínas responsáveis pelo transporte de Cl^- e que atuam em sinergia. Esse equilíbrio dinâmico é importante para uma série de processos neurofisiológicos. O Cl^- é primordial em vários processos fisiológicos, como a regulação gênica (Succol *et al.*, 2012; Valdivieso *et al.*, 2016), a manutenção do pH (Ruffin *et al.*, 2014) e o controle do volume celular (Sardini *et al.*, 2003). A regulação precisa da $[Cl^-]_i$ é atingida, em parte, pela atividade de cotransportadores de Cl^- . Os cotransportadores Na-K-Cl (NKCC1 e NKCC2) transportam íons cloreto para dentro da célula, elevando a quantidade desses íons acima do seu equilíbrio eletroquímico (Ben-Ari, 2012). Por outro lado, ao acoplar o transporte de Cl^- ao gradiente externo de potássio, os cotransportadores K-Cl (KCC1, KCC2, KCC3 e KCC4) transportam íons cloreto principalmente para fora da célula, reduzindo a quantidade desses íons abaixo de seu equilíbrio eletroquímico (Kahle *et al.*, 2008). Nos neurônios, os principais cotransportadores de íons cloreto são o NKCC1 e o KCC2 (Tzanoulinou *et al.*, 2014).

Em condições fisiológicas basais, os neurônios hipocampais mostram forte expressão de NKCC1 e baixa expressão de KCC2 durante a vida embrionária e neonatal em roedores (Ben-Ari *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009). A mudança gradual da atividade dominante do NKCC1 em neurônios imaturos para uma atividade dominante do KCC2 em neurônios maduros (Plotkin *et al.*, 1997; Rivera *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2004) faz com que a ativação dos receptores GABAérgicos mude gradualmente de despolarizante para hiperpolarizante (típica de neurônios maduros), uma vez que a $[Cl^-]_i$ diminui gradualmente ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso (Ben-Ari *et al.*, 1994) (Figura 5). Dessa forma, o balanço funcional entre os cotransportadores de Cl^- é um determinante importante na inversão de excitatório para inibitório do

neurotransmissor GABA (Ben-Ari *et al.*, 1994), importante para o desenvolvimento das funções do SNC. Qualquer retardo ou antecipação na troca de função GABAérgica pode originar um desequilíbrio entre neurônios excitatórios e inibitórios no SNC, levando a um desbalanço entre estimulação e inibição (O'Marín, 2012; Nelson e Valakh, 2015; Furukawa *et al.*, 2017).

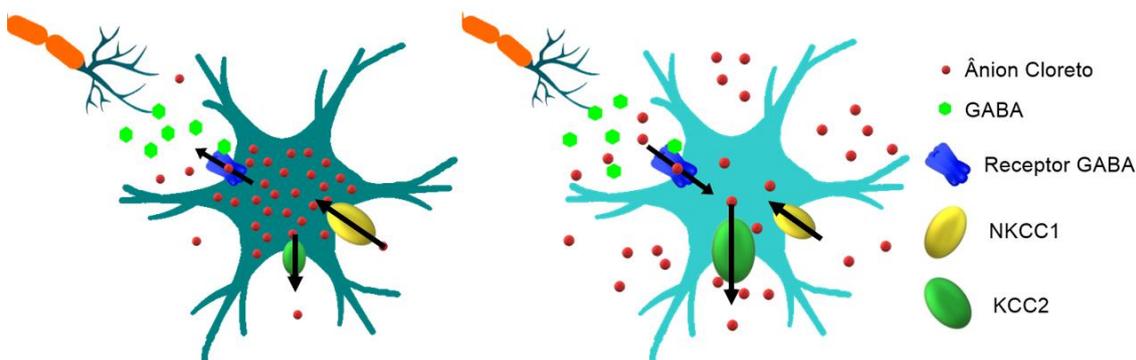


Figura 5. Expressão de NKCC1 (importador de Cl⁻) e KCC2 (exportador de Cl⁻) em neurônio imaturo à esquerda e neurônio maduro à direita. Nos neurônios imaturos, a razão NKCC1/KCC2 é maior, gerando uma [Cl⁻]_i maior que a [Cl⁻]_e, o que torna o GABA excitatório. Nos neurônios maduros, a razão NKCC1/KCC2 é menor, gerando uma [Cl⁻]_i menor que a [Cl⁻]_e, o que torna o GABA inibitório. Fonte do autor.

Por exemplo, o bloqueio da atividade e/ou expressão do NKCC1 prejudica a maturação morfológica dos neurônios corticais e hipocâmpais, reduz a arborização dendrítica, prejudica a atividade motora, reduz a população de neurônios motores e interneurônios, provoca uma redução na elaboração de axônios, altera a sinaptogênese e leva à redução volumétrica do encéfalo e da medula espinal (Ploktin *et al.*, 1997; Isering *et al.*, 1998). Em neonatos de várias espécies, o KCC2 é expresso em níveis muito baixos (Wang *et al.*, 2002). Um desvio negativo no potencial de reversão de GABA é acompanhado por um aumento na expressão do KCC2 em neurônios do córtex e do hipocampo de ratos em torno da segunda semana de vida (Clayton *et al.*, 1998). Em seres humanos, a expressão do KCC2 no neocórtex começa a aumentar em torno da 40^a semana após a concepção (Rivera *et al.*, 1999) e a expressão de NKCC1 atinge níveis similares aos de adultos em torno da 50^a semana após a concepção (Dzhala *et al.*, 2005). Em estágios iniciais de neurodesenvolvimento, o aumento na expressão de KCC2 ocorre simultaneamente com a diminuição da expressão

de NKCC1, resultando na prevalência do efluxo sobre o influxo de Cl^- , o que diminui a $[\text{Cl}^-]_i$. No córtex cerebral de roedores, a expressão de KCC2 é mínima ao nascimento, baixa durante a primeira semana de vida e comparável com o nível adulto entre DPN14-15. Já a expressão de NKCC1 em neurônios corticais é mais alta durante a primeira semana pós-natal, diminuindo no DPN14 para níveis mais baixos, similares aos encontrados em adultos (Dzhala *et al.*, 2005).

O desequilíbrio entre excitação e inibição GABAérgica é característico de vários distúrbios neurológicos, podendo causar anormalidades como epilepsia, esquizofrenia e depressão (Ramamoorthi *et al.*, 2011). Déficits na expressão do KCC2 estão associados a quadros de epilepsia em humanos e em modelos animais (Kelley *et al.*, 2018). Quadros clínicos graves de epilepsia na infância com convulsões focais migratórias são observados em seres humanos com mutações associadas à perda de função do KCC2 (Stödberg *et al.*, 2015; Saitsu *et al.*, 2016). Um déficit de 95% no KCC2 resulta em convulsões e mortalidade entre a segunda e a terceira semanas de vida pós-natal (Woo *et al.*, 2002).

Tsukahara e colaboradores (2017), também demonstraram que o estresse materno em roedores retarda a troca de função GABAérgica no hipocampo da prole. O estresse repetido induzido também gera alterações nos padrões de expressão de KCC2 e NKCC1 no hipocampo de roedores fêmeas, contribuindo para a geração de estados hiperexcitatórios; em humanos esta condição poderia estar associada à epilepsia e esquizofrenia, em virtude do desequilíbrio entre excitação e inibição (Hyde *et al.*, 2011; Tsukahara *et al.*, 2015). Além disso, em algumas condições fisiopatológicas, como HI neonatal em roedores, a expressão de NKCC1 pode aumentar significativamente em períodos de 24h a 48h após o insulto (Sung *et al.*, 2000), ao passo que a expressão de KCC2 pode diminuir nas primeiras duas semanas de vida (Jaenisch *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014).

1.6 Hipóxia-Isquemia e maturação GABAérgica

Durante o evento hipóxico-isquêmico, o aumento da expressão de NKCC1, a diminuição da expressão de KCC2 ou ambos, podem ser

responsáveis pelo acúmulo intracelular de íons cloreto e consequente hiperexcitabilidade GABAérgica (Lipton, 1999; Ben-Ari, 2017). Yan e colaboradores (2001), documentaram o aumento da expressão de NKCC1 no córtex cerebral 2h após a oclusão da artéria cerebral média esquerda em um modelo de isquemia cerebral em ratos no terceiro mês de vida. Também demonstraram o papel do NKCC1 no aumento do edema cerebral e nos danos neuronais durante a isquemia cerebral em ratos machos. Além disso, registraram que a expressão de NKCC1 aumentou após 2h de isquemia e persistiu durante 24h após a reperfusão, no córtex cerebral, hipocampo e estriado do cérebro de ratos. Liu e colaboradores (2010), demonstraram o papel do NKCC1 na gênese de edema em camundongos jovens e idosos no modelo de isquemia cerebral focal transitório e também demonstraram que a expressão de NKCC1 aumenta mais em camundongos jovens em comparação aos camundongos idosos. O aumento dos níveis de NKCC1 ou a diminuição dos níveis de KCC2 faz com que a $[Cl^-]_i$ mude a ação GABAérgica da hiperpolarização para despolarização, induzindo convulsões (Brandt *et al.*, 2010). Em modelos animais de isquemia cerebral, os níveis de KCC2 são reduzidos significativamente, alterando o tônus de ação GABAérgica (Jaenisch *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2016).

Essas alterações bioquímicas decorrentes da HI neonatal são drásticas e podem comprometer o neurodesenvolvimento e o neurofuncionamento adequado durante toda a vida do animal. Baseando-se nos padrões bioquímicos, fisiológicos e morfológicos seguidos pelo SNC diante dessas condições adversas, é conveniente buscar métodos terapêuticos que visem frear (ou até impedir) os avanços prejudiciais da HI neonatal no SNC, bem como aprimorar outras terapias estabelecidas, como a hipotermia (Laptook *et al.*, 2017).

Atualmente, a hipotermia é a única terapia aprovada em neonatos humanos que são vítimas da HI (Tagin *et al.*, 2012; Shankaran *et al.*, 2017). Nesta terapia, a temperatura encefálica é reduzida para a faixa entre 32°C e 34°C, durante períodos de 48h a 72h, visando reduzir a taxa metabólica neuronal, bem como a demanda energética dos neurônios (Globus *et al.*, 1995; Shankaran *et al.*, 2017). O efeito dessa conduta terapêutica tende à redução da

mortalidade e à diminuição do grau de morbidade em neonatos acometidos pela HI (Jacobs *et al.*, 2013). Entretanto, essa terapia tem consideráveis limitações de eficácia, sobretudo se o evento for severo ou se a terapia for aplicada tardiamente (após 6h do nascimento) e, além disso, não é recomendada para recém-nascidos muito prematuros (Jacobs *et al.*, 2013; Laptook *et al.*, 2017). Portanto, faz-se necessária a investigação de terapias alternativas e/ou complementares para a HI neonatal e manutenção do equilíbrio entre excitação e inibição do SNC.

1.7 Bumetanida

A bumetanida (ácido 3-aminossulfonil-5-butilamino-4-fenoxibenzóico) é uma molécula que age como inibidor de NKCC1 e tem, portanto, um efeito neuroprotetor para convulsões tanto em humanos (Kahle *et al.*, 2009) como em modelos animais (Brandt *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012), bem como em modelos de lesão cerebral traumática em ratos (Lu *et al.*, 2006, 2007). Este fármaco é um antagonista competitivo reversível altamente seletivo de NKCC1 que, em condições patológicas, restaura a $[Cl^-]$ e melhora a ação GABAérgica (Shulga *et al.*, 2012; Ben-Ari, 2017). Foi demonstrado que a bumetanida não influencia a atividade GABAérgica em neurônios de ratos nocaute para NKCC1 (Ben-Ari, 2017), sugerindo que antagonistas de NKCC1 podem ter ação protetora diante de injúrias do SNC e que o NKCC1 é um potencial alvo terapêutico. Na fase aguda da isquemia cerebral em ratos adultos, a bumetanida reduziu o edema cerebral (Tao *et al.*, 2019); também reduziu a gravidade dos danos aos neurônios e oligodendrócitos em roedores (Yan *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2014).

A HI pode aumentar o nível de expressão de NKCC1 e/ou diminuir o nível de expressão de KCC2 (Jaenisch *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014; Martin-Aragon Baudel *et al.*, 2017). Recentemente, tem se mostrado que a administração deste antagonista de NKCC1 24h, 48h e 72h após a indução de isquemia cerebral é capaz de atenuar os efeitos da injúria isquêmica (Cleary *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2017). A bumetanida também pode criar um microambiente favorável à neurogênese, à regeneração axonal e à restauração sináptica que contribuem para a recuperação comportamental e funcional (Tao *et al.*, 2019).

Além disso, este fármaco teve efeito positivo sobre a sinaptogênese, preservando significativamente a expressão de PSD-95 (Mu *et al.*, 2017).

No entanto, seus efeitos são desconhecidos em diferentes períodos críticos do neurodesenvolvimento encefálico do neonato, tampouco suas implicações na maturação GABAérgica, na sinaptogênese, na severidade da lesão e na função cognitiva dos animais. Assim, avaliar o papel da bumetanida em períodos críticos do neurodesenvolvimento torna-se necessário para a investigação de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da HI neonatal.

1.8 Justificativa

De acordo com os achados científicos introduzidos acima, evidencia-se que a privação energética é um fator importante na fisiopatologia da HI neonatal em diversos mecanismos bioquímicos e fisiológicos, tais como a ação GABAérgica e a sinaptogênese no período pós-natal. Em vista disso, tendo ciência das ações farmacológicas da bumetanida, torna-se importante a investigação dos possíveis efeitos neuroprotetores da sua administração no modelo animal de HI neonatal em diferentes períodos do neurodesenvolvimento (DPN3 e DPN11), uma vez que mimetizam os quadros derivados da HI em condições de prematuridade extrema e de nascimento a termo em humanos.

1.9 Hipótese

Considerando as ações positivas da bumetanida e os efeitos da HI neonatal sobre a maturação GABAérgica e a sinaptogênese no SNC, as hipóteses de trabalho do presente estudo foram: (1) a bumetanida reduz os efeitos deletérios da HI neonatal quando induzida no terceiro e décimo primeiro dia pós-natal (DPN3 e DPN11), tornando a maturação GABAérgica dos neurônios hipocâmpais mais próxima do que ocorre em condições fisiológicas basais, (2) a bumetanida é capaz de reduzir alterações induzidas pela HI na expressão de proteínas associadas à sinaptogênese, minimizar a severidade da lesão e preservar a função cognitiva dos animais e (3) a bumetanida exerce melhor efeito sobre os animais no DPN11 em relação aos animais no DPN3.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da bumetanida sobre os prejuízos morfofuncionais, moleculares e comportamentais de ratos Wistar machos submetidos à HI neonatal no terceiro e décimo primeiro dia de vida pós-natal.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da bumetanida sobre o imunoconteúdo dos cotransportadores NKCC1 e KCC2 no hipocampo durante a fase aguda da lesão HI, e do tratamento com bumetanida sobre esses parâmetros por meio da técnica de *Western blot*;
- Verificar o imunoconteúdo de proteínas associadas à sinaptogênese hipocampal, sinaptofisina e PSD-95, durante a fase aguda da lesão HI, e do tratamento com bumetanida sobre esses parâmetros através da técnica de *Western blot*;
- Avaliar os efeitos da bumetanida sobre o comprometimento e a severidade da lesão HI induzida nos diferentes estágios de neurodesenvolvimento através de testes de reflexos neurológicos (geotaxia negativa e endireitamento), de tarefas cognitivas (campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto aquático de Morris) e de análise histológica (volume da lesão encefálica e morte celular).

3. Materiais e Métodos

3.1 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram realizados por experimentadores treinados no manuseio dos animais, de acordo com a resolução normativa nº37, de 15 de fevereiro de 2018 e a resolução normativa nº30, de 02 de fevereiro de 2016 do CONCEA e de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais, constantes do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, 2011)* do *National Research Council of the National Academies*. Todos os cuidados necessários pré- e pós-cirúrgicos e os protocolos experimentais utilizados neste projeto foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o número 39344.

3.2 Animais

Foram utilizadas 25 ninhadas de ratos Wistar, contendo um número de 10 filhotes machos por mãe. Os animais foram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS. As ninhadas foram retiradas do centro de reprodução do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, no DPN1. Os filhotes foram alocados em caixas Plexiglass (42cm x 34cm x 18cm) fornecidas com maravalha, juntamente com suas respectivas mães. Os animais foram mantidos com alimentação padrão e água *ad libitum*, e ciclos de 12h claro/escuro em salas climatizadas ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Após o desmame (DPN22), os machos permaneceram nas condições descritas acima, em grupos de no máximo 4 animais por caixa. As ratas-mães foram anestesiadas profundamente com isoflurano inalatório e eutanasiadas após o DPN22.

3.3 Delineamento Experimental

3.3.1 Experimento 1: Dosagem de Bumetanida

Em razão da escassez e da divergência de informações na literatura a respeito de uma dose adequada de bumetanida em animais neonatos, realizou-se um primeiro experimento para a padronização da dose. Foram testadas três doses diferentes de bumetanida em ordem crescente de concentração: 0,01 mg/kg (dose baixa), 0,05 mg/kg (dose média) e 0,5 mg/kg (dose alta), todas diluídas em solução salina 0,9% (NaCl 0,9%). As doses de bumetanida ou salina foram administradas 1h, 24h, 48h e 72h após a indução da HI.

Para isso, foram utilizados 70 animais: 35 animais no DPN3 e 35 animais no DPN11. Para cada idade, os grupos continham 7 animais.

- SHAM (controles tratados com salina)
- HI-SAL (submetidos à HI e tratados com salina)
- HI-BUM 0,01 (submetidos à HI e tratados com bumetanida a 0,01 mg/kg)
- HI-BUM 0,05 (submetidos à HI e tratados com bumetanida a 0,05 mg/kg)
- HI-BUM 0,5 (submetidos à HI e tratados com bumetanida a 0,5 mg/kg)

O efeito da dose de bumetanida foi avaliado através da extensão do volume de tecido encefálico infartado em ratos neonatos submetidos à HI. Para determinar o volume de extensão do tecido infartado nestes animais, foi utilizada a técnica de TTC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio), descrita posteriormente na seção de análise histológica. A análise volumétrica dos encéfalos lesionados sugeriu que a dose de 0,5 mg/kg de peso corporal da bumetanida foi mais eficaz na preservação do tecido encefálico.

3.3.2 Experimento 2: Avaliação Comportamental, Histológica e Bioquímica

Uma vez estabelecida a dose a ser utilizada ao longo do presente estudo, o segundo experimento visou avaliar os efeitos da bumetanida em animais submetidos à HI, considerando parâmetros bioquímicos, comportamentais e morfológicos. O procedimento cirúrgico foi realizado nos

DPN3 e DPN11, conforme descrito posteriormente, a fim de mimetizar o evento hipóxico-isquêmico em neonatos humanos na condição de prematuridade extrema (HI_DPN3) e de nascimento a termo (HI_DPN11), respectivamente. Após a última injeção de bumetanida (72h pós-lesão), um grupo de animais foi eutanasiado, tiveram seus encéfalos cuidadosamente dissecados e o hipocampo ipsilateral à oclusão carotídea armazenado para posterior análise. A partir de análises bioquímicas, os imunoconteúdos de NKCC1 e KCC2 foram avaliados como marcadores de maturação GABAérgica. Além disso, os imunoconteúdos de PSD-95 e sinaptofisina foram avaliados como marcadores de sinaptogênese. Finalmente, outro grupo de animais foi avaliado no período lactacional e na idade de adulto jovem (DPN50-60), a fim determinar a função reflexa neurológica e cognitiva, bem como a severidade da lesão (DPN60) (Figura 6).

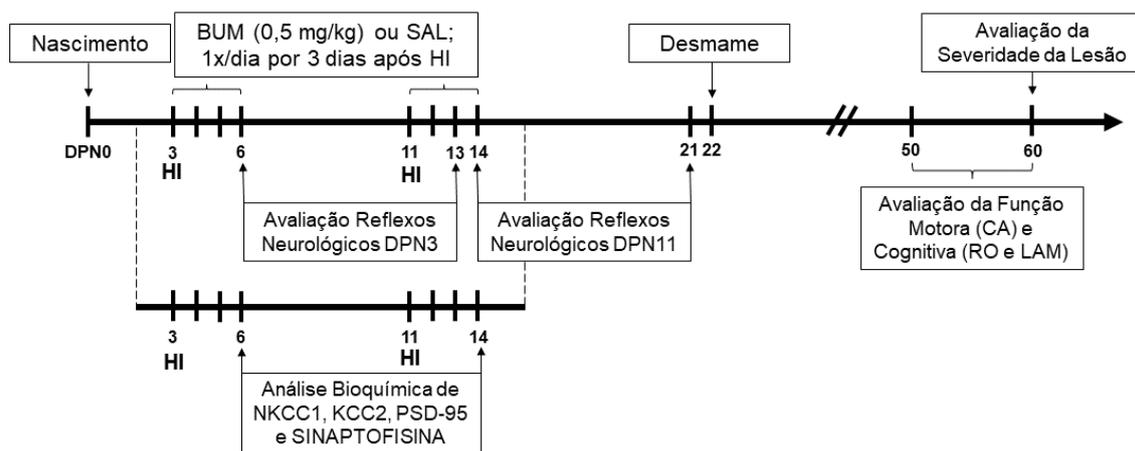


Figura 6. Delineamento experimental dos procedimentos realizados no presente estudo. BUM: bumetanida; SAL: salina; HI: hipóxia-isquemia; DPN: dia pós-natal; CA: campo aberto; RO: reconhecimento de objeto; LAM: labirinto aquático de Morris.

3.4 Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal

Foi utilizado o modelo de Levine (1960) para a HI, modificado por Rice e colaboradores (1981) e adaptado a roedores de 3 e 11 dias de vida, mimetizando respectivamente, um recém-nascido humano prematuro extremo e um recém-nascido humano a termo (Sanches *et al.*, 2013a; Durán *et al.*, 2017). Para isto, os animais foram anestesiados com isoflurano (4% para indução e 1,5 - 2% para manutenção com um fluxo de 3 L/min) e submetidos a uma incisão na linha média da face anterior da região cervical; a artéria carótida comum direita

foi identificada, isolada de estruturas adjacentes e ocluída permanentemente (isquemia). A assepsia da região cervical pré- e pós-cirurgia foi feita com álcool iodado. Os animais receberam aplicação tópica de lidocaína 10% (Xilocaína®) após a oclusão da carótida. Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram em recuperação sob temperatura controlada (37°C) durante 15 minutos antes de serem devolvidos às caixas moradia, onde permaneceram por um intervalo de 2 horas junto às mães. Por fim, em grupos de 6 indivíduos submetidos à HI_DPN3 e 4 indivíduos submetidos à HI_DPN11, os animais foram gentilmente acondicionados em uma câmara específica de controle de O₂ e expostos à atmosfera hipóxica (8% de O₂ e 92% de N₂, com fluxo de 5 L/min) durante 120 minutos (HI_DPN3) e 60 minutos (HI_DPN11) (hipóxia). A diferença no tempo de duração da hipóxia foi adotada a fim de garantir graus de severidade da lesão semelhantes entre as idades, visto que animais DPN3 apresentam maior tolerância anaeróbica encefálica em relação aos animais DPN11 (Odrocyk *et al.*, 2020). A câmara de hipóxia ficou parcialmente submersa em banho-maria a 37°C a fim de manter a temperatura corporal dos ratos lactentes dentro dos limites fisiológicos. Nos animais do grupo SHAM (controle cirúrgico) foi realizada a anestesia, feita a incisão e tiveram a carótida comum direita exposta, porém sem oclusão e não foram submetidos à hipóxia. Além disso, foram aquecidos por um tapete térmico à temperatura controlada de 37°C. Ao final da hipóxia, os animais foram retirados da câmara e devolvidos à caixa de origem junto às mães.

3.5 Administração da Bumetanida

A bumetanida na dose de 0,5 mg/kg, conforme os resultados do experimento 1, foi administrada por via intraperitoneal 1h após a hipóxia e uma vez ao dia, durante 3 dias posteriores à cirurgia. Nos animais do grupo SHAM foi injetada solução salina 0,9% (NaCl 0,9%) como veículo, por via intraperitoneal, durante os mesmos períodos que os animais tratados com bumetanida (Hu *et al.*, 2017).

3.6 Grupos Experimentais

Considerando o procedimento cirúrgico e a administração do fármaco, os animais foram divididos em 2 idades, cada um com 3 grupos experimentais, conforme apresentado na Tabela 1:

Tabela 1. Idades experimentais e seus respectivos grupos.

Idades	Grupos
HI_DPN3	SHAM – controle cirúrgico + administração de salina (veículo)
	HI-SAL – HI + administração de salina (veículo)
	HI-BUM – HI + administração de bumetanida (0,5 mg/kg)
HI_DPN11	SHAM – controle cirúrgico + administração de salina (veículo)
	HI-SAL – HI + administração de salina (veículo)
	HI-BUM – HI + administração de bumetanida (0,5 mg/kg)

3.7 Análise Neuromotora durante o Período Lactacional

A avaliação neuromotora foi realizada por meio da execução dos testes de reflexos neurológicos (geotaxia negativa e endireitamento) 72h e 10 dias após a lesão HI.

3.7.1 Reflexo de Geotaxia Negativa

O teste do reflexo de geotaxia negativa avalia a função vestibular e proprioceptiva dos animais. Para isso, os animais foram posicionados sobre um plano inclinado em ângulo de 30° com a cabeça orientada para a direção do solo e foi mensurada a latência do animal ao adotar a posição contrária, isto é, virar-se 180°. O tempo estipulado para o teste foi de 60 segundos (Sanches *et al.*, 2017). O teste foi executado três vezes com intervalo de 5 minutos em dois momentos do desenvolvimento de cada animal: 72h e 10 dias após a indução da lesão hipóxico-isquêmica em ambas as idades (HI_DPN3 e HI_DPN11). Os animais que não completaram a tarefa, foram pontuados com o tempo máximo. O número de animais utilizados para este teste foi de 15 por grupo.

3.7.2 Reflexo de Endireitamento

O teste do reflexo de endireitamento avalia a função motora e a coordenação dos animais. Para isso, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma superfície plana e foi mensurada a latência do animal ao adotar a posição de decúbito ventral com as quatro patas apoiadas na superfície. O tempo estipulado para o teste foi de 15 segundos (Sanches *et al.*, 2017). O teste foi executado três vezes com intervalo de 5 minutos em dois momentos do desenvolvimento de cada animal: 72h e 10 dias após a indução da lesão hipóxico-isquêmica em ambas as idades. Os animais que não completaram a tarefa foram pontuados com o tempo máximo. O número de animais utilizados para este teste foi de 15 por grupo.

3.8 Análise Comportamental na Fase Adulta

A avaliação comportamental foi realizada a partir dos 50 dias de vida por meio da execução dos seguintes testes comportamentais: campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris.

3.8.1 Campo Aberto

A atividade exploratória e locomotora dos animais foi avaliada através do teste do campo aberto. Os animais foram acondicionados em uma arena quadrada de madeira de 50cm x 50cm x 39cm (comprimento x altura x profundidade) dividido em 12 quadrantes iguais. Cada animal foi posicionado no quadrante posterior esquerdo e observou-se a permanência na zona periférica, a permanência na zona central e o número de cruzamentos entre os quadrantes, durante 300 segundos (Durán *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2022). O número de animais utilizados para este teste foi de 12 para o grupo SHAM e 15 para os grupos HI-SAL e HI-BUM.

3.8.2 Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos avalia a memória declarativa através do comportamento exploratório do animal. Na primeira etapa do teste (*trial*), cada animal foi colocado em uma arena quadrada de madeira de 50cm x

50cm x 39cm (comprimento x altura x profundidade) e confrontado com dois objetos diferentes para livre exploração, e o tempo de exploração de cada objeto foi registrado durante 5 minutos. Na segunda etapa (*probe trial*), cada animal foi exposto a dois objetos colocados na mesma arena: um objeto familiar (usado no *trial*) e um objeto novo (novidade). O tempo gasto explorando o objeto novo e o objeto familiar foi medido durante 5 minutos. A partir dos tempos de exploração dos objetos registrados, calculou-se o índice de discriminação no *probe trial*; o índice de discriminação é a razão entre o tempo de exploração do objeto novo e tempo total gasto explorando os dois objetos ($B/B + A$, onde B é o objeto novo e A é o objeto familiar) (Rojas *et al.*, 2013). O número de animais utilizados para este teste foi de 12 para o grupo SHAM e 15 para os grupos HI-SAL e HI-BUM.

3.8.3 Labirinto Aquático de Morris

Este teste avaliou a memória espacial dos animais e foi realizado em um tanque circular de 200 cm de diâmetro, sendo 40 cm de profundidade cobertos por água (temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$) e uma plataforma com 10 cm de diâmetro (da mesma cor do tanque) submersa 2 cm abaixo da superfície da água em uma sala contendo pistas visuais nas paredes que o cercam. O tanque foi dividido virtualmente em 4 quadrantes de onde os animais iniciaram as tentativas de localizar a plataforma: N (norte), S (sul), L (leste) e O (oeste). Foi utilizado o protocolo de avaliação da memória de referência (Sanches *et al.*, 2013b).

Protocolo de Memória de Referência: a posição da plataforma permaneceu no mesmo local durante todo o período de treino. Os animais realizaram quatro “*trials*” por dia, durante 5 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a fase de treino, uma sessão de 60 segundos sem a plataforma foi realizada para avaliar a memória de longo prazo. Foram analisados os seguintes parâmetros: latência para cruzar pela primeira vez a zona da plataforma e tempo gasto no quadrante alvo (Sanches *et al.*, 2013b). Os animais foram filmados e os dados registrados pelo software ANY-MAZE. O número de animais utilizados para esse teste foi de 12 para o grupo SHAM e 15 para os grupos HI-SAL e HI-BUM.

3.9 Análise Histológica

3.9.1 Coloração de 2,3,5-Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC)

Para a avaliação do efeito das diferentes doses de bumetanida através da análise morfométrica do encéfalo lesionado, utilizou-se a técnica de coloração de TTC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio), que é baseada na redução do 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio por enzimas mitocondriais de células vivas e na geração do tom avermelhado que distingue o tecido viável do não viável (esbranquiçado). Inicialmente, os ratos foram profundamente anestesiados com isoflurano inalatório e, então, submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina (NaCl 0,9%). Após a perfusão, os encéfalos foram cuidadosamente dissecados e cortados manualmente no plano coronal com o auxílio de navalhas e de um molde com fendas milimetricamente espaçadas (*brain slicer*), em 5 secções de 2 mm de espessura cada. As secções de tecido foram incubadas por 20 minutos em uma solução de TTC 2% (Cat. No. 298-96-4) à temperatura ambiente em placas de poços e, em seguida, fixadas em paraformaldeído 4% (PFA 4%). As secções coradas com TTC foram digitalizadas e analisadas utilizando o programa ImageJ (NIH, Bethesda, EUA). As áreas calculadas correspondentes ao tecido vivo (corado em vermelho) e tecido não vivo (esbranquiçado) foram multiplicadas pela espessura das fatias (2mm) e pelo número de fatias para a obtenção do volume total (mm³). A partir disso, o cálculo da porcentagem do volume de lesão encefálica (VLE) foi realizado de acordo com a equação a seguir (Tassinari *et al.*, 2020; Tu *et al.*, 2019):

$$\text{VLE (\%)} = \frac{[\text{volume hemisfério contralateral} - (\text{volume hemisfério ipsilateral} - \text{volume de lesão})]}{\text{volume hemisfério contralateral}} \times 100$$

3.9.2 Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE)

A fim de realizar a análise morfométrica encefálica, os animais foram cuidadosamente anestesiados e manipulados para a obtenção dos encéfalos. Os ratos foram profundamente anestesiados com isoflurano inalatório (0,5 mL) e, então, submetidos à toracotomia para a perfusão transcardíaca com 200 mL de solução salina (NaCl 0,9%) para lavagem vascular e, posteriormente, com

200 mL de solução de PFA 4% com tampão fosfato 0,2 M e pH na faixa de 7,4 para a fixação tecidual. Os encéfalos foram coletados e mantidos em solução fixadora de PFA 4% por 24h. Após esse tempo, os encéfalos foram destinados ao processamento histológico para a inclusão em parafina. Primeiramente, os encéfalos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100% I e 100% II). Posteriormente, foram submersos em xilol (xilol I e xilol II); finalmente impregnados por parafina líquida (parafina I, II e III) a 60°C. Os encéfalos ficaram aptos à microtomia após o resfriamento e endurecimento da parafina. Através do micrótomo de rotação (Leica RM-2125), foram realizadas secções coronais (Bregma 4.7 mm a - 8.5 mm; Paxinos e Watson, 1998) de 7 μ m com intervalo de 70 μ m entre os cortes e colocados sobre lâminas histológicas previamente gelatinizadas. O tecido foi corado com hematoxilina e eosina (Cat. No. 517-28-2 e Cat. No. 17372-87-1, respectivamente; Sigma-Aldrich). A morfometria foi baseada no delineamento manual das áreas das estruturas encefálicas de interesse (hemisfério, córtex, estriado e hipocampo) e o volume destas estruturas foi calculado através da equação: Σ das áreas x intervalo entre secções. As lâminas foram digitalizadas em um *scanner* e analisadas utilizando o software ImageJ (NIH, Bethesda, EUA). Para a avaliação do volume de lesão encefálica, utilizou-se 8 animais por grupo (Fabres *et al.*, 2018; Odorcyk *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2022).

3.9.3 Contagem de Células

Para avaliar a taxa de células neuronais em degeneração no hipocampo, utilizou-se as mesmas lâminas coradas com hematoxilina e eosina do experimento anteriormente descrito, nas quais foi possível capturar imagens da área hipocampal de CA1 para quantificar o número de células em degeneração e piramidais totais. As imagens foram obtidas através de microscopia de luz (Nikon Eclipse E-600) em um aumento de 400x. Foi contado o número de neurônios piramidais por imagem capturada e calculado o valor médio de cinco secções diferentes (um campo para cada secção totalizando cinco imagens por animal) através do software ImageJ (NIH, Bethesda, EUA). Os neurônios que apresentavam deformidade do corpo celular ou núcleo cariolfítico, picnótico ou cariorrético foram definidos como células em

degeneração (Garman, 2011; Fabres *et al.*, 2020). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células em degeneração, que foi determinada através da equação: $(\bar{x} \text{ células degeneradas} / \bar{x} \text{ total de células}) \times 100$. Para a avaliação do volume de lesão encefálica, utilizou-se 8 animais por grupo (Fabres *et al.*, 2020).

3.10 Análise Bioquímica

3.10.1 Western Blot

A técnica de *Western blot* foi executada para a quantificação de expressão proteica (imunoconteúdo) dos cotransportadores de cloreto (NKCC1 e KCC2) e de proteínas sinaptogênicas (PSD-95 e sinaptofisina). Após a última dose de bumetanida, as amostras de hipocampo direito (ipsilateral à oclusão da carótida comum) foram rapidamente coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer (-80°C) para posterior homogeneização e determinação da concentração proteica por amostra.

A homogeneização foi realizada em tampão HEPES 10 mM e coquetel de inibidor de protease a 1% (Cat. No. 11.697.498.001, Roche, Alemanha) em pH de 7,9. Adicionou-se ao tampão, detergente não iônico (NP40 1%, Cat. No. 9016-45-9; Sigma-Aldrich) para romper a estrutura da membrana plasmática (Seddon *et al.*, 2004) e detergente de ácido biliar iônico em baixa concentração (desoxicolato de sódio 0,25%, Cat. No. 302-95-4, (D6750); Sigma-Aldrich) para facilitar a extração de proteínas transmembrana, a solubilização e a estabilidade em solução aquosa (Zhou *et al.*, 2006). Homogeneizadas, as amostras lisadas foram submetidas à centrifugação refrigerada a 4°C por 10 minutos a uma força de 1000 g, a fim de obter proteínas celulares presentes no sobrenadante. A determinação da concentração proteica por amostra foi determinada utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Cat. No. 23225; Thermo-Fisher Scientific), resultando na utilização de uma concentração de proteínas equivalentes entre as amostras (40 µg de proteínas totais). A partir disso, as amostras proteicas foram submetidas aos processos de desnaturação, redução e preparo para eletroforese em gel de poliacrilamida gradiente de 4% a 12% (Cat. No. NP0323BOX; Thermo-Fisher Scientific), juntamente com um

marcador de peso molecular de 12 a 225 kDa (Cat. No. RPN800E; GE Healthcare) a 50V e 400 mA por 1h30. Posteriormente, houve a transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de leite desnatado em pó 5% em salina tamponada com Tris contendo tween 20 (T-TBS) por 2 horas e lavadas com T-TBS 0,1 M (contendo 0,05% Triton X-100) por 1 hora em temperatura ambiente.

As membranas foram processadas para imunodeteção (incubadas) com os anticorpos primários contra as proteínas de interesse (*overnight* a 4°C): anti-NKCC1 (1:1000; 14581S, Cell Signaling), anti-KCC2 (1:1000; 07-432, Merck Millipore), anti-PSD-95 (1:1000; 36233S, Cell Signaling), anti-sinaptofisina (1:1000; SAB4200544, Sigma Aldrich) e anti- α -tubulina (1:1000; T6074, Sigma Aldrich). A α -tubulina foi usada como controle de carregamento. Após a incubação com os anticorpos primários, realizou-se as lavagens das membranas e a incubação destas com os anticorpos secundários específicos anti-rabbit IgG e anti-mouse IgG (ambos 1:1000) por 2 horas em temperatura ambiente (22°C \pm 2). Finalmente, as membranas foram reveladas em sistema de quimiluminescência (ImageQuant GE-LAS 4000 - GE Healthcare Life Sciences) utilizando um kit Pierce™ ECL western (Cat. No. 32106; Thermo-Fisher) e as imagens obtidas foram analisadas por densitometria óptica através do software Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Biosciences). Os resultados foram normalizados pela expressão da α -tubulina. Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao grupo controle (SHAM) (Durán *et al.*, 2018). O número de animais utilizados para essa técnica foi de 7 animais por grupo.

3.11 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) considerando como fatores fixos o grupo experimental (SHAM, HI-SAL e HI-BUM) de cada idade (HI_DPN3 e HI_DPN11), seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey quando diferenças significativas foram encontradas. Previamente, foi verificado através de ANOVA de duas vias a presença de interações entre as idades em que os animais foram submetidos à

HI. Os dados com distribuição não normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunn para múltiplas comparações. A curva de aprendizado no labirinto aquático de Morris foi analisada pelo Modelo Linear Generalizado - Estimação de Equações Generalizadas (GEE), considerando os fatores grupo e tempo. A relação entre os testes estatísticos e a análise de cada experimento executado neste trabalho de pesquisa é demonstrada na Tabela 2. A significância aceita foi de $p < 0,05$. Os dados com distribuição normal estão expressos como médias \pm erro padrão da média (EPM) e os dados com distribuição não normal estão expressos em mediana e percentil interquartil 25 e 75. Os testes foram realizados utilizando o programa SPSS versão 21.0 (IBM SPSS Statistics) e os gráficos foram realizados usando o programa Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software).

Tabela 2. Descrição detalhada dos testes estatísticos e análises realizadas nos experimentos.

Experimentos	Distribuição dos Dados	Teste Estatístico
Análise Morfológica (TTC)	Normal	ANOVA de uma via
Análise Bioquímica (<i>Western blot</i>):	Normal	ANOVA de uma via
Análise Neuromotora		
Reflexo de Geotaxia Negativa	Não Normal	Teste de Kruskal-Wallis
Reflexo de Endireitamento	Normal	ANOVA de uma via
Análise Comportamental		
Campo Aberto	Não Normal	Teste de Kruskal-Wallis
Reconhecimento de Objetos	Normal	ANOVA de uma via
Labirinto Aquático de Morris	<i>Trial</i> : não normal	GEE
	<i>Probe trial</i> : normal	ANOVA de uma via
Análise Histológica (HE)		
Volume de Lesão	Normal	ANOVA de uma via
Contagem de Neurônios	Normal	ANOVA de uma via

4. Resultados

4.1 Efeito neuroprotetor da bumetanida após a HI

A análise da extensão do volume infartado 72 horas após a indução da lesão em animais submetidos à HI_DPN3 acusou diferença significativa entre o grupo SHAM e os grupos HI-SAL e HI-BUM 0,01 ($F_{(4,30)} = 4,742$; $p = 0,0074$), sem diferença com HI-BUM 0,05 ($p = 0,1612$) e HI-BUM 0,5 ($p = 0,2960$) (Figura 7A), sugerindo que as doses de 0,05 e 0,5 mg/kg exerceram um efeito neuroprotetor sobre o tecido encefálico. Contudo, a análise realizada em animais submetidos à HI_DPN11, revelou diferenças significativas entre o grupo SHAM e os grupos HI-SAL, HI-BUM 0,01 e HI-BUM 0,05 ($F_{(4,30)} = 14,85$; $p < 0,0001$), sem diferença com HI-BUM 0,5 ($p = 0,1339$) (Figura 7B), sugerindo um possível efeito neuroprotetor da dose 0,5 mg/kg em relação às demais. Conclui-se, a partir disso, que a dose de 0,5 mg/kg de bumetanida apresentou um papel positivo na neuroproteção em ambas as idades. A Figura 8 representa a técnica de TTC.

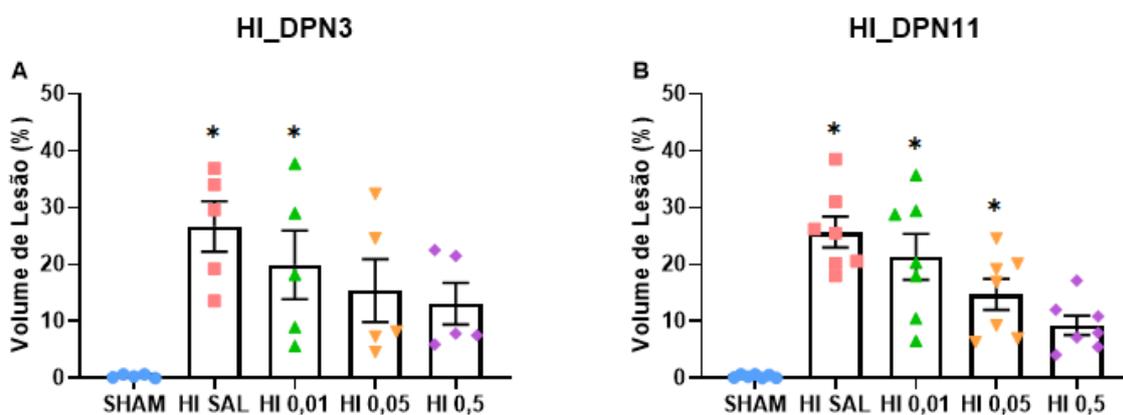


Figura 7. Volume de Lesão Encefálica. O volume de lesão foi expresso pela taxa da extensão do tecido infartado em relação ao hemisfério ipsilateral e contralateral à oclusão da artéria carótida comum nos animais submetidos à HI_DPN3 (A) e à HI_DPN11 (B). Os grupos indicados com doses (mg/kg) correspondem a animais HI-BUM. Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via, seguida do *post hoc* de Tukey, e expressos em média \pm EPM ($n = 5 - 7$ por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

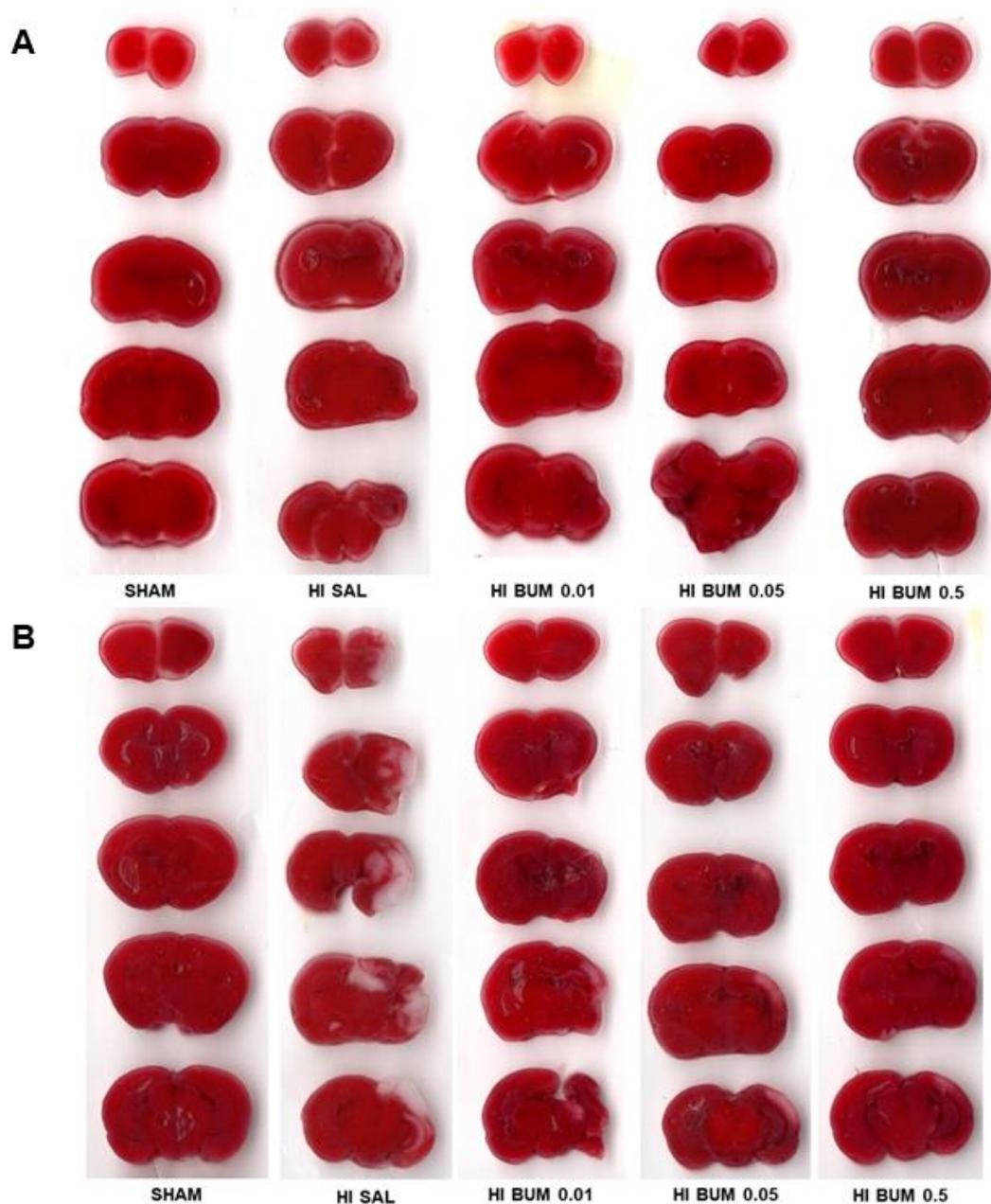


Figura 8. Imagem representativa de secções coronais do cérebro de ratos submetidos à HI: (A) HI_DPN3 e (B) HI_DPN11. Encéfalos corados com TTC, 72h após a lesão (2 mm de espessura).

4.2 Taxa de Mortalidade

Conforme indicado na Tabela 3, foram utilizados 250 ratos neonatos machos durante a execução deste trabalho. Cento e oitenta e dois animais foram submetidos ao procedimento de HI, dos quais 3 morreram durante o procedimento cirúrgico e 12 após a indução do modelo respectivo. Assim, a taxa de mortalidade de ambos os experimentos foi de 8,2%.

Tabela 3. Relação entre o número de animais e a mortalidade por experimento realizado.

Grupo	Número de Animais	Mortalidade (n)
Experimento 1		
SHAM	14	0
HI SAL	14	2
HI 0,01	14	1
HI 0,05	14	2
HI 0,5	14	1
Experimento 2		
SHAM	50	0
HI SAL	65	5
HI BUM	65	4
Total:	250	15

4.3 A bumetanida preveniu a perda de peso 48h após a lesão

A análise do ganho de peso corporal dos animais através do GEE, mostrou uma interação entre os fatores tempo e grupo ($\chi^2_{(8)} = 37,041$; $p < 0,0001$), indicando que todos os animais tiveram um aumento de peso ao longo do tempo. Além disso, observou-se menor ganho de peso entre os animais do grupo HI-SAL submetidos à HI_DPN3, quando comparado com os animais do grupo SHAM e HI-BUM 48h após a lesão ($p < 0,0001$), sem diferenças significativas nos outros pontos de avaliação. Um comportamento semelhante foi observado entre os animais submetidos à HI_DPN11. Assim, entre 24h e 48h após a lesão, os animais HI-SAL apresentaram menor ganho de peso em relação aos grupos SHAM ($p < 0,0001$). Esse efeito foi observado no período de 24h após a lesão nos animais HI-BUM quando comparado ao grupo SHAM ($p = 0,0020$). O peso corporal e o ganho de peso são apresentados pela Figura 9.

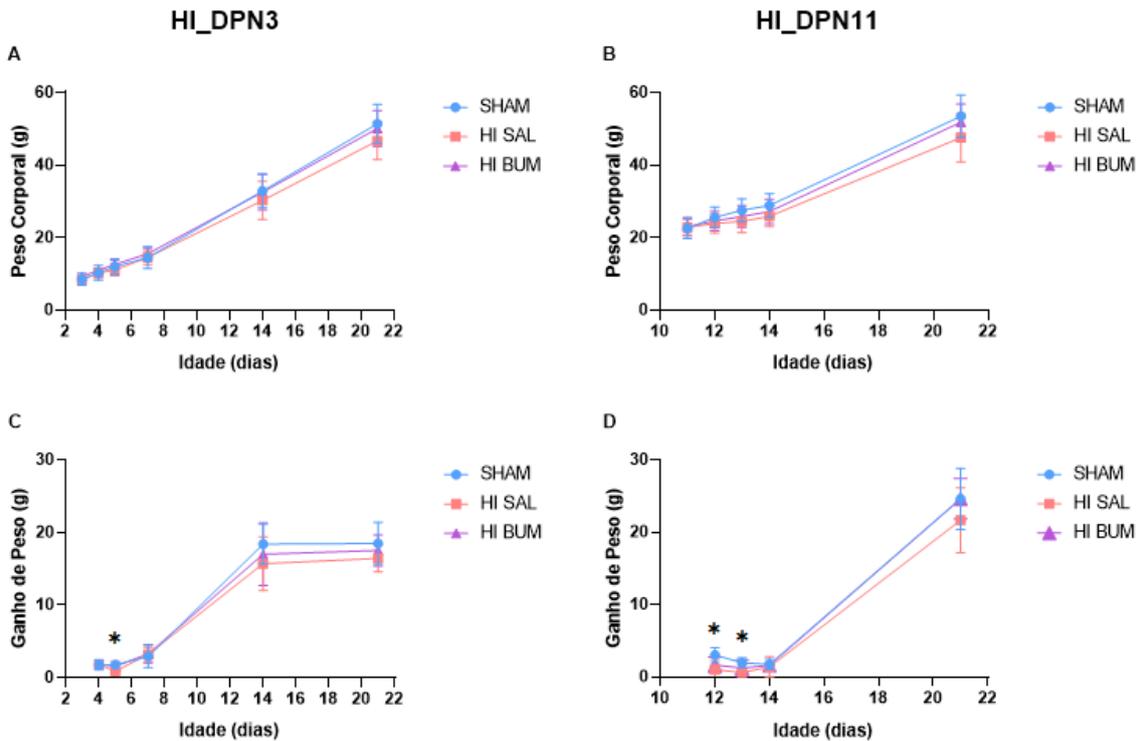


Figura 9. Peso Corporal dos Animais e Ganho de Peso. Todos os grupos tiveram suas medidas de peso corporal observadas a partir do primeiro dia de lesão até o dia do desmame (DPN21). A avaliação do peso corporal e o ganho de peso dos animais submetidos à HI_DPN3 são representadas por (A) e (C), respectivamente. Já a avaliação do peso corporal e o ganho de peso dos animais submetidos à HI_DPN11 são representadas por (B) e (D), respectivamente. Os dados foram analisados através de GEE e expressos em média \pm EPM ($n = 15$ animais por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

4.4 Avaliação Neuromotora durante o Período Lactacional

4.4.1 A bumetanida preveniu o prejuízo no teste de geotaxia negativa

Os resultados relacionados ao reflexo de geotaxia negativa estão representados na Figura 10. O teste para duas amostras pareadas evidenciou que os animais apresentaram uma melhora no desempenho durante a execução do teste ao longo do tempo ($Z = 4,359$; $p < 0,0001$). O teste de Kruskal-Wallis, seguido do *post hoc* de Dunn, revelou diferenças estatisticamente significativas na latência ao adotar a posição da cabeça contrária ao solo tanto em animais submetidos à HI_DPN3 como à HI_DPN11. Em animais no DPN3, a avaliação de geotaxia negativa executada 72h após a lesão acusou uma diferença significativa entre os grupos HI-SAL e SHAM ($\chi^2_{(2)} = 17,444$; $p < 0,0001$).

Portanto, o grupo HI-SAL apresentou maior comprometimento na função vestibular e proprioceptiva, o qual não foi observado nos animais tratados. A avaliação feita no décimo dia após a lesão apontou diferença no grupo HI-SAL em relação ao SHAM ($\chi^2_{(2)} = 21,762$; $p < 0,0001$). Esses achados confirmam o déficit neuromotor induzido pela HI tanto 72h quanto 10 dias após a lesão, bem como o efeito positivo da bumetanida nesse parâmetro funcional. Em animais no DPN11, a avaliação realizada 72h após a lesão indicou diferença significativa entre o grupo HI-SAL e os demais grupos ($\chi^2_{(2)} = 23,999$; $p < 0,0001$), evidenciando um prejuízo neurológico causado pela HI e evitado pela bumetanida. Porém, a avaliação feita no décimo dia após a lesão não apontou diferença significativa entre os grupos experimentais ($\chi^2_{(2)} = 2,029$; $p = 0,3226$).

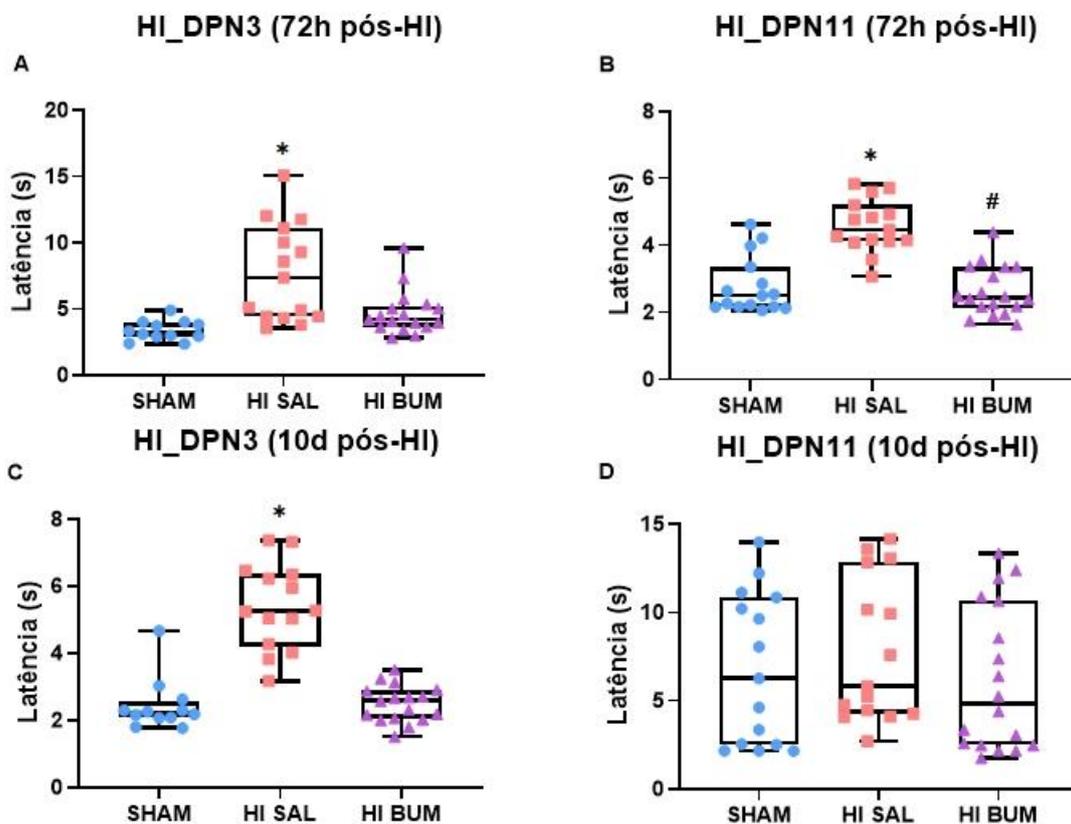


Figura 10. Reflexo de Geotaxia Negativa. A avaliação da função vestibular e proprioceptiva em animais neonatos submetidos à HI_DPN3 foi realizada 72h após a lesão (A) e no décimo dia após a lesão (C). Da mesma forma, a avaliação dos animais neonatos a submetidos à HI_DPN11 72h após a lesão (B) e no décimo dia após a lesão (D). Os dados foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn, e expressos em mediana e percentil interquartil 25 e 75 ($n = 15$ por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. # Diferença significativa com o grupo HI-SAL. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

4.4.2 A bumetanida reduziu o prejuízo no teste de endireitamento.

Os resultados pertinentes ao reflexo de endireitamento estão representados na Figura 11. Como esperado, o teste para duas amostras pareadas evidenciou que os animais apresentaram melhor desempenho para execução do teste ao longo do tempo ($t = 14,665$; $p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significativas considerando ambas as idades, assim, cada idade foi analisada de maneira independente, com o intuito de evidenciar diferenças significativas entre os grupos experimentais. A ANOVA de uma via, seguida do *post hoc* de Tukey, revelou diferenças estatisticamente significativas na latência ao adotar a posição de decúbito ventral com as 4 patas sobre a superfície nas duas idades de estudo. Em animais submetidos à HI_DPN3, a avaliação do endireitamento executada 72h após a lesão acusou uma diferença significativa entre os grupos HI-SAL e SHAM ($F_{(2,41)} = 6,209$; $p = 0,0040$), bem como na avaliação feita no décimo dia após a lesão ($F_{(2,40)} = 27,936$; $p < 0,0001$). Logo, a HI ocasionou maior deficiência da coordenação motora se comparado aos demais grupos nos dois períodos avaliados e a bumetanida foi capaz de diminuir essa deficiência. Em animais submetidos à HI_DPN11, a avaliação realizada 72h após a lesão indicou diferença significativa entre o grupo HI-SAL e o SHAM ($F_{(2,45)} = 8,551$; $p = 0,0010$), destacando a neuroproteção da bumetanida sobre a função motora nesse período. No entanto, a avaliação feita no décimo dia após a lesão não apontou diferença significativa entre os grupos experimentais ($F_{(2,45)} = 0,2018$; $p = 0,8180$).

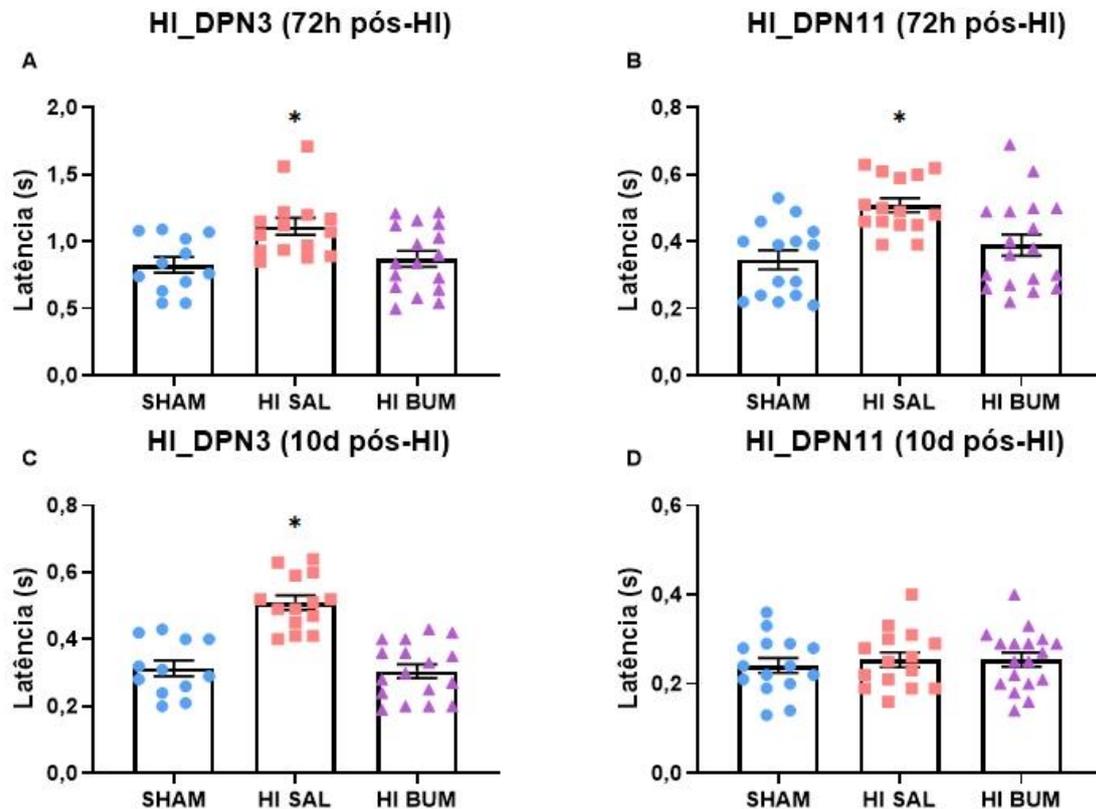


Figura 11. Reflexo de Endireitamento. A avaliação da função motora e coordenação em animais neonatos submetidos à HI_DPN3 foi realizada 72h após a lesão (A) e no décimo dia após a lesão (C). Da mesma forma, a avaliação dos animais neonatos submetidos à HI_DPN11 foi realizada 72h após a lesão (B) e no décimo dia após a lesão (D). Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via, seguida do *post hoc* de Tukey, e expressos em média \pm EPM ($n = 15$ por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

4.5 Avaliação Comportamental na Fase Adulta

4.5.1 A bumetanida inibiu a hiperlocomoção no teste de campo aberto em animais no DPN3

No teste de campo aberto não houve diferenças significativas no tempo em que os animais submetidos à HI_DPN3 permaneceram na zona central ($\chi^2_{(2)} = 1,690$; $p = 0,4300$) nem na zona periférica ($\chi^2_{(2)} = 1,690$; $p = 0,4300$), ao passo que houve diferença no número de cruzamentos entre os quadrantes ($\chi^2_{(2)} = 10,041$; $p = 0,0070$), sugerindo assim, que a HI neonatal induziu aumento na atividade locomotora, e que a bumetanida foi capaz de inibir esse comportamento nessa idade. A mesma análise foi realizada em animais

submetidos à HI_DPN11, entretanto não foi observada qualquer diferença significativa no tempo em que os animais permaneceram na zona central ($\chi^2_{(2)} = 1,358$; $p = 0,5070$) ou periférica ($\chi^2_{(2)} = 1,358$; $p = 0,5070$) nem no número de cruzamentos entre os quadrantes ($\chi^2_{(2)} = 5,029$; $p = 0,0810$). As Figuras 12 e 13 representam os resultados descritos acima.

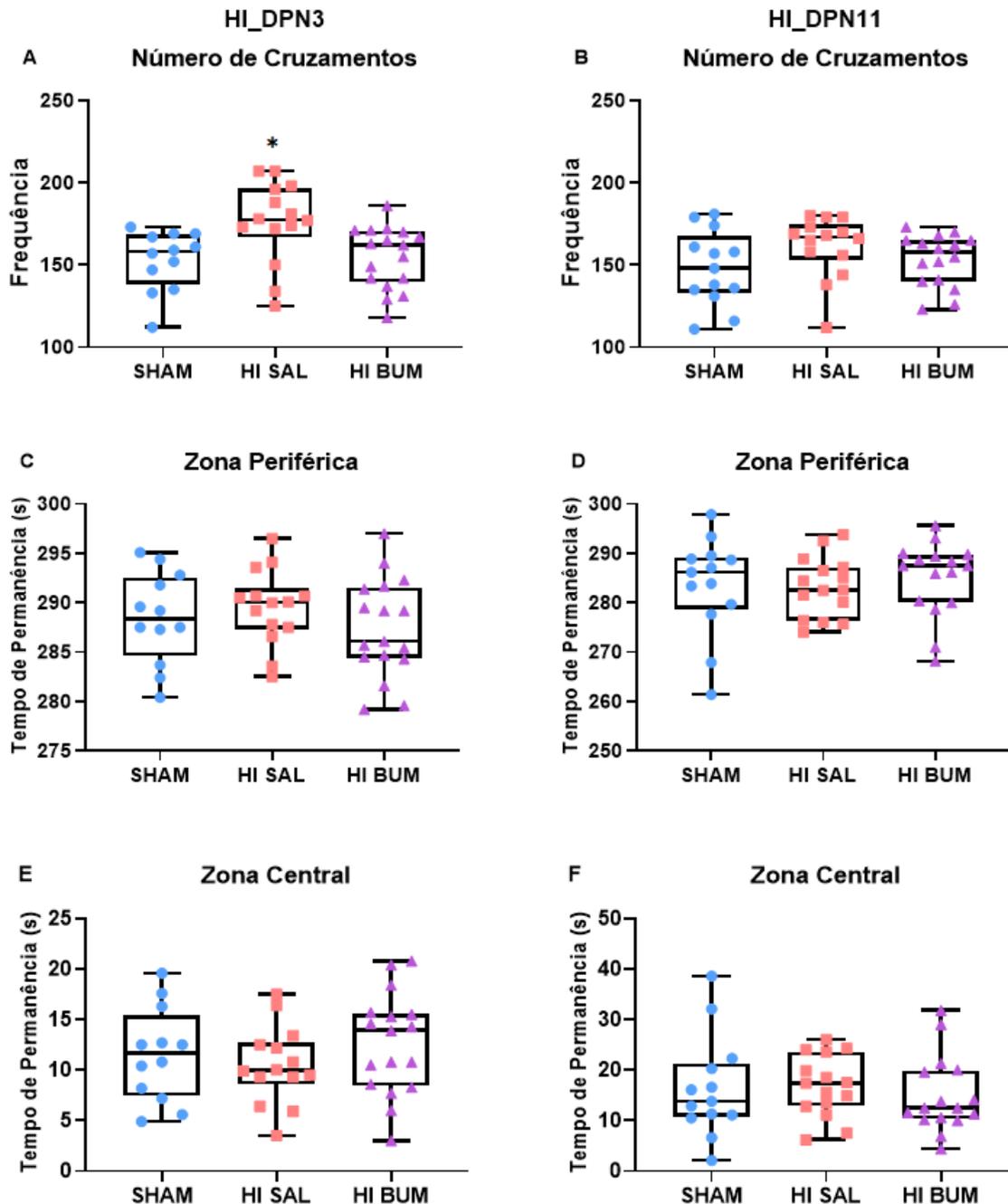


Figura 12. Campo Aberto. A avaliação da atividade locomotora na idade adulta foi realizada no DPN50. Dados obtidos para os animais submetidos à HI_DPN3: (A) número de cruzamentos entre os quadrantes, (C) permanência na periferia e (F) permanência na zona central da área. Dados obtidos para animais submetidos à HI_DPN11: (B) número de cruzamentos entre os

quadrantes, (D) permanência na periferia e (E) permanência na zona central da área. Os dados foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo *post hoc* de Dunn, e expressos em mediana e percentil interquartil 25 e 75 (n = 12-15 por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

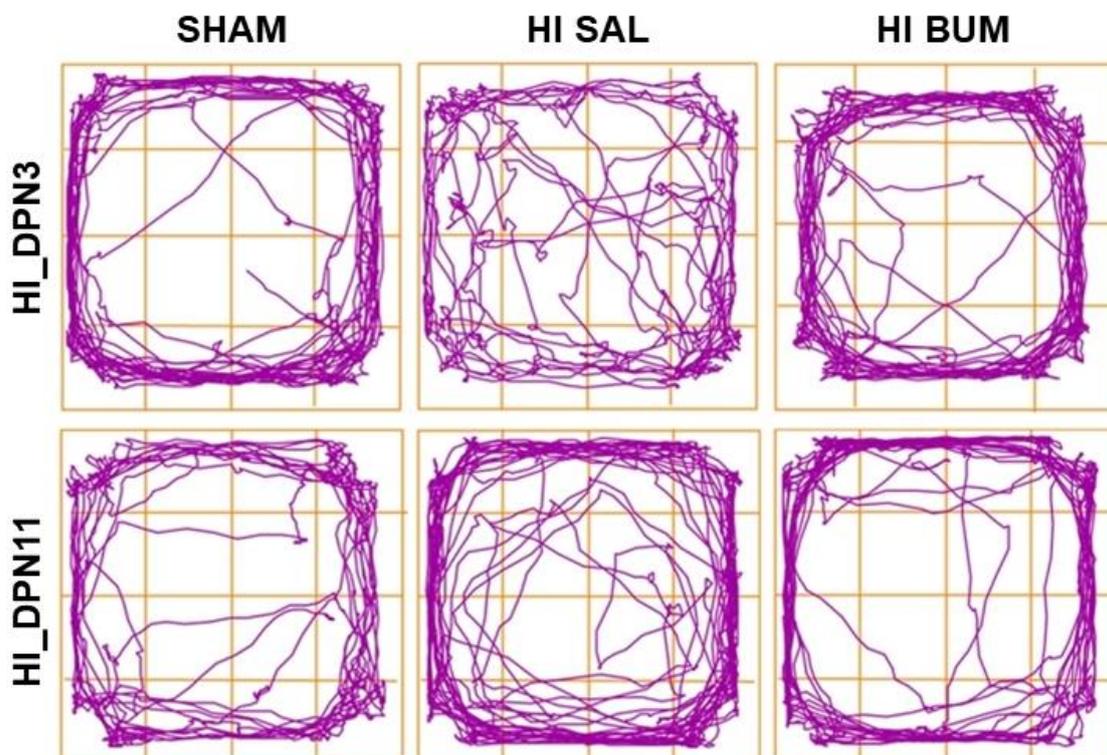


Figura 13. Campo Aberto. Mapas representativos do trajeto percorrido pelos animais na arena ao longo do tempo de teste.

4.5.2 A bumetanida reduziu os prejuízos no teste de reconhecimento de objetos em animais DPN11

A ANOVA de uma via não revelou diferença significativa nos índices de discriminação entre os grupos dos animais submetidos à HI_DPN3 ($F_{(2,40)} = 1,670$; $p = 0,2010$) (Figura 14A). Entretanto, houve diferença significativa entre os índices de discriminação dos grupos dos animais submetidos à HI_DPN11 ($F_{(2,41)} = 4,356$; $p = 0,0190$) (Figura 14B), tendo o grupo HI-SAL o menor índice de discriminação em relação ao SHAM e, portanto, maior déficit de memória ao discernir entre um objeto familiar e um objeto novo, enquanto o grupo tratado com bumetanida teve a memória declarativa conservada. Esse fato sugere que a administração de bumetanida foi capaz de reduzir o prejuízo na memória declarativa de neonatos no DPN11. A Tabela 4 apresenta os valores de tempo

que os animais utilizaram para explorar um objeto durante o treinamento e o teste.

Tabela 4. Reconhecimento de Objetos. A avaliação de reconhecimento de objetos foi realizada nos animais em DPN50. Os valores representam o tempo (em segundos) utilizado pelos animais para explorar um objeto. Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, e expressos em média \pm EPM (n = 12 - 15 por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

Grupos	Treinamento		Teste	
	Objeto 1	Objeto 2	Objeto 1	Objeto Novo
HI_DPN3				
SHAM	30,53 \pm 3,50	35,68 \pm 3,79	36,42 \pm 2,65	43,15 \pm 2,98
HI-SAL	25,86 \pm 2,90	31,41 \pm 3,76	37,80 \pm 2,32	37,34 \pm 2,93
HI-BUM	29,65 \pm 2,39	31,00 \pm 2,49	33,03 \pm 1,92	36,54 \pm 2,32
HI_DPN11				
SHAM	33,25 \pm 2,52	40,12 \pm 4,18	35,84 \pm 3,51	42,80 \pm 3,52
HI-SAL	25,61 \pm 2,56	29,12 \pm 2,27	33,64 \pm 3,35	32,11 \pm 2,73*
HI-BUM	32,38 \pm 3,31	36,34 \pm 3,59	35,61 \pm 2,78	41,99 \pm 2,60

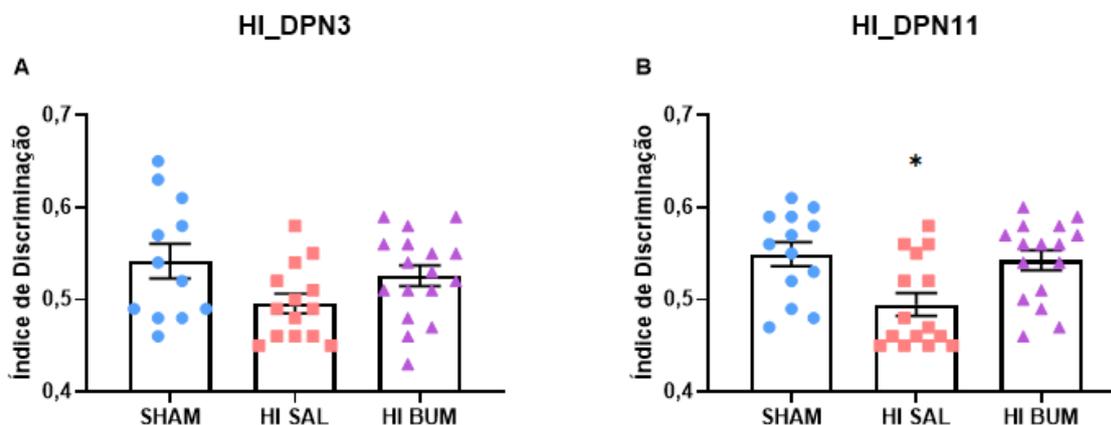


Figura 14. Reconhecimento de Objetos. A avaliação de reconhecimento de objetos foi realizada nos animais em DPN50. Foi analisado o índice de discriminação em animais submetidos à HI_DPN3 (A) e em animais submetidos à HI_DPN11 (B). Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, e expressos em média \pm EPM (n = 12 - 15 por grupo). * Diferença com o grupo SHAM. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

4.5.3 A bumetanida protegeu a capacidade de aprendizado e de memória espacial dos animais de ambos os períodos do desenvolvimento

O teste do labirinto aquático de Morris foi realizado para avaliar a capacidade de aprendizado e a memória espacial dos animais (Figura 15). A análise do período de treino através de GEE revelou os efeitos significativos dos grupos ($\chi^2_{(2)} = 614,659$; $p < 0,0001$) e do tempo de treinamento ($\chi^2_{(4)} = 989,391$; $p < 0,0001$) em ambas as idades. Uma análise mais detalhada sobre os cinco dias de treino em cada modelo experimental evidenciou que, de forma geral, os animais do grupo HI-SAL de ambas as idades demonstraram o desempenho cognitivo significativamente prejudicado quando comparados aos grupos SHAM e HI-BUM (HI_DPN3: $\chi^2_{(14)} = 3379,629$; $p < 0,0001$; HI_DPN11: $\chi^2_{(14)} = 1519,588$; $p < 0,0001$) (Figura 15A e 15B). A partir do segundo dia de treino já foi possível notar o déficit cognitivo dos animais do grupo HI-SAL por apresentarem o aprendizado mais lento, ao passo que os animais dos demais grupos demonstraram um aprendizado mais rápido e contínuo ao encontrar a plataforma nas duas idades. No terceiro dia, houve uma ligeira diferença entre os grupos HI-BUM e SHAM dos animais DPN3 ($p = 0,0031$). No último dia do período de treino, o grupo HI-SAL encerrou com prejuízo no aprendizado em relação aos grupos SHAM e HI-BUM de ambas as idades, reforçando a ação positiva da bumetanida na capacidade cognitiva de aprendizado ($p < 0,0001$).

No *probe trial*, avaliou-se a latência para cruzar pela primeira vez a área da plataforma e também a razão entre o tempo gasto no quadrante alvo e demais quadrantes em ambas as idades avaliadas. O grupo HI-SAL nas das idades apresentou maior latência ao chegar na zona da plataforma (HI_DPN3: $F_{(2,43)} = 5,384$; $p = 0,0093$; HI_DPN11: $F_{(2,44)} = 5,166$; $p = 0,0101$) (Figura 15C e 15D) e menor tempo de permanência no quadrante alvo (HI_DPN3: $F_{(2,43)} = 23,250$; $p < 0,0001$; HI_DPN11: $F_{(2,44)} = 9,842$; $p < 0,0001$) (Figura 15E e 15F) em relação aos demais grupos experimentais, demonstrando maior déficit de memória espacial em relação aos demais grupos. A Figura 16 representa o percurso realizado pelos animais durante o tempo de execução do *probe trial*.

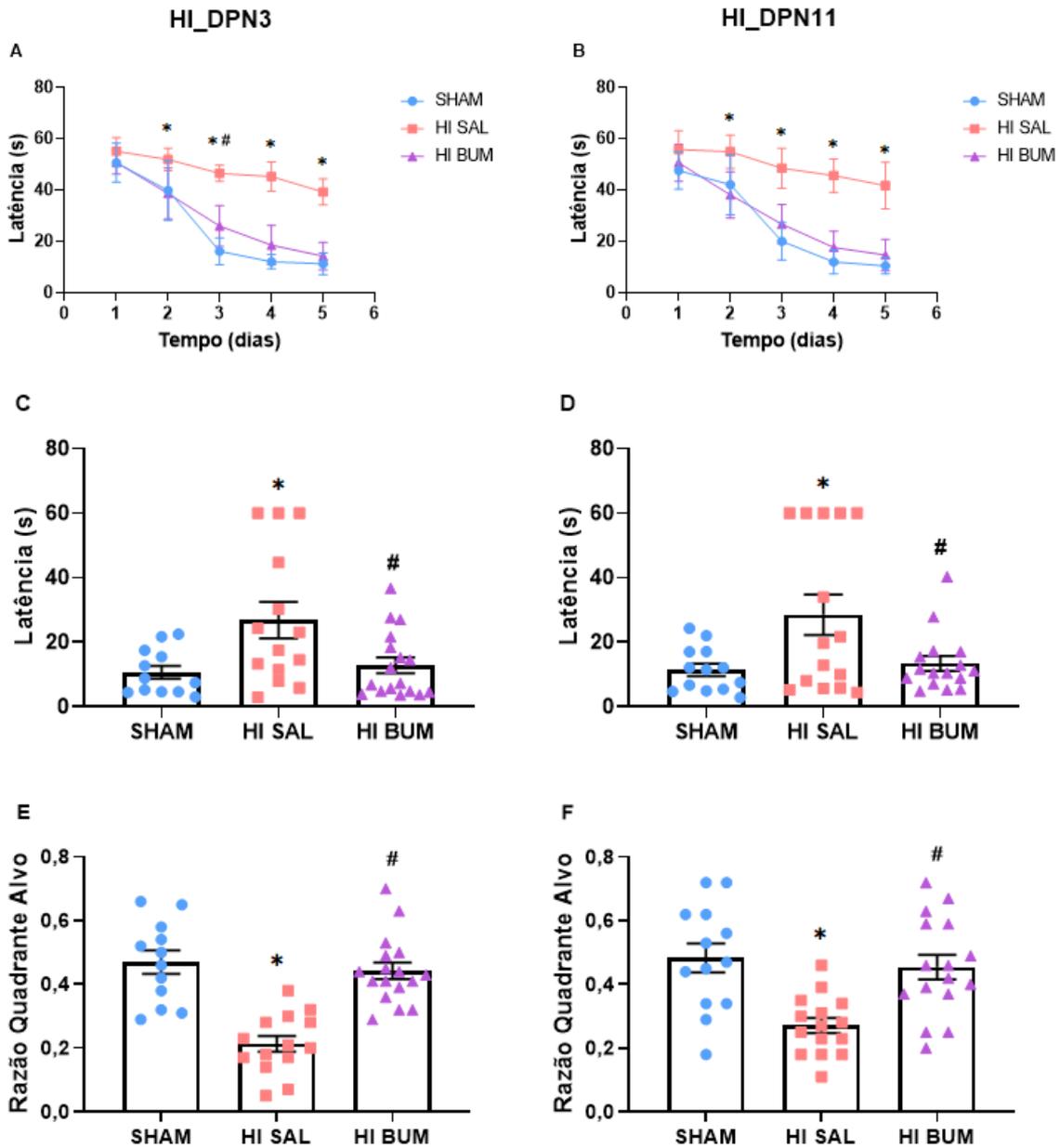


Figura 15. Labirinto Aquático de Morris. A avaliação do aprendizado e da memória espacial foi realizada nos animais em DPN60. Foi avaliada a curva de aprendizagem durante cinco dias de treinamento em animais submetidos à HI_DPN3 (A) e à HI_DPN11 (B). No *probe trial*, foi avaliada a latência para cruzar pela primeira vez a área da plataforma em animais submetidos à HI_DPN3 (C) e à HI_DPN11 (D). A razão entre o tempo gasto no quadrante alvo e demais quadrantes também foi avaliada em animais submetidos à HI_DPN3 (E) e à HI_DPN11 (F). Os dados da curva de aprendizagem foram analisados pelo GEE e expressos em média \pm EPM (n = 12 - 15 por grupo). Os dados obtidos no *probe trial* foram analisados através da ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, e expressos em média \pm EPM (n = 12-15 por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. # Diferença significativa com o grupo HI-SAL. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

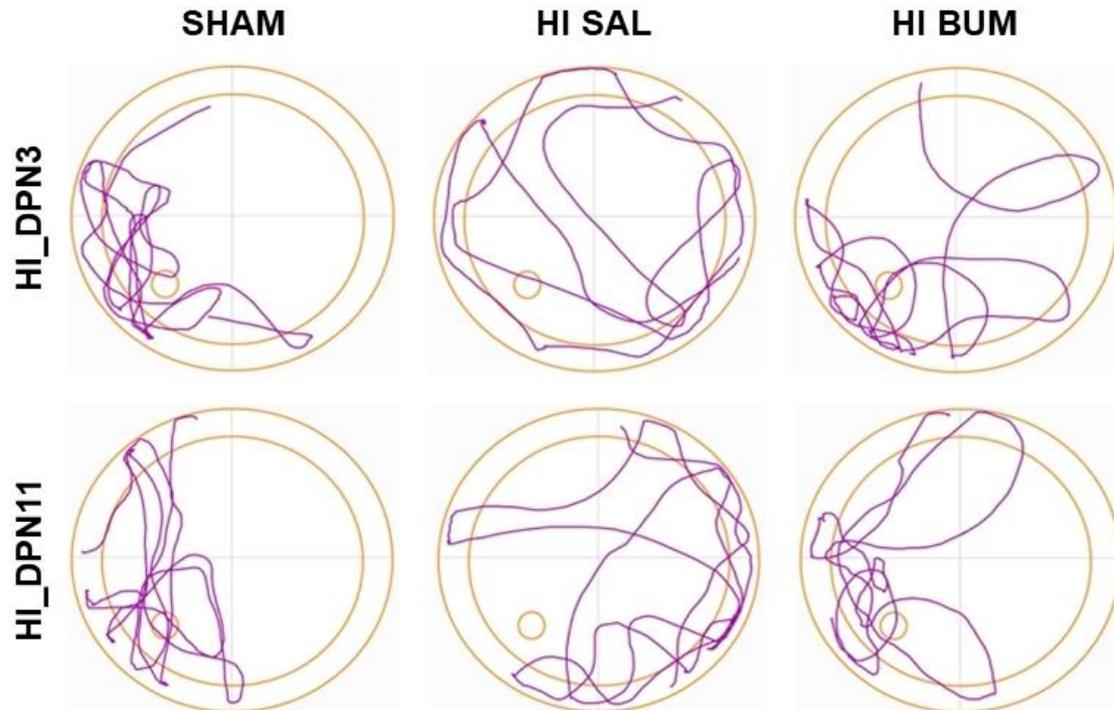


Figura 16. Labirinto Aquático de Morris. Mapas representativos do trajeto percorrido pelos animais no tanque durante o *probe trial*.

4.6 Análise Histológica

4.6.1 A bumetanida preveniu a atrofia nas estruturas encefálicas pós-HI.

Na análise do volume de lesão foi observada a razão volumétrica entre as estruturas ipsilaterais e contralaterais à oclusão da artéria carótida comum. Na ANOVA de uma via entre os indivíduos submetidos à HI_DPN3, os animais do grupo HI-SAL apresentaram atrofia do hipocampo ($F_{(2,24)} = 19,383$; $p < 0,0001$), do estriado ($F_{(2,24)} = 21,760$; $p < 0,0001$) e do hemisfério ($F_{(2,24)} = 11,312$; $p < 0,0001$) e córtex cerebrais ($F_{(2,24)} = 10,271$; $p < 0,001$) ipsilaterais quando comparados ao grupo SHAM. Entretanto, não apresentaram diferenças volumétricas significativas no córtex ($p = 0,065$) e hemisfério ($p = 0,051$) cerebrais ipsilaterais em relação ao grupo HI-BUM. Mas sim, no volume do hipocampo ($p = 0,001$) e estriado ($p = 0,003$) dos animais do grupo HI-SAL quando comparado com o grupo HI-BUM. Houve uma diferença significativa no volume do estriado ($p = 0,026$) entre os três grupos. Já nos animais submetidos à HI_DPN11, os animais do grupo HI-SAL apresentaram atrofia do hipocampo ($F_{(2,24)} = 64,871$; $p < 0,0001$), do estriado ($F_{(2,24)} = 37,376$; $p < 0,0001$) e do

hemisfério ($F_{(2,24)} = 23,769$; $p < 0,0001$) e córtex cerebrais ($F_{(2,24)} = 17,232$; $p < 0,0001$) ipsilaterais quando comparados aos grupos SHAM e HI-BUM. A partir dos dados obtidos e analisados, concluiu-se que a bumetanida exerceu um efeito neuroprotetor ao prevenir ou atenuar a atrofia tecidual das estruturas encefálicas nos animais de ambas as idades. Os resultados são demonstrados na Figura 17 e as imagens representativas são apresentadas na Figura 18.

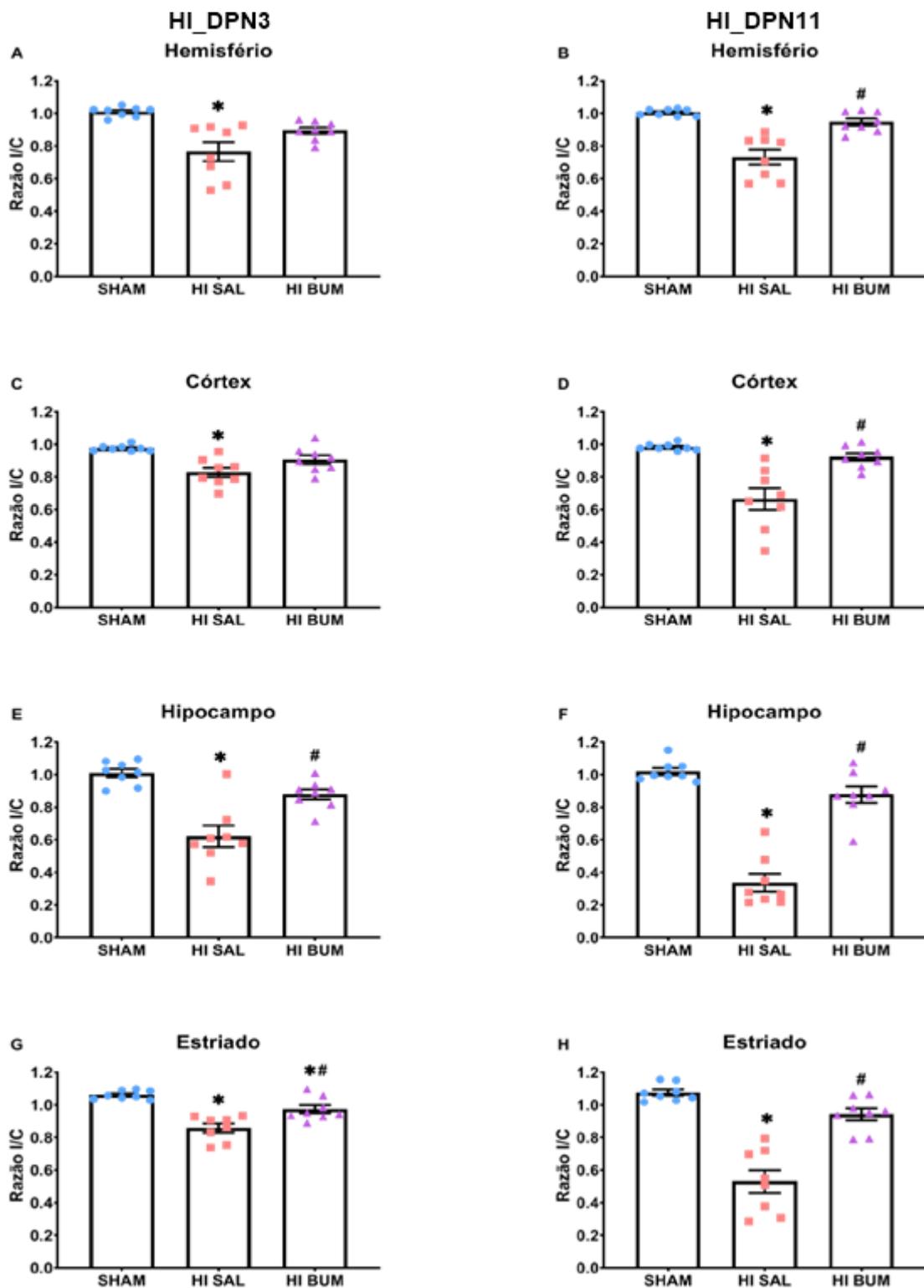


Figura 17. Volume de Lesão Encefálica. A análise volumétrica foi realizada nos animais após DPN60. Dados obtidos para os animais submetidos à HI_DPN3: (A) razão volumétrica entre hemisfério cerebral ipsilateral e contralateral, (C) razão volumétrica entre córtex cerebral ipsilateral e contralateral, (E) razão volumétrica entre hipocampo ipsilateral e contralateral e (G) razão volumétrica entre estriado ipsilateral e contralateral. Dados obtidos para animais

submetidos à HI_DPN11: (B) razão volumétrica entre hemisfério cerebral ipsilateral e contralateral, (D) razão volumétrica entre córtex cerebral ipsilateral e contralateral, (F) razão volumétrica entre hipocampo ipsilateral e contralateral e (H) razão volumétrica entre estriado ipsilateral e contralateral. Os dados foram analisados através do ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, e expressos em média \pm EPM (n = 8 por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. # Diferença significativa com o grupo HI-SAL. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

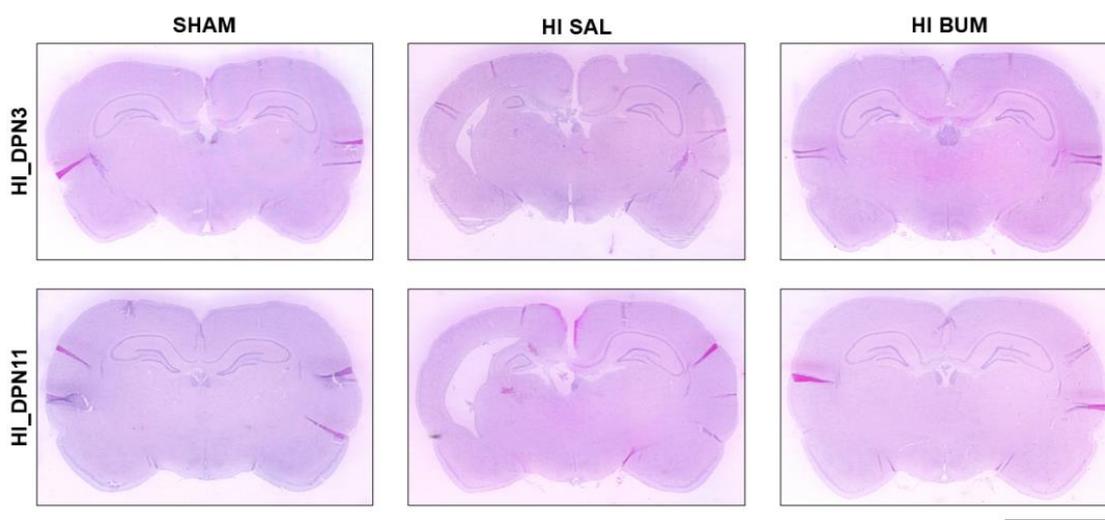


Figura 18. Imagem representativa de secções coronais ao nível de hipocampo coradas em hematoxilina-eosina de animais adultos (DPN60). Barra de calibração = 0,5 cm.

4.6.2 A bumetanida preveniu a degeneração de neurônios na camada CA1 do hipocampo

Na análise do número de células neuronais foi avaliada a taxa de neurônios em degeneração em relação ao número total de neurônios piramidais. A análise estatística indicou padrões similares para ambas as idades avaliadas, de modo que os animais do grupo HI-SAL apresentaram maior taxa de células em degeneração em relação aos demais grupos (Figura 19). Nos animais submetidos à HI_DPN3, a ANOVA de uma via acusou diferença significativa entre o grupo HI-SAL e os grupos SHAM e HI-BUM ($F_{(2,24)} = 16,904$; $p < 0,0001$). Enquanto nos animais submetidos à HI_DPN11, o mesmo teste acusou diferença significativa entre grupo HI-SAL e os grupos SHAM e HI-BUM, tendo o grupo HI-SAL a maior taxa de células em degeneração ($F_{(2,24)} = 53,963$; $p < 0,0001$). Esses resultados sugerem um efeito positivo da bumetanida na proteção neuronal diante do insulto hipóxico-isquêmico em ambas as idades. A

Figura 20 demonstra imagens representativas da CA1 hipocampal dos diferentes grupos de ambas as idades.

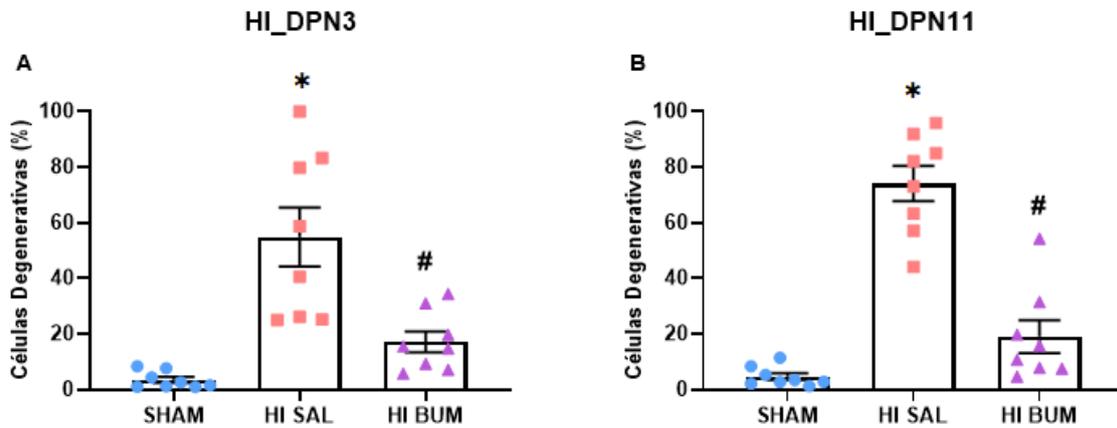
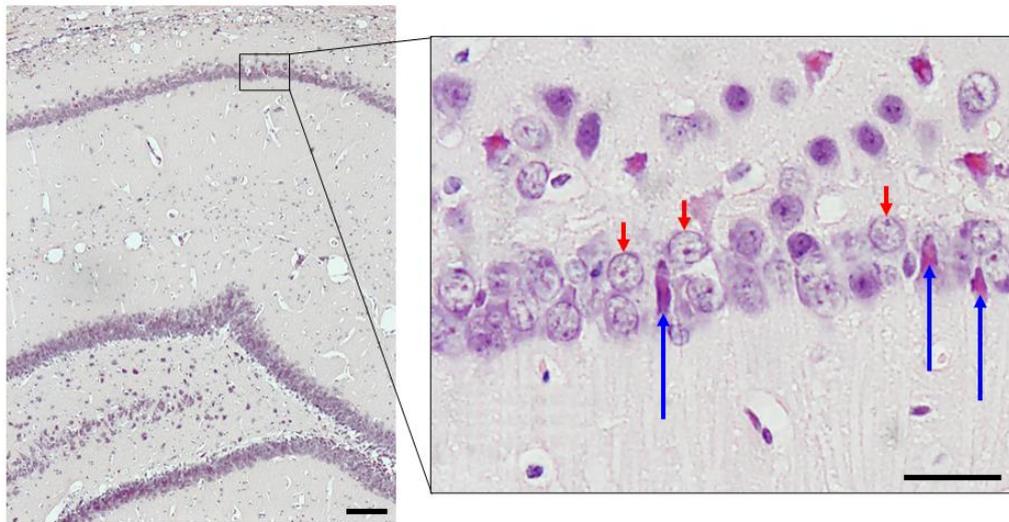


Figura 19. Células em processo de degeneração na camada CA1 do hipocampo. A análise de contagem de células foi realizada nos animais após DPN60. Dados obtidos para os animais submetidos à HI_DPN3 (A) e dados obtidos para animais submetidos à HI_DPN11 (B). Os dados foram analisados através do ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, e expressos em média \pm EPM (n = 8 por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. # Diferença significativa com o grupo HI-SAL. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

A



B

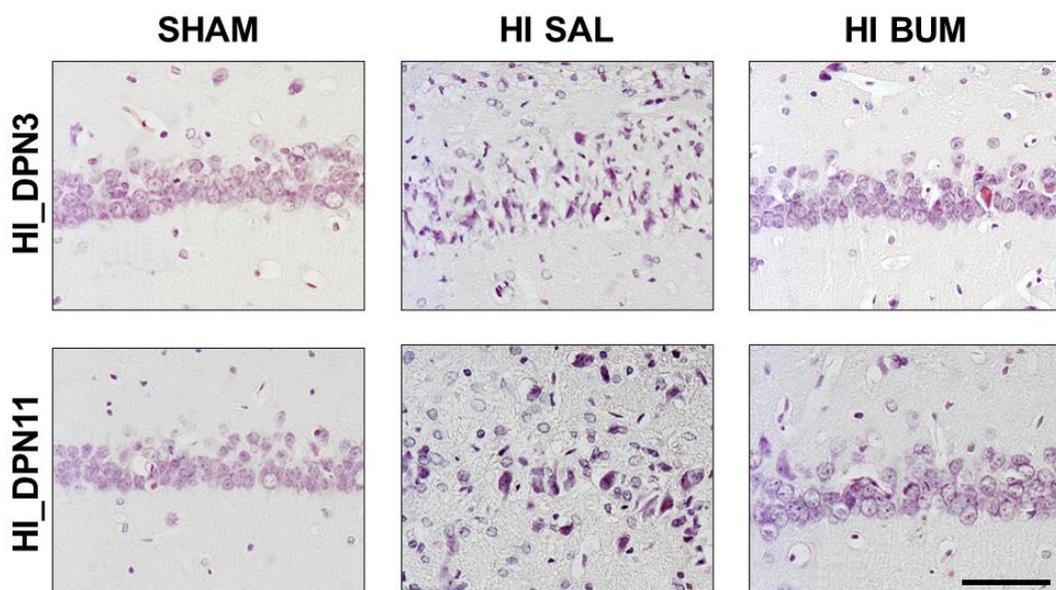


Figura 20. Imagem representativa de secções coronais ao nível da camada CA1 do hipocampo direito coradas em hematoxilina-eosina de animais adultos. A) Neurônios da camada CA1 do hipocampo; setas curtas vermelhas: neurônios normais; setas longas azuis: neurônios em degeneração. Barras de calibração: externa = 200 μm e interna = 50 μm . B) secções representativas dos grupos de cada idade. Barra de calibração: 10 μm .

4.7 Análises Bioquímicas

4.7.1 Expressão de Cotransportadores de Cloreto

A análise quantitativa do imunoconteúdo dos cotransportadores de Cl^- do hipocampo ipsilateral à oclusão carotídea dos animais de ambas as idades foi realizada. Nos animais submetidos à HI_DPN3, a ANOVA de uma via acusou diferenças significativas nos níveis de KCC2 dos grupos HI-SAL em relação ao grupo SHAM ($F_{(2,18)} = 4,426$; $p = 0,027$), sem diferença entre HI-SAL e HI-BUM ($p = 0,139$) ou entre HI-BUM e SHAM ($p = 0,561$), de modo que o grupo lesado sem tratamento apresentou nível reduzido desse cotransportador de Cl^- e a bumetanida atenuou a redução do mesmo. A mesma avaliação foi realizada para os níveis de NKCC1, porém não foi evidenciada qualquer diferença significativa entre os grupos ($F_{(2,18)} = 0,975$; $p = 0,396$) (Figura 21A e 21B). Nos animais submetidos à HI_DPN11, a ANOVA também revelou diferenças significativas nos níveis de KCC2 do grupo HI-SAL em relação ao grupo SHAM ($F_{(2,18)} = 3,898$; $p = 0,039$), sem diferença entre HI-SAL e HI-BUM ($p = 0,748$) ou entre HI-BUM e SHAM ($p = 0,149$), na qual apenas o grupo HI-SAL apresentou uma redução considerável e a bumetanida atenuou essa redução. Da mesma forma que nos animais no DNP3, a análise dos níveis de NKCC1 não apontou qualquer diferença significativa entre os grupos ($F_{(2,18)} = 0,389$; $p = 0,684$) (Figura 21C e 21D). Portanto, a bumetanida exerceu um efeito positivo sobre os níveis de KCC2, mas não interferiu nos níveis de NKCC1, atenuando os efeitos induzidos pela HI sobre KCC2 nas duas idades avaliadas.

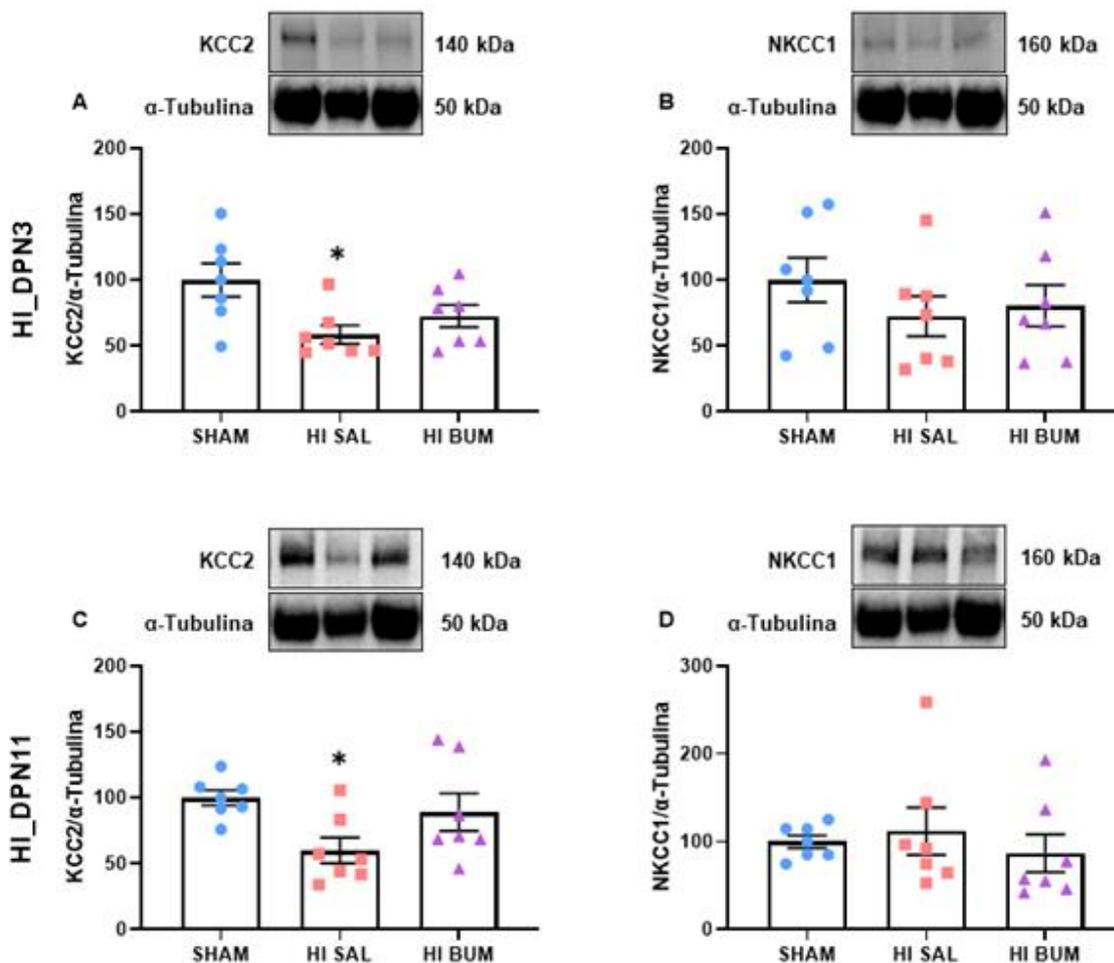


Figura 21. Imunoconteúdos de KCC2 e NKCC1 no hipocampo. A) Níveis de KCC2 e B) Níveis de NKCC1 em animais no DPN3. C) Níveis de KCC2 e D) Níveis de NKCC1 em no DPN11. Os dados foram analisados através do ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, e expressos em média \pm EPM (n = 7 por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

A fim de inferir um possível desvio tônico do GABA para uma forma hiperexcitável, a razão entre os cotransportadores de cloreto (NKCC1/KCC2) foi avaliada. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre as razões nos animais submetidos à HI_DPN3 ($F_{(2,18)} = 0,327$; $p = 0,725$). Entretanto, a razão entre os cotransportadores nos animais submetidos à HI_DPN11 revelou diferenças significativas entre o grupo HI-SAL e os grupos SHAM ($p = 0,004$) e HI-BUM ($p = 0,005$), sem diferença entre HI-BUM e SHAM ($p = 0,999$), de tal forma que a razão do grupo HI-SAL foi maior em relação aos demais grupos, sugerindo um direcionamento do tônus GABAérgico para uma

forma hiperexcitável e que a bumetanida conteve esse fenômeno ($F_{(2,18)} = 4,449$; $p = 0,027$) (Figura 22).

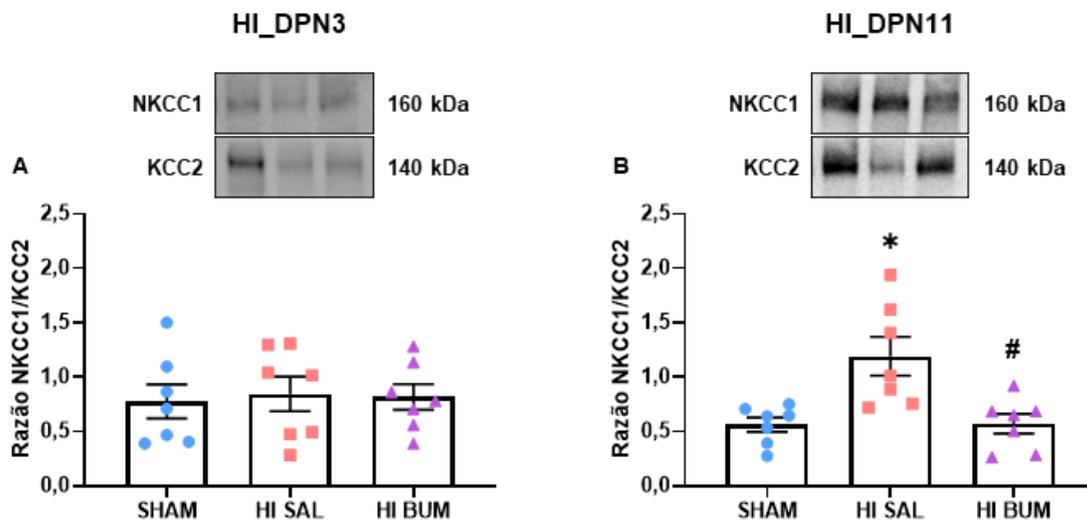


Figura 22. Razão entre imunocontêúdos de KCC2 e NKCC1 no hipocampo. A) Razão entre NKCC1 e KCC2 em animais no DPN3 e B) Razão entre NKCC1 e KCC2 em animais no DPN11. Os dados foram analisados através do ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, e expressos em média \pm EPM ($n = 7$ por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. # Diferença significativa com o grupo HI-SAL. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

4.7.2 Expressão de Proteínas Sinaptogênicas

As proteínas envolvidas na sinaptogênese também foram avaliadas através de seu imunocontêúdo em ambas as idades neste estudo. Nos animais DNP3, a análise de variância dos níveis da proteína PSD-95 registrou diferenças significativas, em que o grupo HI-SAL apresentou um nível reduzido em relação ao grupo SHAM ($F_{(2,18)} = 3,999$; $p = 0,037$), sem diferença entre HI-SAL e HI-BUM ($p = 0,199$) ou entre HI-BUM e SHAM ($p = 0,589$), de modo que a bumetanida protegeu parcialmente contra essa redução. A análise dos níveis de sinaptofisina não evidenciou diferenças significativas entre os grupos experimentais ($F_{(2,18)} = 0,641$; $p = 0,538$) (Figura 23A e 23B). Já nos animais DPN11, houve diferenças significativas nos níveis de PSD-95, tendo o grupo HI-SAL o menor nível dessa proteína se comparado ao grupo SHAM ($F_{(2,18)} = 3,657$; $p = 0,046$), sem diferença entre HI-SAL e HI-BUM ($p = 0,182$) ou entre HI-BUM e SHAM ($p = 0,717$), e a bumetanida protegendo em parte contra essa redução, enquanto não houve diferenças significativas nos níveis de sinaptofisina ($F_{(2,18)} =$

1,051; $p = 0,370$) (Figura 23C e 23D). De modo geral, sugere-se que a bumetanida manteve os níveis de proteínas pós-sinápticas próximos às do grupo controle, atenuando o prejuízo causado pela HI.

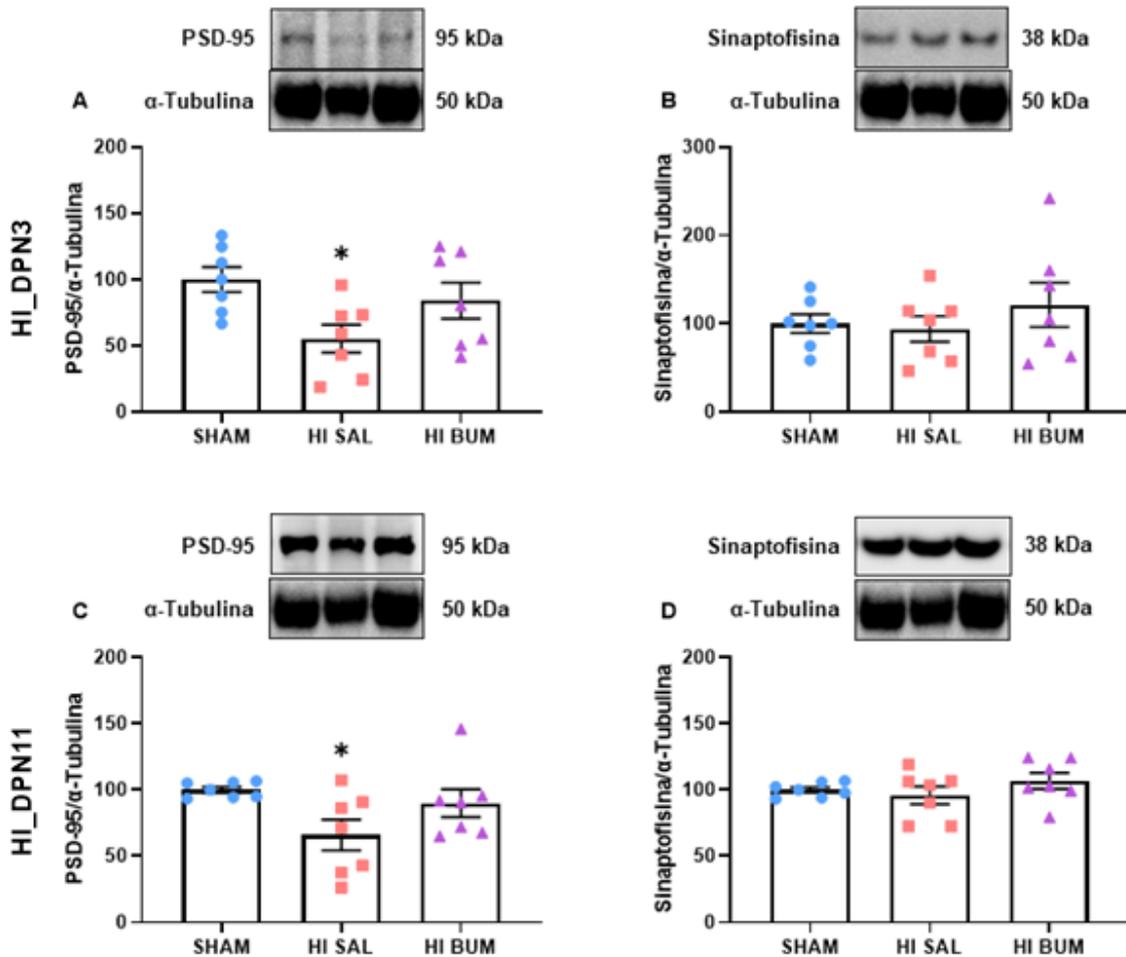


Figura 23. Imunoconteúdos de PSD-95 e Sinaptofisina no hipocampo. A) Níveis de PSD-95 e B) Níveis de Sinaptofisina em animais submetidos à HI_DPN3. C) Níveis de PSD-95 e D) Níveis de Sinaptofisina em animais submetidos à HI_DPN11. Os dados foram analisados através do ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey, e expressos em média \pm EPM ($n = 7$ por grupo). * Diferença significativa com o grupo SHAM. A diferença estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

5. Discussão

O presente estudo teve por objetivo avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores da bumetanida, quando administrada em diferentes períodos do neurodesenvolvimento, em roedores submetidos ao modelo experimental de HI neonatal nas idades de 3 e 11 dias de vida pós-natal. Para tal, avaliou-se possíveis alterações a partir de parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos.

Foram observados efeitos deletérios da HI na função reflexa dos animais de ambas as idades no referente à função motora, vestibular e proprioceptiva, ao passo que na fase adulta os prejuízos foram observados sobre a atividade locomotora, a memória declarativa, a memória espacial e a capacidade cognitiva de aprendizado. A bumetanida apresentou efeitos benéficos sobre aspectos neurofisiológicos e comportamentais afetados pela HI, que foram evidenciados pela melhora na capacidade neurológica e cognitiva dos animais. Na escala morfológica, a bumetanida também mostrou um notável papel neuroprotetor sobre estruturas encefálicas ipsilaterais à oclusão carotídea como o hemisfério cerebral, o córtex cerebral, o hipocampo e o estriado, atenuando a magnitude dos danos oriundos da HI. Ademais, em nível celular, a administração de bumetanida contribuiu para a redução da mortalidade de células neuronais na região CA1 do hipocampo provocada pela lesão hipóxico-isquêmica, destacando ainda mais seu efeito neuroprotetor. Na investigação em nível molecular, a HI foi capaz de reduzir os níveis do cotransportador de Cl^- KCC2, mas não teve efeito expressivo sobre os níveis de NKCC1, ao passo que a bumetanida demonstrou um efeito preventivo sobre os níveis KCC2, auxiliando na manutenção favorável do equilíbrio NKCC1/KCC2, sugerindo uma ação GABAérgica dentro dos limites neurofisiológicos. Além disso, a HI também exerceu ação prejudicial sobre proteínas sinápticas, reduzindo os níveis de PSD-95, porém não alterou os níveis da sinaptofisina, enquanto a bumetanida protegeu os níveis de PSD-95.

Atualmente, há uma infinidade de estudos que visam buscar compostos com potencial terapêutico para o tratamento de distúrbios que afetam o SNC. A bumetanida, um antagonista competitivo reversível altamente seletivo

de NKCC1, é um fármaco amplamente utilizado na clínica médica para o tratamento de doenças como hipertensão, insuficiência cardíaca e renal, cirrose hepática e quadros de edema (Wittner *et al.*, 1991; Brater, 2000). Além desses benefícios, a bumetanida tem despertado muito interesse devido a suas ações positivas sobre distúrbios do SNC (Ben-Ari *et al.*, 2017). No presente estudo, foi observada uma eficácia da administração de bumetanida via intraperitoneal sobre o volume de infarto encefálico induzido pela HI diretamente proporcional com a concentração de dose do fármaco em ambas as idades avaliadas, de modo que a dose de 0,5 mg/kg apresentou um efeito neuroprotetor superior em relação às demais doses (0,01 mg/kg e 0,05 mg/kg), quando administradas uma vez ao dia por 3 dias seguidos após a HI. A partir disso, a dose mais eficaz de bumetanida foi adotada como método terapêutico para o tratamento de prejuízos gerados pela HI sobre os parâmetros comportamentais, morfofisiológicos e bioquímicos, apresentando um papel neuroprotetor nos dois períodos do neurodesenvolvimento avaliados.

O desenvolvimento neonatal é marcado por eventos críticos e determinantes para a vida, e o sistema nervoso é um dos nichos que mais se transforma, elaborando e amadurecendo mecanismos biológicos de adaptação à vida como os reflexos neuromotores posturais (Lubics *et al.*, 2005). A função vestibular e proprioceptiva dos animais, elementos evolutivamente importantes na percepção da posição e orientação cefálica no espaço, foi avaliada através do reflexo de geotaxia negativa. Distúrbios que podem acometer o SNC, entre eles a HI, são capazes de gerar prejuízos vestibulo-proprioceptivos e motores em animais neonatos (Sanches *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015; Durán *et al.*, 2017; Tassinari *et al.*, 2020). Neste estudo, observou-se que a função vestibulo-proprioceptiva foi prejudicada pela HI 72h após sua indução em ambas as idades estudadas, fato demonstrado pelo aumento da latência média ao reposicionar a cabeça em relação aos demais grupos avaliados. Esse prejuízo se manteve mesmo 10 dias após a lesão HI induzida nos animais que sofreram HI no DPN3, porém não foi constatado nos animais submetidos à HI no DPN11. Curiosamente, a bumetanida exerceu um efeito positivo na preservação desse parâmetro funcional ao reduzir a latência média nos dois pontos de avaliação de ambas as idades, exceto no décimo dia após a lesão nos animais no DPN11.

Em determinado grau, a HI pode afetar a interação funcional entre neurônios do cerebelo e do labirinto, e essa perturbação pode incidir em déficits como os registrados neste trabalho (Hermans *et al.*, 1992).

O reflexo de endireitamento é um outro recurso neuromotor de adaptação à vida e sobrevivência que está relacionado com a orientação do corpo no espaço. Assim como no aspecto vestibulo-proprioceptivo, no contexto da coordenação motora a HI também foi capaz de proporcionar prejuízos (Reglodi *et al.*, 2005; Sanches *et al.*, 2013; Nie *et al.*, 2016). Notou-se que a função motora foi prejudicada pela lesão hipóxico-isquêmica 72h após sua indução nas duas idades avaliadas, e que esse déficit se estendeu por 10 dias nos animais submetidos à HI no DPN3; em contrapartida não foi observado nos animais submetidos à HI no DPN11, período em que os animais apresentavam a mesma habilidade entre si. De forma concordante à geotaxia negativa, a bumetanida também foi capaz de preservar a funcionalidade motora em ambos períodos do neurodesenvolvimento 72h após a lesão e 10 dias pós-lesão nos animais submetidos à HI no DPN3. A existência dos reflexos de endireitamento é atribuída à maturação inicial de estruturas encefálicas subcorticais, mas que sofrem com os efeitos prejudiciais da HI e promove déficits motossensoriais (Ten *et al.*, 2003), possivelmente explicando os resultados observados neste estudo.

Fan e colaboradores (2005) sugerem que os prejuízos gerados pela HI tanto na função vestibulo-proprioceptiva quanto na função motora podem estar associados à leucomalácia periventricular originada da lesão HI, que afeta principalmente estruturas subcorticais em neonatos. Essa condição é mais severa em estágios mais precoces do neurodesenvolvimento, afetando a mielinogênese em populações neuronais, ao passo que se torna menos severa quando essas populações já estão mielinizadas, de forma que prejudica mais o SNC em neonatos prematuros do que a termo (Rezaie e Dean, 2002), possivelmente explicando a diferença dos prejuízos neurológicos observados entre as idades 10 dias após a indução da lesão HI.

Na fase adulta dos ratos, na qual o SNC já passou por picos importantes da maturação neural e as estruturas encefálicas principais já apresentam consideráveis níveis de maturidade, consolidam-se padrões de

comportamento comuns em roedores e outros mamíferos, como a locomoção e exploração, além da ampliação da capacidade cognitiva e de memória dos animais. Nesse sentido, avaliou-se a atividade locomotora e exploratória dos animais através do teste de campo aberto. Nos animais submetidos à HI no DPN3, notou-se uma atividade locomotora mais acentuada no grupo de animais HI-SAL em relação aos tratados com bumetanida, enaltecendo seu papel neuroprotetor sobre esse parâmetro comportamental. Entretanto, não houve alterações expressivas entre os grupos no tempo em que os animais permaneceram na zona periférica nem na zona central (Arteni *et al.*, 2010; Durán *et al.*, 2019). Enquanto nos animais submetidos à HI no DPN11 não foi observada qualquer mudança considerável em nenhum dos três parâmetros comportamentais analisados. O comprometimento conectivo entre o córtex pré-frontal e o núcleo estriado por encefalopatias como a HI podem estar associados a comportamentos hiperativos como os observados nos animais no DPN3 (Gratton *et al.*, 2002).

Em roedores, o comportamento exploratório é muito aguçado e, por instinto, investem mais tempo explorando novidades ambientais, como um novo ambiente, um novo animal ou um novo objeto. Numa conjuntura mnemônica, a memória declarativa foi avaliada utilizando o teste de reconhecimento de objetos. Nos animais cuja HI foi induzida no DPN3 não houve diferença expressiva na capacidade discriminatória entre o objeto novo e o velho nos grupos experimentais. Contudo, quando a HI foi induzida no DPN11, os animais do grupo HI-SAL apresentaram um índice de discriminação inferior ao dos animais tratados com a bumetanida, conferindo-a um papel protetor sobre a memória declarativa. Rojas e colaboradores (2012) demonstraram que o efeito danoso da HI sobre a memória declarativa, assim como outros tipos de memória, pode estar relacionado à perda de densidade de espinhos dendríticos em neurônios piramidais na camada CA1 do hipocampo.

Em uma situação adversa como o ambiente aquático, os ratos tendem a explorar o meio através do nado em busca de algum ponto de refúgio, mas para isso dependem da capacidade cognitiva e do armazenamento de informações espaço-ambientais. Tratando-se de avaliar a memória de referência

espacial e a função cognitiva, o teste do labirinto aquático de Morris foi utilizado. Tanto nos animais submetidos à HI no DPN3 quanto nos submetidos à HI no DPN11, os padrões de comportamento observados na execução das tarefas foram similares. Em ambas as idades, os animais não tratados apresentaram déficit cognitivo traduzido pelo baixo desempenho no aprendizado ao encontrar a plataforma submersa durante o período de treino e na execução do *probe trial*. Ao passo que os animais tratados com bumetanida demonstraram desempenho superior tanto no período de treino quanto no *probe trial*. O tempo investido na zona alvo também foi ponderado nas duas idades avaliadas, e de forma consonante com as latências médias, os animais não tratados manifestaram uma razão de tempo inferior à razão observada nos animais tratados com bumetanida, reforçando o poder de proteção deste fármaco sobre a cognição e a formação de memórias.

As lesões hipóxico-isquêmicas são capazes de se disseminar em magnitudes distintas e atingir variadas estruturas encefálicas, mas o hipocampo é uma região extremamente vulnerável, com populações neuronais sensíveis e seletivas à HI (Pulsinelli *et al.*, 1982; Vannucci *et al.*, 2004). O fato de o hipocampo ser um centro primordial e crucial na formação de memórias e, portanto, da aprendizagem, torna a lesão HI um fator determinante na performance cognitiva (Pereira *et al.*, 2007). Os déficits na cognição e no aprendizado atribuídos à HI são bem documentados pelo nosso grupo de pesquisa (Netto *et al.*, 1993; Sanches *et al.*, 2013, 2015; Odorcyk *et al.*, 2017; Durán *et al.*, 2017, 2019, 2020; Carvalho *et al.*, 2022).

Em uma perspectiva morfofisiológica, a HI pode causar danos teciduais em estruturas encefálicas importantes para vários aspectos funcionais do corpo, causando lesões que podem ir de formas mais brandas até formas mais severas (Sanches *et al.*, 2013; Brekke *et al.*, 2017; Odorcyk *et al.*, 2020). Além do hipocampo, estrutura muito comprometida pela HI, o córtex cerebral, o núcleo estriado e de forma mais ampla, o hemisfério cerebral ipsilateral também podem absorver e refletir os efeitos da lesão hipóxico-isquêmica (Durán *et al.*, 2019; Odorcyk *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2022). De modo global, o padrão de atrofia tecidual evidenciado pela análise volumétrica demonstrou similaridades

entre as duas idades experimentais deste estudo. Os animais no DPN3 apresentaram atrofia unilateral em todas as estruturas avaliadas no grupo HI-SAL em relação ao grupo SHAM, enquanto que no grupo HI-BUM houve atenuação da atrofia no estriado, córtex e hemisfério cerebral e proteção contra os efeitos da HI no hipocampo. Quanto aos animais no DPN11, houve atrofia unilateral em todas as estruturas avaliadas no grupo lesado e sem tratamento, no entanto a bumetanida foi capaz de proteger essas estruturas da severidade da lesão induzida.

É evidente a ação neuroprotetora da bumetanida sobre as estruturas avaliadas neste trabalho, contudo esse fármaco parece apresentar uma eficácia mais pronunciada nos animais submetidos à HI no DPN11 do que no DPN3, possivelmente em virtude da diferença de tempo sob condição hipóxica. Apesar disso, estes achados convergem com outros que trazem à luz os efeitos positivos da bumetanida sobre lesões encefálicas originadas por trauma cerebral, asfixia cerebral e acidente vascular cerebral (O'Donnel *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2017). O'Donnel e colaboradores (2004), em um modelo de isquemia focal cerebral em ratos adultos, demonstraram que a bumetanida reduziu a formação de edema e, conseqüentemente, a lesão no tecido encefálico.

A interrupção do fluxo sanguíneo ao tecido encefálico causa uma rápida depleção do aporte de glicose e de oxigênio, além do aumento de metabólitos secundários, conduzindo as populações de células neurais a uma dramática falência energética e reduzindo os níveis de ATP celular. O declínio da concentração de ATP nos neurônios colapsa o funcionamento de enzimas importantes na homeostase celular, como a Na⁺/K⁺-ATPase, perturbando o potencial de membrana, gerando ondas de despolarização em massa e resultando na excitotoxicidade. A toxicidade oriunda da excitação neuronal desenfreada induz ao aumento de [Ca²⁺]_i, favorecendo a ativação de vias da apoptose e necroptose (Brekke *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2022). A ativação de vias de morte celular, associadas com a necrose, a inflamação, o edema e o aumento de espécies reativas de oxigênio, culmina com o aumento de morte celular (Davidson *et al.*, 2015; Fabres *et al.*, 2020). Partindo-se dessa premissa, avaliou-se o número de células neuronais em degeneração na camada CA1 do

hipocampo ipsilateral à oclusão carotídea. Os dados obtidos deste estudo também se mostraram similares entre as idades. Em ambas as idades, os grupos lesados e não tratados apresentaram uma taxa de neurodegeneração celular mais alta se comparado com os animais tratados com bumetanida, de modo que a bumetanida parece expressar um efeito benéfico sobre a capacidade de sobrevivência celular. Katnik e colaboradores (2021), em um modelo de isquemia *in vitro*, demonstraram que a bumetanida foi capaz de inibir o aumento $[Ca^{2+}]_i$ e, conseqüentemente, reduzir o efeito da excitotoxicidade glutamatérgica sobre a mortalidade neuronal, uma vez que houve redução de ativação das vias de morte celular. A bumetanida também diminuiu a taxa de mortalidade em neurônios lesionados por um modelo de axoniotomia *in vitro* e *in vivo*, reforçando o papel neuroprotetor da bumetanida na sobrevivência neuronal (Shulga *et al.*, 2012).

O funcionamento adequado do SNC depende da ocorrência de uma série de processos biológicos complexos no tempo certo. Alguns eventos são de suma importância e marcam o neurodesenvolvimento, como a maturação do sistema GABAérgico. A maturação do sistema GABAérgico não só depende da expressão e atividade controlada das isoformas de receptores GABA em diferentes pontos do SNC, como também da homeostase dos íons cloreto que coordena o comportamento neuronal diante da sinalização do GABA. É bem documentado que a homeostase dos íons cloreto nos neurônios depende de seus cotransportadores NKCC1 e KCC2, e que a razão em que se apresentam é preponderante sobre a excitação e inibição neuronal pelo GABA (Ben-Ari *et al.*, 1994). Distúrbios do SNC como a HI, são capazes de romper o equilíbrio dinâmico entre NKCC1 e KCC2, e gerar um desbalanço entre excitação e inibição que pode alterar o tônus e até sentido da sinalização do GABA num momento crítico do desenvolvimento, geralmente favorecendo uma hiperexcitabilidade (Kahle *et al.*, 2008. Ben-Ari *et al.*, 2017). Tanto o aumento da expressão de NKCC1 quanto a diminuição da expressão de KCC2, ou vice-versa, são capazes de tornar o GABA hiperexcitatório ou hiperinibitório, respectivamente (Ben-Ari *et al.*, 2017; Shulte *et al.*, 2018).

O presente estudo avaliou o imunoconteúdo de NKCC1 e KCC2, bem como a razão entre ambos a fim de inferir sobre o favorecimento de um possível desvio do tônus GABAérgico. Nos dois períodos do neurodesenvolvimento avaliados, a HI exerceu um efeito negativo sobre os níveis de KCC2, mostrando-se reduzidos nos grupos de animais HI-SAL, ao passo que os níveis desse cotransportador nos grupos de animais HI-BUM foram parcialmente preservados, sugerindo um efeito prejudicial da HI sobre o efluxo de Cl^- em neurônios hipocâmpais e uma função protetora da bumetanida sobre esse fenômeno funcional. Curiosamente, o insulto hipóxico-isquêmico não aumentou nem reduziu os níveis de NKCC1. Esses resultados sugerem um favorecimento para o acúmulo de cloreto no interior celular em razão da redução dos níveis de KCC2 e, portanto, uma dificuldade em lançar Cl^- para fora da célula em animais não tratados. Esse cenário muda em animais tratados com bumetanida, uma vez que mantiveram parcialmente os níveis de KCC2, favorecendo a saída de Cl^- da célula, mantendo a $[\text{Cl}^-]_i$ mais próximas da normalidade neurofisiológica; as consequências disso estão firmemente ligadas com a resposta GABAérgica. Apesar da ausência de alterações nos níveis de NKCC1 diante da HI neste estudo, há registros de que a bumetanida mantém a expressão desse cotransportador em condições fisiológicas basais após a indução de hipóxia neonatal (Mu *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2018). Caravagna e colaboradores (2022) registraram a redução do cotransportador KCC2 em neurônios do tronco encefálico em um modelo de hipóxia neonatal em animais de um e três dias de vida.

A relação proporcional entre NKCC1 e KCC2 é dinâmica e determinante no desenvolvimento do SNC, variando à medida que a maturação neuronal progride, de maneira que a razão NKCC1/KCC2 diminui com o tempo e o GABA muda de excitatório para inibitório (Ben-Ari *et al.*, 1994; Kahle *et al.*, 2009). De fato, em condições normais, neurônios imaturos sofrem despolarização pelo GABA, uma vez que a $[\text{Cl}^-]_i$ é alta em virtude da atividade dominante de NKCC1 em relação ao KCC2, enquanto neurônios maduros sofrem hiperpolarização pelo GABA, uma vez que a $[\text{Cl}^-]_i$ é baixa em virtude da atividade dominante de KCC2 em relação ao NKCC1 (Ben-Ari *et al.*, 2012; 2014). De modo geral, durante as primeiras duas semanas pós-natais ocorre a troca

funcional excitatória-inibitória do GABA em neurônios hipocampais (Han *et al.*, 2015).

Aqui, avaliou-se a razão entre os cotransportadores de Cl⁻ a fim de inferir sobre o direcionamento da função GABAérgica e possíveis alterações dessa função frente à HI. Apesar da alteração observada nos níveis de KCC2 e nenhuma alteração dos níveis de NKCC1 no grupo HI-SAL nas duas idades, não houve divergências expressivas na razão NKCC1/KCC2 entre os animais submetidos à HI no DPN3, sugerindo que a ação do GABA não apresentou um desvio tônico nas condições da HI; entretanto, nos animais submetidos à HI no DPN11, houve aumento expressivo na razão NKCC1/KCC2 do grupo HI-SAL, sugerindo um desvio para uma forma hiperexcitável do GABA nas condições da HI e que a bumetanida foi capaz de manter essa razão dentro dos limites fisiológicos basais neste ponto do neurodesenvolvimento. Ou seja, nos animais no DPN11, sugere-se que a HI favorece um aumento patológico na [Cl⁻]_i em razão da disparidade entre níveis de NKCC1 e KCC2 a ponto de favorecer a hiperexcitação GABAérgica, o que poderia representar outro fator responsável pelo maior dano após HI, como reportado em animais lesado no DPN11; entretanto a bumetanida reduziu essa disparidade, evitando a possível hiperexcitação neuronal. Desvios anormais da razão NKCC1/KCC2 são documentados na literatura em vários distúrbios do SNC, como doença de Huntington, doença de Parkinson, epilepsias, esquizofrenia, transtorno do espectro autista, glioblastoma, dor neuropática crônica e trauma cerebral, e a bumetanida tem tido papel promissor ao reduzir ou inibir os prejuízos decorrentes da alteração dessa razão (Ben-Ari *et al.*, 2017). Este trabalho demonstra que a bumetanida também pode ser benéfica em reduzir danos ao SNC induzidos pela HI neonatal.

A HI pode comprometer vários mecanismos neurofisiológicos essenciais para a vida do animal acometido, que também se traduzem em anormalidades no desempenho cognitivo e comportamental. Um fenômeno neural que sofre perturbações promovidas pela HI é a sinaptogênese, que está intimamente atrelada à aptidão em aprendizagem, consolidação de memórias e outras capacidades funcionais. Avaliou-se o efeito da HI sobre proteínas chave

na formação de sinapses: PSD-95 e sinaptofisina. Embora os resultados não mostrem uma ruptura na expressão de sinaptofisina entre os grupos de ambas as idades, a HI foi capaz de reduzir consideravelmente os níveis de PSD-95 nos animais não tratados (HI-SAL), ao passo que a bumetanida evitou em parte a redução dessa proteína sináptica. Esses achados, sugerem que a lesão induzida pela HI pode comprometer a qualidade e até a formação das sinapses, visto que as proteínas PSD-95 são cruciais na estabilização e na plasticidade sináptica, e que a bumetanida protegeu parcialmente contra a redução dessa proteína, zelando pela qualidade sináptica. Esse efeito da bumetanida no hipocampo pode estar associado à performance satisfatória dos animais nos testes de avaliação mnemônica e cognitiva realizados, principalmente no labirinto aquático de Morris.

Liu e colaboradores (2019) observaram redução na expressão de PSD-95 em neurônios do tálamo em um modelo de HI neonatal. A própria ação excitatória do GABA é essencial na sinaptogênese e refinamento da circuitaria neuronal do SNC imaturo, entretanto a hiperexcitabilidade GABAérgica gerada pela HI pode comprometer a formação de sinapses funcionais (Wang *et al.*, 2009). Atualmente, sabe-se que a ação excitatória do GABA em períodos iniciais do neurodesenvolvimento tem efeito indutivo na expressão do cotransportador de cloreto KCC2 (Cellot e Cherubini, 2013) e que o KCC2 está diretamente associado na formação estrutural e funcional de espinhos dendríticos em neurônios hipocámpais (Blaesse e Schmidt, 2015), portanto, o efeito negativo promovido pela HI sobre KCC2 como observado neste estudo, pode estar atrelado a prejuízos na plasticidade sináptica.

O presente trabalho visou avaliar diferenças considerando a idade em que o insulto encefálico foi induzido e, curiosamente, os dados obtidos deste estudo se mostraram similares entre as duas idades experimentais. Isso pode estar relacionado com a conduta metodológica tomada em submeter os animais DPN3 a uma condição hipóxica por 120 minutos, o dobro do tempo da condição hipóxica pela qual os animais DPN11 foram submetidos, visando obter um grau de severidade semelhante entre ambas as idades, uma vez que ratos em DPN3 apresentam maior tolerância anaeróbica encefálica em relação a ratos em

DPN11 (Odrocyk *et al.*, 2020) e, com isso, observar com maior clareza a ação da bumetanida nos parâmetros morfofuncionais e celulares.

Em suma, observa-se a partir dos achados aqui discutidos, os prejuízos gerados pela HI em diferentes perspectivas, partindo inicialmente da crise energética originada pela interrupção do fluxo sanguíneo e a rápida depleção de glicose e gás oxigênio, por conseguinte. As consequências disso foram examinadas nas alterações bioquímicas que sugerem hiperexcitabilidade GABAérgica somada à excitotoxicidade glutamatérgica da HI nos períodos específicos do neurodesenvolvimento e declínio da qualidade sinaptogênica; nas alterações morfológicas frisadas pela morte neuronal e atrofia tecidual encefálica e, conseqüentemente, no detrimento dos reflexos neurológicos, cognitivos e mnemônicos. Sobre todas essas mazelas, a bumetanida se mostrou benéfica ao proteger o SNC, reduzindo e prevenindo os efeitos danosos dependentes da HI e melhorando o status neurofisiológico dos animais. O presente estudo avaliou os efeitos da bumetanida sobre os prejuízos da HI em animais machos, entretanto, sabe-se que a maturação GABAérgica é sexo-específica (Nuñez e McCarthy, 2007; Castillo *et al.*, 2013), tornando interessante um futuro estudo que explore as diferenças entre machos e fêmeas neste contexto. Além disso, estudos eletrofisiológicos também são interessantes para avaliar em termos funcionais os resultados descritos neste trabalho.

6. Conclusão

Acerca dos resultados obtidos e discutidos aqui, conclui-se que:

- A HI não apresentou um efeito expressivo sobre a maturação GABAérgica nos animais no terceiro dia de vida, ao passo que apresentou um efeito prejudicial nos animais no décimo primeiro dia de vida, favorecendo uma hiperexcitabilidade GABAérgica neuronal nessa idade. Essa condição foi inibida pela ação da bumetanida, que manteve a maturação GABAérgica próxima das condições normais durante a fase aguda da HI neste período do neurodesenvolvimento;
- A HI prejudicou de maneira similar a formação de sinapses no hipocampo durante o evento agudo da lesão nos dois períodos de neurodesenvolvimento avaliados. Contudo, o tratamento com bumetanida atenuou esse prejuízo em ambas as idades;
- A HI apresentou efeitos negativos subagudos e crônicos sobre os aspectos reflexos neurológicos, cognitivo comportamentais (memória e motor) e teciduais encefálicos avaliados, ao passo que a bumetanida exerceu efeitos positivos sobre esses prejuízos. A bumetanida atenuou os déficits sobre reflexos neurológicos induzidos pela HI no período lactacional, principalmente nos animais DPN3 quando comparados aos DPN11, reduziu o comportamento hiperlocomotor nos animais DPN3, atenuou o déficit sobre a memória declarativa nos DPN11 e protegeu a memória espacial de referência de ambas as idades. Além disso, a bumetanida reduziu a atrofia tecidual encefálica, bem como a taxa de degeneração de neurônios hipocampais induzidas pela HI nas duas idades;
- Concluindo, os animais submetidos à HI no DPN3 e à HI no DPN11 não apresentaram diferenças significativas entre si no que se refere aos prejuízos induzidos pela lesão HI, bem como apresentaram similaridades quanto à ação neuroprotetora da bumetanida sobre tais efeitos.

7. Perspectivas

Compreender os mecanismos de ação da bumetanida no tratamento da HI sobre os aspectos da maturação GABAérgica e sinaptogênicos através de estudos eletrofisiológicos, como *patch clamp* e *calcium imaging*, além de avaliar as distintas vias de morte celular.

8. Referências

AKERMAN, C. J.; CLINE, H. T. Refining the roles of GABAergic signaling during neural circuit formation. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 8, p. 382–389, 2007.

ALEXANDER, M., GARBUS, H., SMITH, A.L., ROSENKRANTZ, T.S., FITCH, R.H., 2014. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. **Behav. Brain Res.** 259, 85–96.

ANASTÁCIO, J.R., NETTO, C. A., CASTRO, C.C., SANCHES, E.F., FERREIRA, D.C., NOSCHANG, C., KROLOW, R., DALMAZ, C., PAGNUSSAT, A., 2014. Resveratrol treatment has neuroprotective effects and prevents cognitive impairment after chronic cerebral hypoperfusion. **Neurol. Res.** 36, 627–633.

ARTENI, N.S., PEREIRA, L.O., RODRIGUES, A.L., LAVINSKY, D., ACHAVAL, M.E., NETTO, C.A., 2010. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. **Behav. Brain Res.** 210, 92–98.

ATTWELL, D.; LAUGHLIN, S. B. An energy budget for glutamatergic signalling in grey matter of the rat cerebral cortex. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 21, p. 1133–1145, 2001.

BABURAMANI A.A., EK C.J., WALKER D.W., CASTILLO-MELENDEZ M. Vulnerability of the developing brain to hypoxic-ischemic damage: contribution of the cerebral vasculature to injury and repair? *Front Physiol*, 9:3:424, 2012.

BALCOMBE, J. P.; BARNARD, N. D.; SANDUSKY, C. Laboratory routines cause animal stress. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 42–51, 2004.

BARBIN, G. *et al.* Involvement of GABAA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. **Neuroscience Letters**, v. 152, n. 1–2, p. 150–154, 1993.

BARRY, P. H.; SCHOFIELD, P. R.; MOORHOUSE, A. J. Proceedings of the Australian Neuroscience Society Symposium GABA and Glycine Receptors:

From Neurochemistry to Neural Networks GLYCINE RECEPTORS: WHAT GETS IN AND WHY? n. February, p. 935– 936, 1999.

BEHAR, T. *et al.* Many spinal cord cells transiently express low molecular weight forms of glutamic acid decarboxylase during embryonic development. **Developmental Brain Research**, v. 72, n. 2, p. 203–218, 1993.

BEN-ARI, Y. The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. **Neuroscience**, v. 279, p. 187–219, 2014.

BEN-ARI, Y. *et al.* γ -Aminobutyric acid (GABA): A fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. **Progress in Brain Research**, v. 102, n. C, p. 261–273, 1994.

BEN-ARI, Y. Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 728–739, 2002.

BEN-ARI, Y. *et al.* GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1215–1284, 2007.

BEN-ARI, Y. Khalilov, I., Kahle, K. T., & Cherubini, E. (2012). The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist*, 18(5), 467–486. <https://doi.org/10.1177/1073858412438697ABA> excitatory/inhibitory sh. **Neuroscientist**, v. 18, n. 5, p. 467–486, 2012.

BEN-ARI, Y. NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 9, p. 536–554, 2017.

BLAESSE, P.; SCHMIDT, T. K-Cl cotransporter KCC2—a moonlighting protein in excitatory and inhibitory synapse development and function. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 467, n. 4, p. 615–624, 2015.

BOCK, J., RETHER, K., GRÖGER, L., XIE, L & Braun. Perinatal programming of emotional brain circuits: an integrative view from systems to molecules. *Frontiers in Neuroscience*, 8(11),1-16, 2014.

BODZON-KULAKOWSKA, A.; BIERCZYNSKA-KRZYSIK, A.; DYLAG, T.; DRABIK, A.; SUDER, P.; NOGA, M.; JARZEBINSKA, J.; SILBERRING, J. Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of Chromatography*. Amsterdam. v.849, p.1-31, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, v. **72**, p. 248–254, 1976.

BRANDT, C. *et al.* Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 25, p. 8602–8612, 2010.

BRATER, D. C. Pharmacology of diuretics. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 319, n. 1, p. 38–50, 2000.

BREKKE, E. *et al.* Glucose and Intermediary Metabolism and Astrocyte–Neuron Interactions Following Neonatal Hypoxia–Ischemia in Rat. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 1, p. 115–132, 2017.

BUZSÁKI, G.; KAILA, K.; RAICHLE, M. Inhibition and Brain Work. **Neuron**, v. 56, n. 5, p. 771–783, 2007.

CALABRESI, P.; DE MURTAS, M.; BERNARDI, G. The neostriatum beyond the motor function: Experimental and clinical evidence. **Neuroscience**, v. 78, n. 1, p. 39–60, 1997.

CARAVAGNA, C. *et al.* Prenatal Hypoxia Induces Cl⁻ Cotransporters KCC2 and NKCC1 Developmental Abnormality and Disturbs the Influence of GABAA and Glycine Receptors on Fictive Breathing in a Newborn Rat. **Frontiers in Physiology**, v. 13, n. February, 2022.

CARVALHO, A. V. S. *et al.* Plinia trunciflora Extract Administration Prevents HI-Induced Oxidative Stress, Inflammatory Response, Behavioral Impairments, and Tissue Damage in Rats. **Nutrients**, v. 14, n. January, 2022.

CASTILLO, J. *et al.* NKCC1 and KCC2 protein expression is sexually dimorphic in the hippocampus and entorhinal cortex of neonatal rats. **Neuroscience Letters**, v. 552, p. 52–57, 2013.

CELLOT, G.; CHERUBINI, E. Functional role of ambient GABA in refining neuronal circuits early in postnatal development. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, n. JUL, p. 1–9, 2013.

CHALAK, L. F. *et al.* Perinatal acidosis and hypoxic-ischemic encephalopathy in preterm infants of 33 to 35 weeks' gestation. **Journal of Pediatrics**, v. 160, n. 3, p. 388–394, 2012.

CHEN, F. *et al.* Vortioxetine promotes early changes in dendritic morphology compared to fluoxetine in rat hippocampus. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 234–245, 2016.

CHERUBINI, E. *et al.* GABA mediated excitation in immature rat CA3 hippocampal neurons. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 481–490, 1990.

CHERUBINI, E.; GAIARSA, J. L.; BEN-ARI, Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. **Trends in Neurosciences**, v. 14, n. 12, p. 515–519, 1991.

CLAYTON, G. H. *et al.* Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex. **Developmental Brain Research**, v. 109, n. 2, p. 281–292, 1998.

CLEARY, R. T. *et al.* Bumetanide Enhances Phenobarbital Efficacy in a Rat Model of Hypoxic Neonatal Seizures. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2013.

COHEN, I. *et al.* On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. **Science**, v. 298, n. 5597, p. 1418–1421, 2002.

CONNOR, J.; TSENG, H.; HOCKBERGER, P. Depolarization- and transmitter-induced changes in intracellular Ca²⁺ of rat cerebellar granule cells in explant cultures. **The Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 1384–1400, 2018.

D'ANTUONO, M. *et al.* GABA A receptor-dependent synchronization leads to ictogenesis in the human dysplastic cortex. **Brain**, v. 127, n. 7, p. 1626–1640, 2004.

DARGAEI, Z. *et al.* Restoring GABAergic inhibition rescues memory deficits in a Huntington's disease mouse model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 7, p. E1618–E1626, 2018.

DAVIDSON, J. O. *et al.* Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy - Where to from here? **Frontiers in Neurology**, v. 6, n. SEP, 2015.

DURÁN-CARABALI L., ARCEGO D., ODORCYK F., REICHERT L, CORDEIRO J., SANCHES E., FREITAS L., DALMAZ C, PAGNUSSAT A, NETTO C. (2017) Prenatal and Early Postnatal Environmental Enrichment Reduce Acute Cell Death and Prevent Neurodevelopment and Memory Impairments in Rats Submitted to Neonatal Hypoxia Ischemia. *Mol Neurobiol*

DURÁN-CARABALI, L. E. *et al.* Prenatal and Early Postnatal Environmental Enrichment Reduce Acute Cell Death and Prevent Neurodevelopment and Memory Impairments in Rats Submitted to Neonatal Hypoxia Ischemia. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 3627–3641, 2018.

DURÁN-CARABALI, L.E., ARCEGO, D.M., SANCHES, E.F., ODORCYK, F.K., MARQUES, M.R., TOSTA, A., REICHERT, L., CARVALHO, A.S., DALMAZ, C., NETTO, C.A., 2019. Preventive and therapeutic effects of environmental enrichment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Behav. Brain Res.* 359, 485–497.

DZHALA, V. I. *et al.* NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. **Nature Medicine**, v. 11, n. 11, p. 1205–1213, 2005.

EDWARDS, A. B. *et al.* Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy and neuroprotective peptide therapies: A case for cationic arginine-rich peptides (CARPs). **Brain Sciences**, v. 8, n. 8, p. 15–20, 2018.

FABRES, R. B. *et al.* Effects of progesterone on the neonatal brain following hypoxia-ischemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 3, p. 813–821, 2018.

FABRES, R. B. *et al.* Long-Lasting Actions of Progesterone Protect the Neonatal Brain Following Hypoxia-Ischemia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 40, n. 8, p. 1417–1428, 2020.

FAN, L. W. *et al.* Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. **Behavioural Brain Research**, v. 165, n. 1, p. 80–90, 2005.

FRIEDEL, P. *et al.* A novel view on the role of intracellular tails in surface delivery of the potassium-chloride cotransporter KCC2. **eNeuro**, v. 4, n. 4, p. 1–19, 2017.

FURUKAWA, M. *et al.* Neonatal maternal separation delays the GABA excitatory-to-inhibitory functional switch by inhibiting KCC2 expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 493, n. 3, p. 1243–1249, 2017.

GANGULY, K. *et al.* GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. **Cell**, v. 105, n. 4, p. 521–532, 2001.

GARMAN, RH (2011) Histology of the central nervous system. *Toxicol Pathol* 39:22–35.

GOREN, B. *et al.* Long-term cognitive effects of uridine treatment in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy. **Brain Research**, v. 1659, p. 81–87, 2017.

HAGBERG, H. *et al.* The role of inflammation in perinatal brain injury. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 4, p. 192–208, 2015.

HAGBERG, H., MALLARD, C., ROUSSET, C.I., THORNTON, C., 2014. Mitochondria: Hub of injury responses in the developing brain. *Lancet Neurol*.

HAIDER, B. Neocortical Network Activity In Vivo Is Generated through a Dynamic Balance of Excitation and Inhibition. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 17, p. 4535–4545, 2006.

HAN, B.; BELLEMER, A.; KOELLE, M. R. An evolutionarily conserved switch in response to GABA affects development and behavior of the locomotor circuit of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 1159–1172, 2015.

HASSELL, K.J., EZZATI, M., ALONSO-ALCONADA, D., HAUSENLOY, D.J., ROBERTSON, N.J., 2015. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 100, F541–F552.

HEK, T. H. E. *et al.* Comparison of Na-K-Cl Cotransporters. v. 273, n. 18, p. 11295–11301, 1998.

HERMANS, R. H. M. *et al.* Behavioral sequelae in young rats of acute intermittent antenatal hypoxia. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 14, n. 2, p. 119–129, 1992.

HU, J. J. *et al.* Bumetanide reduce the seizure susceptibility induced by pentylenetetrazol via inhibition of aberrant hippocampal neurogenesis in neonatal rats after hypoxia-ischemia. **Brain Research Bulletin**, v. 130, p. 188–199, 2017.

HUANG, Z. J.; DI CRISTO, G.; ANGO, F. Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 9, p. 673–686, 2007.

HUANG, H. Z.; WEN, X. H.; LIU, H. Sex differences in brain MRI abnormalities and neurodevelopmental outcomes in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. **International Journal of Neuroscience**, v. 126, n. 7, p. 647–657, 2016.

HUBERFELD, G. *et al.* Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 37, p. 9866–9873, 2007.

HYDE, T. M. *et al.* Expression of GABA Signaling Molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in Cortical Development and Schizophrenia. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 30, p. 11088– 11095, 2011. IN, A. (Accepted June 30th, 1977). v. 142, n. 1978, p. 505–513, 1978.

JAENISCH, N.; WITTE, O. W.; FRAHM, C. Downregulation of potassium chloride cotransporter KCC2 after transient focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 41, n. 3, 2010.

JANTZIE, L. L. *et al.* Prenatal hypoxia–ischemia induces abnormalities in CA3 microstructure, potassium chloride co-transporter 2 expression and inhibitory tone. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. september, p. 1–10, 2015.

JELITAI, M.; MADARASZ, E. The Role of GABA in the Early Neuronal Development. **International Review of Neurobiology**, v. 71, n. 05, p. 27–62, 2005.

K., U.; A.K., B.; M.-F., C. Synaptogenesis and ultrastructural localization of the polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing striatum. **Journal of Comparative Neurology**, v. 405, n. 2, p. 216–232, 1999.

KAHLE, K. T. *et al.* Roles of the cation - Chloride cotransporters in neurological disease. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 4, n. 9, p. 490–503, 2008.

KAILA, K. *et al.* The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 251–255, 1999.

KALENKA, A. *et al.* Isoflurane anesthesia elicits protein pattern changes in rat hippocampus. **Journal of Neurosurgical Anesthesiology**, v. 22, n. 2, p. 144–154, 2010.

KATNIK, C.; CUEVAS, J. Loop Diuretics Inhibit Ischemia-Induced Intracellular Ca²⁺ Overload in Neurons via the Inhibition of Voltage-Gated Ca²⁺ and Na⁺ Channels. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. September, p. 1–13, 2021.

KELLEY, M. R. *et al.* Locally Reducing KCC2 Activity in the Hippocampus is Sufficient to Induce Temporal Lobe Epilepsy. **EBioMedicine**, v. 32, p. 62–71, 2018.

KHAZIPOV, R. *et al.* Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 590–600, 2004.

KURINCZUK, J. J.; WHITE-KONING, M.; BADAWI, N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Early Human Development**, v. 86, n. 6, p. 329–338, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAPTOOK AR, Shankaran S, Tyson JE, Munoz B, Bell EF, Goldberg RN, *et al.* Effect of therapeutic hypothermia initiated after 6 hours of age on death or disability among newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy a randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 2017; 318: 1550–1560.

LEE, H. *et al.* KCC2 expression in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 2593–2599, 2005.

LEVINE, S (1960). Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 36, 1-17

LI, H. *et al.* Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 12, p. 2358–2370, 2002.

LIU, F. *et al.* Expression of Na-K-Cl cotransporter and edema formation are age dependent after ischemic stroke. **Experimental Neurology**, v. 224, n. 2, p. 356–361, 2010.

LOTURCO, J. J. *et al.* GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. **Neuron**, v. 15, n. 6, p. 1287–1298, 1995.

LOVINGER, D. M. Ethanol Potentiates GABAergic Synaptic Transmission in a Postsynaptic Neuron/Synaptic Bouton Preparation From Basolateral Amygdala. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, n. 1, p. 433–441, 2006.

LU KT, Wu CY, Cheng NC, Wo YY, Yang JT, Yen HH, Yang YL (2006) Inhibition of the Na-K-2Cl-cotransporter in choroid plexus attenuates traumatic brain injury-induced brain edema and neuronal damage. *Eur J Pharmacol* 548:99 –105.

LU KT, Wu CY, Yen HH, Peng JH, Wang CL, Yang YL (2007) Bumetanide administration attenuated traumatic brain injury through IL-1 overexpression. *Neurol Res* 29:404–409.

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. *Behav Brain Res* 157:157–165.

LUO, W. *et al.* Vitexin reduces epilepsy after hypoxic ischemia in the neonatal brain via inhibition of NKCC1. p. 1–15, 2018.

MANENT, J.-B. A Noncanonical Release of GABA and Glutamate Modulates Neuronal Migration. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 19, p. 4755–4765, 2005.

MANLEY, G. Public Access NIH Public Access. v. 71, n. 2, p. 233–236, 2013.

MARTIN-ARAGON BAUDEL MA, Poole AV, Darlison MG (2017) Chloride co-transporters as possible therapeutic targets for stroke. *J Neurochem* 140:195-209.

MAZZANTI, L.; PASTUSZKO, A.; LENZA, G. Effects of ketamine anesthesia on rat-brain membranes: fluidity changes and kinetics of acetylcholinesterase. **BBA - Biomembranes**, v. 861, n. C, p. 105–110, 1986.

MCLEAN, C., FERRIERO, D., 2004. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin. Perinatol.*

MICHLER, A. Involvement of GABA receptors in the regulation of neurite growth in cultured embryonic chick tectum. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 463–472, 1990.

MIGHELI, A. *et al.* Detection of apoptosis in weaver cerebellum by electron microscopic *in situ* end-labeling of fragmented DNA. **Neuroscience Letters**, v. 199, n. 1, p. 53–56, 1995.

MIKAWA, S. *et al.* Developmental changes in KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. **Developmental Brain Research**, v. 136, n. 2, p. 93–100, 2002.

MILLAR, L. J. *et al.* Neonatal hypoxia ischaemia: Mechanisms, models, and therapeutic challenges. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. May, p. 1–36, 2017.

MING-CHI, L & SAN-NAN Y. Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 609813, 6 pages, 2011.

MU, X. P. *et al.* Inhibition of Nkcc1 promotes axonal growth and motor recovery in ischemic rats. **Neuroscience**, v. 365, p. 83–93, 2017.

NAKAJIMA, W. *et al.* Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 21, p. 7994–8004, 2000.

NETTO CA, SANCHES E, ODORCYK FK, DURAN-CARABALI LE, WEIS SN. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. *J. Neurosci. Res.* 2017; 95: 409–421.

NIE, CHUN-KIT TONG. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2016.

NUÑEZ, J. L.; MCCARTHY, M. M. Evidence for an extended duration of GABA-mediated excitation in the developing male versus female hippocampus. **Developmental Neurobiology**, v. 67, n. 14, p. 1879–1890, 2007.

OBERMEIER, B., DANEMAN, R., & RANSOHOFF, R. M., 2013. Development maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine*. 19, 1584- 1596.

OBRIETAN, K.; VAN DEN POL, A. GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 5065–5077, 2018.

ODORCYK, F.K., RIBEIRO, R.T., ROGINSKI, A.C., DURAN-CARABALI, L.E., COUTO-PEREIRA, N.S., DALMAZ, C., WAJNER, M., NETTO, C.A., 2021. Differential Age-Dependent Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Apoptosis Induced by Neonatal Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat Brain. *Mol. Neurobiol.* 58, 2297–2308.

ODORCYK, F.K., SANCHES, E.F., NICOLA, F.C., MORAES, J., PETTENUZZO, L.F., KOLLING, J., SIEBERT, C., LONGONI, A., KONRATH, E.L., WYSE, A., NETTO, C.A., 2017. Administration of *Huperzia quadrifariata* Extract, a Cholinesterase Inhibitory Alkaloid Mixture, has Neuroprotective Effects in a Rat Model of Cerebral Hypoxia–Ischemia. *Neurochem. Res.* 42, 552–562.

OWENS, D. F. *et al.* Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 20, p. 6414–23, 1996.

OWENS, D. F.; KRIEGSTEIN, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 715–727, 2002.

PAGANO, M. Application of electrophoresis and related methods, such as western blotting and zymography to the study of some proteins and enzymes. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdam. v.383, p.119-125, 1999.

PAGNUSSAT, A.S, SIMÃO, F., ANASTACIO, J.R., et al (2012). Effects of skilled and unskilled training on functional recovery and brain plasticity after focal ischemia in adult rats. *Brain research* 1486:53–61

PAPER, O. Effect of Increased Brain GABA Concentrations on Breathing in. v. 6, p. 168–180, 1999.

PEÑA, F.; RAMIREZ, J. M. Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. **Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 3, p. 251–283, 2005.

PEREIRA LO, ARTENI NS, PETERSEN RC, da Rocha AP, ACHAVAL M, NETTO CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2007; 28 87: 101–108.

PÉREZ-PINZÓN, M. A. Neuroprotective effects of ischemic preconditioning in brain mitochondria following cerebral ischemia. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 36, n. 4 SPEC.ISS., p. 323–327, 2004.

PERROT-SINAL, T. S. *et al.* Sex differences in the chloride cotransporters, NKCC1 and KCC2, in the developing hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 19, n. 4, p. 302–308, 2007.

PLOTKIN, M. D. *et al.* Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: A possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. **Journal of Neurobiology**, v. 33, n. 6, p. 781–795, 1997.

PÖLTL, A. *et al.* Subunit composition and quantitative importance of GABA(A) receptor subtypes in the cerebellum of mouse and rat. **Journal of neurochemistry**, v. 87, n. 6, p. 1444– 55, 2003.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A.; MOONEY, R. D.; PLATT, M. L.; WHITE, L. E. **Neuroscience**. 6th edition. New York: Sinauer Associates, 2018.

PUURUNEN, K., KOISTINAHO, J., SIRVIÖ, J., JOLKKONEN, J., SIVENIUS, J., 2001. Enriched environment housing increases neuronal Fos-staining in the dentate gyrus after a water maze spatial learning task. *Neuropharmacology*. 40, 440–447.

RAIMONDO, J. V.; RICHARDS, B. A.; WOODIN, M. A. Neuronal chloride and excitability — the big impact of small changes. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 43, p. 35–42, 2017.

RAMAMOORTHY, K.; LIN, Y. The contribution of GABAergic dysfunction to neurodevelopmental disorders. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 8, p. 452–462, 2011.

REZAIE, P.; DEAN, A. Periventricular leukomalacia, inflammation and white matter lesions within the developing nervous system. **Neuropathology**, v. 22, n. 3, p. 106–132, 2002.

RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Annals of Neurology**, v. 9, n. 2, p. 131–141, 1981.

ROCHA-FERREIRA, E.; HRISTOVA, M. Antimicrobial peptides and complement in neonatal hypoxia-ischemia induced brain damage. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. FEB, p. 1–14, 2015.

ROCHA-FERREIRA, E.; HRISTOVA, M. Plasticity in the neonatal brain following hypoxic-ischaemic injury. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.

ROELFSEMA, V., GUNNA, A.J., FRASER, M., QUAEDACKERS, J.S & BENNET, L. Cortisol and ACTH responses to severe asphyxia in preterm fetal sheep. *Exp Physiol*, 90(4), 545-555, 2005.

ROJAS JJ, DENIZ BF, MIGUEL PM, DIAZ R, HERMEL ÉDES, ACHAVAL M, NETTO CA, PEREIRA LO (2013) Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Exp Neurol* 241:25–33.

RUFFIN, V. A. *et al.* Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. **Frontiers in Physiology**, v. 5 FEB, n. February, p. 1–11, 2014.

RUMAJOGEE, P. *et al.* Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: A systematic review. **Frontiers in Neurology**, v. 7, n. APR, 2016.

SAITO, A., MAIER, C.M., PURNIMA NARASIMHAN, NISHI, T., SONG, Y.S., YU, F., LIU, J., LEE, Y., NITO, C., KAMADA, H., DODD, R.L., HSIEH, L.B., HASSID, B., KIM, E.E., GONZÁLEZ, M., CHAN, P.H., 2005. Oxidative Stress and Neuronal Death / Survival Signaling in Cerebral Ischemia. *Mol. Neurobiol.* 31, 105–116.

SAITSU, H. *et al.* Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–5, 2016.

SANCHES, E. F. *et al.* Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. **Brain Research**, v. 1438, p. 85–92, 2012.

SARDINI, A. *et al.* Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1618, n. 2, p. 153–162, 2003.

SCHLÖSSER, B. *et al.* Postnatal development of calretinin- and parvalbumin-positive interneurons in the rat neostriatum: An immunohistochemical study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 405, n. 2, p. 185–198, 1999.

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. *Prog. Neurobiol.*

SERAFINI, R. *et al.* Depolarizing GABA--activated Cl--channels in embryonic rat spinal and olfactory bulb cells. **The Journal of Physiology**, v. 488, n. 2, p. 371–386, 1995.

SHANKARAN S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, *et al.* Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Hypothermia Perinat. asphyxial Enceph.* 2005; 353: 1574–1584.

SHULGA, A. *et al.* The loop diuretic bumetanide blocks posttraumatic p75 NTR upregulation and rescues injured neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 5, p. 1757–1770, 2012.

SILBEREIS, J.C., HUANG, E.J., BACK, S. A, ROWITCH, D.H., 2010. Towards improved animal models of neonatal white matter injury associated with cerebral palsy. *Dis. Model. Mech.* 3, 678–688.

SILVA, F.B.; SOUSA, S.M.G. Aplicações da biologia molecular na odontologia: conceitos e técnicas. FOL • Faculdade de Odontologia de Lins / UNIMEP. Lins. v.14, n.2, p.7-14, 2002.

SILVEIRA, R. C.; PROCIANOY, R. S. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 91, n. 6, p. S78–S83, 2015.

SOFRONIEW M V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638–647.

STA MARIA, N. S. *et al.* Bridging the gap: Mechanisms of plasticity and repair after pediatric TBI. **Experimental Neurology**, v. 318, n. March, p. 78–91, 2019.

STEIN, V. *et al.* Expression of the KCl Cotransporter KCC2 Parallels Neuronal Maturation and the Emergence of Low Intracellular Chloride. **Journal of Comparative Neurology**, v. 468, n. 1, p. 57–64, 2004.

STÖDBERG, T. *et al.* Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

SUCCOL, F. *et al.* Intracellular chloride concentration influences the GABA A receptor subunit composition. **Nature Communications**, v. 3, 2012.

SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Prefrontal cortical regulation of hypothalamic – pituitary – adrenal function in the rat and implications for psychopathology : side matters. v. 27, p. 99–114, 2002.

SUNG, K. W. *et al.* Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 20, p. 7531–8, 2000.

SUTHERLAND BA, SHAW OM, CLARKSON AN, JACKSON DM, SAMMUT IA. Potential of action. 2004; 19: 258–260.

TAGIN MA, Woolcott CG, Vincer MJ, Whyte RK, Stinson DA. Hypothermia for Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy [Internet]. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 2012; 166: 558–566.

TASSINARI, I. D. Á. *et al.* Lactate Administration Reduces Brain Injury and Ameliorates Behavioral Outcomes Following Neonatal Hypoxia–Ischemia. **Neuroscience**, v. 448, p. 191–205, 2020.

TEN, V. S. *et al.* Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. **Behavioural Brain Research**, v. 145, n. 1–2, p. 209–219, 2003.

TSUKAHARA, T. *et al.* Repeated stress-induced expression pattern alterations of the hippocampal chloride transporters KCC2 and NKCC1 associated with behavioral abnormalities in female mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 465, n. 1, p. 145–151, 2015.

TZANOULINO, S. *et al.* Long-term behavioral programming induced by peripuberty stress in rats is accompanied by gabaergic- related alterations in the amygdala. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

VALDIVIESO, Á. G. *et al.* The Chloride Anion Acts as a Second Messenger in Mammalian Cells - Modifying the Expression of Specific Genes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 49–64, 2016.

VANNUCCI, S. J.; HAGBERG, H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. **The Journal of experimental biology**, v. 207, n. Pt 18, p. 3149–54, 2004.

VEERAWATANANAN, B.; SURAKUL, P.; CHUTABHAKDIKUL, N. Maternal restraint stress delays maturation of cation-chloride cotransporters and GABAA receptor subunits in the hippocampus of rat pups at puberty. **Neurobiology of Stress**, v. 3, p. 1–7, 2016.

VESTERBERG, O. History of electrophoretic methods. *Journal of Chromatography*. Amsterdam. v.20, n.480, p.3-19, 1989.

VOLPE, J.J. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol* 8:110–124, 2009.

VOLPE, J. J. Perinatal brain injury: From pathogenesis to neuroprotection. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 7, n. 1, p. 56–64, 2001.

WANG, C. *et al.* KCC REPRINT.pdf. v. 139, p. 59–66, 2002.

WANG, D. D.; KRIEGSTEIN, A. R. Defining the role of GABA in cortical development. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 9, p. 1873–1879, 2009.

WANG, Y. *et al.* Downregulation of hippocampal GABA after hypoxia-induced seizures in neonatal rats. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 12, p. 2409–2416, 2011.

WANG, Y. *et al.* Downregulation of hippocampal GABA after hypoxia-induced seizures in neonatal rats. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 12, p. 2409–2416, 2011.

WANG, F. *et al.* NKCC1 up-regulation contributes to early post-traumatic seizures and increased post-traumatic seizure susceptibility. **Brain Structure and Function**, v. 222, n. 3, p. 1543–1556, 2017.

WANG, G. *et al.* Bumetanide protects focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rat. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 4, p. 1487–94, 2014.

WATANABE, M. *et al.* GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. PubMed Commons. v. 213, p. 11837891, 2002.

WITTNER, M. *et al.* How Do Loop Diuretics Act? **Drugs**, v. 41, n. 3, p. 1–13, 1991.

WOO, N. S. *et al.* Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. **Hippocampus**, v. 12, n. 2, p. 258–268, 2002.

WU, H. *et al.* Melatonin attenuates neuronal apoptosis through up-regulation of K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 expression following traumatic brain injury in rats. **Journal of Pineal Research**, n. May, p. 241–250, 2016.

YAMADA, H.; FUJIMOTO, K. ICHI; YOSHIDA, M. Neuronal mechanism underlying dystonia induced by bicuculline injection into the putamen of the cat. **Brain Research**, v. 677, n. 2, p. 333–336, 1995.

YAN, Y.; DEMPSEY, R. J.; SUN, D. Expression of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter in rat brain during development and its localization in mature astrocytes. **Brain Research**, v. 911, n. 1, p. 43–55, 2001.

YANGER, J & ASHWAL, S. Animal Models of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. **Pediatric Neurology** vol. 40 no. 3, 2009.

YUSTE, R.; KATZ, L. C. Control of postsynaptic Ca²⁺ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. **Neuron**, v. 6, n. 3, p. 333–344, 1991.

XIONG, F & ZHANG, L. Review: Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 34(1), 27– 46, 2013.

XIONG, F & ZHANG, L. Review: Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 34(1), 27– 46, 2013.

ZHONG, W. *et al.* Heliox Preconditioning Exerts Neuroprotective Effects on Neonatal Ischemia/Hypoxia Injury by Inhibiting Necroptosis Induced by Ca²⁺ Elevation. **Translational Stroke Research**, 2022.